

Análise *In vitro* da toxicidade de
substâncias utilizadas em pulpotomias
de dentes decíduos. Estudo em linhagem de
fibroblastos Balb-c 3T3.

José Vitor Nogara Borges de Menezes

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Odontologia, na área de Odontopediatria.
(Edição Revisada)**

Bauru
2004

Análise In vitro da toxicidade de
Substâncias utilizadas em pulpotomias
de dentes decíduos. Estudo em linhagem de
fibroblastos Balb-c 3T3.

José Vitor Nogara Borges de Menezes

**Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em
Odontologia, na área de Odontopediatria.
(Edição revisada)**

**ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Francisca Thereza Borro
Bijella.**

Bauru
2004

JOSÉ VITOR NOGARA BORGES DE MENEZES

16 de julho de 1962	Nascimento – Rio de Janeiro - RJ
1985-1988	Curso de Odontologia – UFPR - Curitiba - PR
1989	Especialização em Odontologia Social FIOCRUZ – Rio de Janeiro - RJ
1993	Professor da disciplina de Odontopediatria. Universidade Federal do Paraná - UFPR
1996-1999	Pós-graduação (Odontopediatria), em nível de Mestrado – UFSC.
2001-2004	Pós-graduação (Odontopediatria), em nível de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.
Associações	ABO – Associação Brasileira de Odontologia - Seção Paraná. SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. IAPD – International Association of Paediatric Dentistry.

DEDICATÓRIA

À minha esposa Karina. Teu sorriso, teu abraço e a certeza de que você está sempre do meu lado sempre foram meus maiores incentivos.

Aos meus filhos, João Vítor e Leonardo. Os maiores presentes da minha vida.

Aos meus pais, Oswaldo e Marly, que sempre me apontaram com sabedoria os caminhos certos a seguir.

Aos meus sogros, Nei e Isolde. Meus irmãos, cunhados e cunhadas: Oswaldo e Soila, Mônica e Maurício, Otávio, Janice e Célio, Fabio e Kelly. Seja com palavras ou atitudes, foram fundamentais para mim.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Francisca Thereza Borro Bijella, orientadora deste trabalho. Pela postura firme, apoio e dedicação. Pela força e entusiasmo transmitidos. Exemplo não só de profissional, mas também de ser humano. Muito Obrigado.

Ao Prof. Dr. José Mauro Granjeiro, pessoa com visão científica incomum, fértil em idéias e atitudes. Aglutinador de pessoas competentes. Profissional a ser admirado e respeitado. Amigo em todas as horas. Por me receber de portas abertas dentro de seu laboratório, serei sempre grato.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre iluminando meu caminho. Só tenho a agradecer.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, nas pessoas de sua diretora, Prof^ª. Dr^ª. Maria Fidela de Lima Navarro, e do presidente da Comissão de Pós-Graduação, Prof. Dr. José Carlos Pereira, por me honrarem com a oportunidade de realização do doutorado.

Aos professores de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru, Prof. Dr. Aymar Pavarini, Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima, Prof. Dr. Ruy César Camargo Abdo, Prof^ª. Dr^ª. Maria Francisca Thereza Borro Bijella, Prof^ª. Dr^ª. Maria Aparecida Andrade Moreira Machado e Prof^ª. Dr^ª. Salete Moura Bonifácio da Silva, pelo profissionalismo marcante e exemplos transmitidos.

Aos professores de Odontopediatria da Universidade Federal do Paraná,
Prof. Dr. Renato Cordeiro Gugisch e Prof. Dr. Fabian Calixto Fraiz,
companheiros de trabalho e exemplos a serem seguidos.

Ao Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör, pelo incentivo a trabalhar nesta linha de
pesquisa e pelo auxílio na concepção e desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de
Odontologia de Bauru: Estela, Fátima, Lia e Lílian, por toda ajuda durante o
curso.

Às colegas e amigas Cleide, Daniela e Maria Fernanda, que compartilharam
este caminho comigo.

À Pity e Sheila, amigas de fé, que comigo dividiram todas alegrias e
angústias. Muito obrigado pelo apoio e força que sempre me passaram.

Aos colegas do Laboratório de Cultura Celular da Faculdade de Odontologia de Bauru: Esther, Rodrigo, Ana Paula, Eduardo, Katiucia, Juliano, Willian e Tatiana, sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Muito Obrigado.

Ao Ovídio e Thelma, funcionários do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, fundamentais para o andamento desta pesquisa.

À Jussara do Rego Elias, funcionária da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFPR, pelo auxílio administrativo dentro da Universidade.

Ao Departamento de Estomatologia do Curso de Odontologia da UFPR, por viabilizar meu afastamento para a realização do Doutorado.

À CAPES, pelo apoio financeiro através de Bolsa de Estudos do Programa PICDT-UFPR.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
RESUMO	16
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 Relevância dos testes de citotoxicidade in vitro	25
2.2 Testes in vitro de citotoxicidade	28
2.3 Reação do tecido pulpar às substâncias utilizadas em pulpotomias de dentes decíduos	36
2.3.1 Formocresol	36
2.3.2 Hidróxido de cálcio	42
2.3.3 Sulfato Férrico	45
2.3.4 Agregado trióxido mineral (MTA)	47
3 PROPOSIÇÃO	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	53

4.1 Material	53
4.1.1 Soluções	53
4.1.2 Substâncias-teste	55
4.2 Método	56
4.2.1 Cultura de células	56
4.2.2 Obtenção dos extratos	57
4.2.3 Ensaios de citotoxicidade	58
4.2.4 Definição da TD ₅₀ para cada substância-teste	59
4.2.5. Medida da redução do MTT	61
4.2.6. Medida da captação de vermelho neutro (VN)	63
4.2.7 Determinação da citotoxicidade	65
4.2.8 Análise estatística	66
5 RESULTADOS	68
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ABSTRACT	121

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Fibroblastos Balb-c 3T3 em estágio de semiconfluência (10X)
..... 45
- FIGURA 2 - Efeito das diferentes diluições dos extratos das substâncias-
teste no número de fibroblastos da linhagem Balb-c 3T3 após
exposição pelo período de 24 horas 55
- FIGURA 3 - Substâncias-teste em função de sua citotoxicidade, baseada no
valor da dose TD_{50} 57
- FIGURA 4 - Efeitos citotóxicos das diferentes substâncias-teste na TD_{50}
avaliadas utilizando os ensaios do MTT e VN 58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classificação do grau de citotoxicidade de materiais de acordo com a porcentagem de viabilidade celular residual relativa (comparado ao grupo controle negativo) 52

TABELA 2 - Valor da dose TD₅₀ (mg/mL) para cada as substâncias-teste avaliadas..... 56

TABELA 3 - Classificação do MTA, HC, SF, FCD e FC quanto à citotoxicidade determinada através da contagem de células, redução do MTT e incorporação do VN..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Teste de análise de Variância.

ATCC – American Type Culture Collection.

BMP – Bone Morphogenetic Protein (Proteína Morfogenética Óssea).

CO₂ – Dióxido de Carbono ou Gás Carbônico.

DMEM – Dulbecco Modified Eagle's Medium (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco).

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra-acético.

Fe₂(SO₄)₃ – Sulfato Férrico.

FC – Formocresol Concentrado.

FCD – Formocresol Diluído.

HC – Hidróxido de Cálcio Pró-Análise.

In situ (latim) – em sítio, no local.

In vitro (latim) – em laboratório.

In vivo (latim) – no ser humano.

ISO – International Organization for Standardization.

mM – milimolar.

MTA – Agregado Trióxido Mineral.

MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio.

NaHCO₃ – Bicarbonato de Sódio.

P.A. – Pró-Análise.

PBS-A – Tampão Salino Fosfato.

PBS-Ca⁺² – Tampão Cálcio.

pH – potencial hidrogeniônico.

SF – Solução de Sulfato Férrico a 15,5%.

SFB – Soro Fetal Bovino.

TD₅₀ – Dose tóxica para 50% das células, comparadas ao grupo controle negativo.

VN – Vermelho Neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina).

Resumo

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi estabelecer, através da definição da dose TD_{50} (concentração que causa a morte de 50% das células) uma escala de toxicidade dentre diversas substâncias comumente utilizadas em pulpotomias de dentes decíduos. Foram utilizadas como substâncias-teste o formocresol concentrado (FC), formocresol diluído a 1:5 (FCD), solução de sulfato férrico a 15,5% (SF), hidróxido de cálcio P.A. (HC) e o agregado trióxido mineral (MTA). Fibroblastos Balb-c 3T3 foram semeados em placas de cultura de 24 poços na concentração de 3×10^4 células por poço. Diluições variadas dos extratos das substâncias-teste, obtidos de acordo com normas da ISO 10993-12, foram colocadas em contato com as células por 24 horas para a determinação da TD_{50} , dose tóxica para 50% das células quando comparadas com grupo controle negativo (células não expostas aos extratos). Os ensaios colorimétricos de redução do MTT e captação do corante Vermelho Neutro foram realizados na TD_{50} das

substâncias-teste. O tratamento estatístico dos resultados foi feito através dos testes de Análise de Variância (ANOVA), Dunnet e Bartlett, com $p < 0,05$. Baseado na definição da TD_{50} , pode ser estabelecida uma escala de citotoxicidade em ordem decrescente, a saber: $FC > FCD > SF > HC > MTA$. Os ensaios para a determinação da capacidade de redução do MTT e incorporação de VN demonstraram que a citotoxicidade dos materiais afeta, primordialmente, a função mitocondrial em detrimento do efeito mais discreto na integridade da membrana. Concluímos que a determinação da dose TD_{50} utilizando a metodologia proposta pela ISO 10993-12 permite o estabelecimento de uma escala de potência adequada para a ordenação de compostos terapêuticos em função de sua toxicidade. Esta padronização poderá facilitar a comparação entre diversos materiais auxiliando na investigação de novas drogas. Ainda, é possível concluir que os materiais testados e utilizados para a pulpotomia de dentes decíduos têm sua toxicidade mediada principalmente por alterações da função mitocondrial das células.

1 INTRODUÇÃO

O procedimento de pulpotomia de dentes decíduos com formocresol, tal como ainda utilizada hoje, foi mais precocemente relatada por pesquisadores, em 1930, que preconizavam cinco consultas para realização do procedimento. A técnica que utiliza a aplicação do formocresol por 5 minutos sobre os cotos pulparem remanescentes, em uma única visita, foi primeiramente relatada por REDIG⁷³, em 1968, tornando-se procedimento padrão desde então, amplamente utilizado e ensinado em faculdades de odontologia do Brasil e ao redor do mundo (AVRAM; PULVER³, 1989; PRIMOSCH; GLOMB; JERREL⁶⁶, 1997; HUNTER; HUNTER³⁹, 2003).

Em dentes decíduos com comprometimento pulpar reversível, a pulpotomia é o procedimento clínico de eleição e o formocresol tem sido, desde o fim do século XIX, a substância mais empregada para a realização deste tipo de intervenção (KING; McWHORTER; SUE SEALE⁴⁶, 2002). Apesar de apresentar índices de sucesso clínico e radiográfico comprovadamente eficazes (VONO et al.¹⁰⁰, 1991; PUPPIN-RONTANI; POSSOBON; KASSAWARA⁶⁸, 1999; STRANGE et al.⁹⁴, 2001; THOMPSON et

al.⁹⁷, 2001; DEAN et al.¹⁴, 2002), pesquisadores têm levantado questionamentos relacionados ao seu uso contínuo e estudos têm reportado problemas, tais como defeitos de esmalte no dente permanente sucessor, sua difusão sistêmica e nos tecidos adjacentes, e seu potencial mutagênico e carcinogênico, quando utilizado em testes com animais (PRUHS; OLEN; SHARMA⁶⁷, 1977; RÖLLING; POULSEN⁷⁶, 1978; FUKS; BIMSTEIN; BRUCHIM et al.²³, 1983; MYERS et al.⁶⁰, 1983; VAN AMERONGEN; MULDER; VINGERLING⁹⁸, 1986; MULDER; VAN AMERONGEN; VINGERLING⁵⁸, 1987; ALACAM², 1989; NUNN; SMEATON; GILROY⁶², 1996).

As tendências predominantes na odontologia moderna realçam a busca por substâncias mais biocompatíveis, especialmente dentre aquelas que entrarão em contato direto com tecido pulpar (JENG; FEIGAL; MESSER⁴³, 1987; RANLY⁷⁰, 1994). A característica de fixação tecidual (RUSSO et al.⁷⁷, 1984) e a comprovada toxicidade do formocresol fazem com que a busca por substâncias alternativas para a realização de pulpotomias em dentes decíduos seja uma linha de pesquisa visivelmente em expansão (KETLEY;

GOODMAN⁴⁵, 1991; LEWIS⁵², 1998; SMITH; SUE SEALE; NUNN⁸⁹, 2000; CASAS et al.¹⁰, 2004).

Em virtude destes fatos, novos materiais vêm sendo pesquisados. A diluição do formocresol em água destilada, na proporção de 1:5 parece ter as mesmas propriedades fixadoras, apresentando menor toxicidade aos tecidos adjacentes (ABDO¹, 1976; PEREIRA⁶⁵, 1993; SALLES⁸⁰, 1993). A solução de glutaraldeído a 2,5% provou ter capacidade de fixação tecidual, mas com poder de difusão bem menor que o formocresol, apresentando histologicamente tecido pulpar aparentemente normal abaixo da camada tecidual fixada (KOPEL et al.⁴⁹, 1990). O hidróxido de cálcio também foi avaliado *in vivo*, histologicamente e radiograficamente em pulpotomias de dentes decíduos, em virtude de sua conhecida biocompatibilidade (SCHRÖDER⁸⁴, 1978; GRUYTHUYSEN; WEERHEIJM²⁹, 1997), mas em determinadas situações, alguns autores relataram presença de reabsorção radicular patológica em controle radiográfico (WATERHOUSE; NUNN; WHITWORTH¹⁰², 2000). O sulfato férrico, substância de ação hemostática (FEI; UDIN; JOHNSON²⁰, 1991; FUKS et al.²³, 1997a; FUKS et al.²⁴, 1997b; IBRICELIC; AL-JAME⁴⁰, 2000; SMITH; SUE SEALE; NUNN⁸⁹, 2000; BURNETT;

WALKER⁸, 2002) e, mais recentemente, o agregado trióxido mineral, ou MTA (CUISIA et al.¹³, 2001; EIDELMAN; HOLAN; FUKS¹⁷, 2001; RITWIK et al.⁷⁴, 2003; SHAYEGAN; PETEIN; ABBEELE⁸⁷, 2003) e a proteína morfogenética óssea ou BMP (RUTHERFORD; FITZGERALD⁷⁹, 1995; STROPPA⁹⁵, 2003), também são citados na literatura como alternativas clínicas à utilização do formocresol.

Em virtude da dificuldade de monitoração dos efeitos sistêmicos e fisiológicos, a maioria dos ensaios com esta finalidade buscam determinar os efeitos em nível celular, ou seja, a citotoxicidade. Através destes protocolos de estudo, pode-se determinar se houve morte celular ou se os danos causados às células ficaram restritos a simples alterações de metabolismo (FRESHNEY²², 2000).

A metodologia com cultura celular para estudos de biocompatibilidade e/ou citotoxicidade de materiais dentários vem sendo utilizada há mais de 40 anos para investigações de reações citotóxicas causadas por materiais endodônticos (RAPPAPORT; LILLIY; KAPSIMALIS⁷¹, 1964), e está ganhando cada vez maior importância, tanto que, com o advento da União Européia, ficou estabelecido que qualquer medicamento

potencialmente viável para uso clínico deva ser submetido a uma avaliação biológica prévia ao seu lançamento dentro dos países desta comunidade (SCHMALZ; BROWNE⁸³, 1995). Qualquer efeito citotóxico que alguma substância de utilização em procedimentos restauradores ou em endodontias tenha sobre a polpa dental pode ser previsto em experimentos *in vitro* (VAN VYK; OLIVIER; MARITZ⁹⁹, 2001).

O principal objetivo dos testes de biocompatibilidade é estimular a reação biológica a determinados materiais quando colocados em contato com tecidos biológicos. Estes métodos apresentam um custo menor para o desenvolvimento de novos materiais, reduzindo a probabilidade de surpresas quando da realização de testes clínicos e estudos *in vivo*. Sem os testes laboratoriais prévios, a utilização de animais pode consumir maior tempo e apresentar custos maiores (SCHMALZ⁸², 1994; HANKS; WATAHA; SUN³², 1996; SCHWEIKL; SCHMALZ⁸⁵, 1996), sendo aconselhável que somente aqueles materiais com biocompatibilidade aceitável, tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* em animais, devam ser considerados para utilização clínica em humanos (HAUMAN; LOVE³⁴, 2003).

O uso de cultura celular para o estudo da citotoxicidade de substâncias utilizadas em endodontia é procedimento largamente empregado e amplamente aceito (SCHWEIKL; SCHMALZ⁸⁵, 1996; WILLERSHAUSEN et al.¹⁰³, 2000; HUANG; CHANG³⁸, 2002). A metodologia empregada é reprodutível e seus protocolos são estandardizados pela International Organization for Standardization (ISO).

As linhagens de células imortalizadas são preconizadas pelas normas da ISO para ensaios *in vitro* de toxicidade e as mais empregadas nestes experimentos são as de fibroblastos de ratos Balb-c 3T3 (HANKS et al.³⁰, 1991; WATAHA; CRAIG; HANKS¹⁰¹, 1992; RATANASATHIEN et al.⁷², 1995; BOUILLAGUET et al.⁷, 2002), fibroblastos de rato L-929 (BELTES et al.⁶, 1995; ERSEV et al.¹⁸, 1999; SLETTEN; DAHL⁸⁸, 1999; LÖNROTH; DAHL⁵⁴, 2001) e odontoblastos de ratos MDPC-23 (SOUZA COSTA et al.⁹⁰, 1999; SOUZA COSTA; EDWARDS; HANKS⁹², 2001; SOUZA COSTA et al.⁹¹, 2003).

O estabelecimento de uma escala de toxicidade através de ensaios *in vitro* já ocorreu para vários materiais de uso clínico em odontologia, como os cimentos de ionômero de vidro (LÖNROTH; DAHL⁵⁴, 2001; SOUZA COSTA et al.⁹¹, 2003), líquidos desinfetantes para exposições pulpares (SOUZA

COSTA; EDWARDS; HANKS⁹², 2001), agentes dessensibilizantes dentários à base de resina (CAMPS et al.⁹, 2002), sistemas adesivos dentinários (SOUZA COSTA et al.⁹⁰, 1999; CHEN et al., 2003), compômeros (SLETTEN; DAHL⁸⁸, 1999), amálgama de prata (WATAHA; CRAIG; HANKS¹⁰¹, 1992), cimentos obturadores de canais (YESILSOY; FEIGAL¹⁰⁴, 1985; BELTES et al.⁶, 1995; ERSEV et al.¹⁸, 1999; GEURTSEN et al.²⁷, 1998), componentes de resinas compostas (HANKS et al.³⁰, 1991; RATANASATHIEN et al.⁷², 1995; NALCACI; OZTAN; YILMAZ⁶¹, 2004) e agentes clareadores (HANKS et al.³¹, 1993; KOULAOUZIDOU et al.⁵⁰, 1998; KINOMOTO; CARNES JR; EBISU⁴⁷, 2001).

Estabelecer uma relação entre a citotoxicidade dos agentes empregados em pulpotomia de dentes decíduos; mostrando quanto uma substância é mais citotóxica que outra; utilizando protocolos da ISO, é de extrema importância, pois oferecerá ao profissional odontopediatra embasamento científico para optar por um medicamento mais biologicamente compatível.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Para melhor compreensão do assunto, este capítulo foi dividido em tópicos. Para cada material avaliado neste estudo foram enfatizados artigos que mostrassem a reação celular *in vivo* e/ou *in vitro* às substâncias-teste empregadas nos ensaios desta pesquisa. Pesquisas publicadas cuja metodologia aplicada foi semelhante à utilizada nesta tese também foram incluídas nesta revisão de literatura.

2.1 Relevância dos testes *in vitro* de citotoxicidade

A correlação entre testes *in vivo* e *in vitro* foi estudada por SPANGBERG⁹³, em 1978, que relatou a importância destes e suas vantagens em relação aos procedimentos *in vivo*. Os ensaios laboratoriais servem, segundo o autor, para verificar previamente o grau de citotoxicidade de um determinado material e, de acordo com os resultados

encontrados, sugerir que sejam realizados experimentos *in vivo* na seqüência experimental ou não. Vários medicamentos endodônticos podem ser ordenados de acordo com seus graus de toxicidade *in vitro* e a padronização e reprodutibilidade destes experimentos possibilitam que qualquer outro material possa ser ranqueado dentro desta escala.

MURPHY⁵⁹, em 1988, revisando a literatura acerca da relevância clínica dos testes *in vitro*, relatou que a necessidade de se utilizar medicamentos endodônticos que sejam ao mesmo tempo bactericidas e não irritantes aos tecidos adjacentes, faz com que os testes de toxicidade *in vitro* sejam de extrema importância para o desenvolvimento de novos materiais. A pressão cada vez maior de grupos de proteção aos animais faz com que as entidades reguladoras de pesquisas direcionem cada vez mais seus esforços no sentido de aprimoramento dos testes *in vitro*. A necessidade de adaptação destes protocolos para que simulem a aplicação clínica das substâncias testadas também foi realçada pelo autor.

BARILE⁵, em 1994, cita que os testes de toxicidade *in vitro*, com cultura de células imortalizadas, são alternativas viáveis para protocolos experimentais que utilizam animais. São indicados para testes de toxicidade

aguda, sistêmica e local e têm potencial para prever a toxicidade de medicamentos em humanos. O autor relata ainda que as linhagens celulares imortalizadas dificilmente apresentam resultado falso positivo, desde que as concentrações TD_{50} sejam levadas em consideração durante os ensaios e que todos experimentos sejam padronizados e obedeçam a normas rígidas de protocolos experimentais.

O uso de modelo experimental *in vitro* com cultura celular foi discutido por SCHMALZ⁸², em 1994. O autor cita que estes ensaios são valiosos para a compreensão do comportamento biológico dos materiais avaliados, se as limitações destes testes forem levadas em consideração no momento da interpretação de seus resultados. Estes testes não substituem os ensaios *in vivo*, em virtude das limitações citadas, mas podem diminuir consideravelmente a quantidade destes testes. O autor concluiu relatando que o número de materiais com aplicabilidade clínica potencial pode ser diminuído se todos forem submetidos previamente a testes *in vitro* de citocompatibilidade.

HANKS; WATAHA; SUN³², em 1996, revisando a literatura acerca de modelos *in vitro* de testes de biocompatibilidade, citaram que o objetivo

principal destes é estimular reações biológicas a materiais, quando estes são colocados em contato com tecidos orgânicos. Os autores relataram que estes métodos são meios menos custosos para investigar materiais em desenvolvimento, reduzindo a probabilidade de surpresas quando testes clínicos em humanos e animais forem realizados e concluíram que, sem a realização de procedimentos experimentais prévios *in vitro*, os testes *in vivo* levariam tempo maior para serem realizados, apresentando maior custo financeiro.

2.2 Testes *in vitro* de citotoxicidade

Objetivando comparar a sensibilidade aos testes de citotoxicidade de células pulpares humanas com as de linhagens estabelecidas, FEIGAL et al.²¹, em 1985, utilizaram seis diferentes tipos de células provenientes de cultura primária de polpa humana e uma linhagem de fibroblastos de ratos (L-929). Em todos os testes aplicados, as células diplóides humanas mostraram ser mais sensíveis aos desafios citotóxicos aos quais foram

submetidas, do que as células de linhagem pré-estabelecida. Os autores concluíram que esta diferença se manifesta apenas em aumento de sensibilidade, pois as células de linhagem apresentam respostas proporcionalmente semelhantes às apresentadas pelas diplóides humanas.

Um estudo visando determinar as concentrações citotóxicas de onze componentes de resinas compostas foi elaborado por HANKS et al.³⁰, em 1991. Para esta finalidade, os autores utilizaram metodologia com cultura celular de fibroblastos da linhagem Balb-c 3T3, expondo extratos das substâncias avaliadas e determinando a concentração tóxica para 50% das células, quando comparado ao grupo controle, a TD₅₀, dentre outros procedimentos. A determinação desta dose é, de acordo com os autores, um dos indicadores de citotoxicidade mais confiáveis, pois esta concentração tóxica está em um ponto intermediário entre os primeiros sinais de toxicidade celular e a ausência de metabolismo ou morte celular.

Para avaliar a precisão de três métodos para teste de citotoxicidade *in vitro*, WATAHA; CRAIG; HANKS¹⁰¹, em 1992, utilizaram modelo experimental com cultura de células da linhagem Balb-c 3T3. As substâncias-teste avaliadas foram onze ligas de amálgama de prata e os

métodos comparados foram o espectrofotométrico (MTT), densitometria óptica e exame visual utilizando corantes, em microscópio óptico. A análise estatística dos resultados mostrou que os métodos ranquearam a toxicidade das substâncias-teste de maneira similar, sem diferenças significativamente estatísticas entre eles. O teste de MTT, com leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 560 nm, mostrou-se mais preciso, além de explicitar o mecanismo de toxicidade.

Uma escala de citotoxicidade dentre componentes de adesivos dentinários foi elaborada por RATANASATHIEN et al.⁷², em 1995, baseada na comparação das concentrações TD₅₀ (concentração que causa 50% de toxicidade comparada ao grupo controle) de cada uma das substâncias avaliadas. Os autores utilizaram cultura celular com linhagem Balb-c 3T3 e o ensaio MTT para ordenar os componentes de adesivos dentinários quanto ao grau de toxicidade celular.

SCHWEIKL; SCHMALZ⁸⁵, em 1996, avaliaram a sensibilidade de três testes *in vitro* de toxicidade, passíveis de serem utilizados em experimentos com materiais dentários. Os autores aplicaram dois testes colorimétricos (ensaio MTT e captação de corante vermelho neutro) e um teste de

proliferação que determinava o conteúdo protéico das células. As substâncias testadas foram dois cimentos ionômeros de vidro, o cimento de fosfato de zinco e uma resina composta. Os resultados mostraram que os testes colorimétricos do MTT e vermelho neutro foram mais sensíveis que o teste de proliferação celular. Os autores concluíram que estes ensaios podem ser realizados com poucas células, oferecendo respostas rápidas e confiáveis, utilizando um grande número de amostras em pequeno período de tempo.

MacDOUGALL et al.⁵⁶, em 1998, para testar a aplicabilidade de células de linhagem imortalizada originária de odontoblastos de polpa de ratos (MO6-G3), estudaram a citotoxicidade do monômero TEGDMA nesta linhagem e em outra, L-929, que é preconizada pela ISO 10993-5 para uso em testes *in vitro* de citocompatibilidade. A análise dos resultados mostrou que as células de origem odontoblástica foram mais sensíveis às várias diluições do extrato da substância-teste estudada, fato este que fez os autores relatarem que células imortalizadas com origem em polpa dentária devem ser mais utilizadas em testes *in vitro* de materiais potencialmente

aplicáveis em odontologia, pois simulam mais de perto a situação clínica que as substâncias irão encontrar em testes *in vivo*.

A TD₅₀ serviu de base para o ranqueamento de 35 monômeros componentes de resinas compostas, baseado na citotoxicidade destes, por GEURTSEN et al.²⁶, em 1998. Para esta finalidade, os autores utilizaram células de linhagem 3T3 e cultura primária de fibroblastos de gengiva humana. Os autores concluíram ser esta metodologia a mais adequada para este tipo de procedimento.

Uma pesquisa objetivando estabelecer uma escala de potência de citotoxicidade de compômeros foi realizada por SLETTEN; DAHL⁸⁸ em 1999. Os autores utilizaram os ensaios de MTT e Vermelho Neutro (VN), para ordenar dez marcas comerciais de compômeros disponíveis no mercado, expondo fibroblastos imortalizados da linhagem L-929 a extratos das substâncias-teste. Os pesquisadores, após definirem a escala baseada nos testes colorimétricos de redução do MTT e captação do vermelho neutro relatam que, em uma pesquisa onde mais de uma substância é testada, a utilização de mais de um ensaio para a definição de uma escala de

citotoxicidade é fundamental para obtenção de resultados confiáveis e reproduzíveis.

A determinação da dose TD_{50} para definir uma escala de citotoxicidade de agentes clareadores intracanal foi estudada por KINOMOTO; CARNES; EBISU⁴⁷, em 2001. Utilizou-se o protocolo com cultura de células do ligamento periodontal humano (PDL), expostas a cinco diluições de três agentes clareadores.

A escala de potência de citotoxicidade de quatro cimentos de ionômero de vidro foi definida por LÖNROTH; DAHL⁵⁴ em 2001. Para este fim foram utilizados os ensaios de MTT e VN em fibroblastos de linhagem L-929 expostos a extratos de materiais polimerizados e não-polimerizados. Todos os procedimentos seguiram os padrões estabelecidos pelas normas da ISO 10993-12. Os autores, após análise dos resultados, concluíram que os ensaios aplicados oferecem respostas confiáveis e reprodutíveis, pois ajudam a elucidar os mecanismos de toxicidade das substâncias avaliadas.

HUANG et al.³⁷, em 2002, avaliaram a citotoxicidade de cimentos obturadores de canal à base de resina, óxido de zinco e eugenol e hidróxido de cálcio. Para isto utilizaram células de ligamento periodontal humano de

cultura primária e outras de linhagem permanente, originária de fibroblastos pulmonares de hamsters (V79). O ensaio MTT foi aplicado para medir a citotoxicidade dos materiais. Os resultados mostraram que em ambos tipos celulares os materiais se mostraram com os mesmos níveis de toxicidade. Os autores concluíram que os resultados não se alteraram em função da utilização de células de cultura primária ou de linhagem permanente, embora estas devam ter preferência, pois são facilmente mantidas em cultura, além de não serem influenciadas pela variabilidade de doadores, como ocorre com células de cultura primária.

A definição de uma escala de citotoxicidade foi estabelecida por HUANG; CHANG³⁸, em 2002. Os autores investigaram a ação de cinco adesivos dentinários diferentes em células pulpares humanas provenientes de cultura primária. As células foram expostas aos extratos das substâncias-teste e o ensaio do MTT foi aplicado para a definição da escala. Os autores concluíram que as escalas de citotoxicidade de produtos utilizados para um mesmo fim ajudam a indicar que os agentes que mostraram toxicidade severa devem ser substituídos por aqueles menos tóxicos.

A citotoxicidade de líquidos e pós de três cimentos ionômeros de vidro e de duas resinas acrílicas foram estudada por LÖNROTH; DAHL⁵⁵ em 2003. Os autores obtiveram extratos destas substâncias de acordo com normas preconizadas pela ISO 10993-12, expondo células da linhagem L-929 a diluições destes extratos. Os ensaios MTT e VN foram utilizados para a definição de uma escala de citotoxicidade. A análise dos resultados possibilitou aos autores concluir que a metodologia aplicada é simples, oferece quantidade significativa de informações, pode ser executada de maneira controlada, é facilmente reproduzível e facilita a elucidação dos mecanismos de toxicidade celular, salientando que é difícil extrapolar os resultados obtidos *in vitro* para condições de uso *in vivo* dos materiais avaliados.

ZHANG; TORABINEJAD; LI¹⁰⁵, em 2003, compararam a citotoxicidade do MTAD, solução irrigadora de canais radiculares, com outros produtos de uso clínico semelhante. Para esta finalidade, definiram uma escala de citotoxicidade baseada em ensaios com cultura de fibroblastos L929. A dosagem inibitória de 50% das células foi estabelecida para a realização do ensaio MTT e o ranqueamento das substâncias avaliadas.

2.3 Reação do tecido pulpar às substâncias utilizadas em pulpotomias de dentes decíduos.

2.3.1 Formocresol

LOOS; HAN⁵³, em 1971, realizaram estudo imunohistoquímico do efeito de várias concentrações de formocresol sobre células de tecido conectivo. Através da definição do perfil histoquímico da atividade de algumas enzimas, os autores notaram que os efeitos foram mais deletérios nas células expostas às maiores concentrações de formocresol, com pouca diferença entre o concentrado e o diluído na proporção 1:5 no que diz respeito à capacidade de fixação tecidual. Concluíram que o formocresol diluído possuía a mesma capacidade fixadora e, ao mesmo tempo, proporcionava ao tecido pulpar maior capacidade de recuperação de seus efeitos deletérios.

A resposta pulpar de dentes decíduos de cães submetidos a pulpotomias com formocresol concentrado e diluído foi estudada por

ABDO¹, em 1975. Após os períodos de 15 e 30 dias, foi realizado estudo histológico que mostrou que ambas concentrações do formocresol induzem alterações pulpare destrutivas irreversíveis, bem como alterações inflamatórias nos tecidos periapicais e folículos dentários dos dentes sucessores. Os danos teciduais causados pela diluição do formocresol foram mais atenuados que os provocados pela formulação original, em ambos tempos experimentais.

A ativação de processo inflamatório crônico por medicamentos utilizados em pulpotomias de dentes decíduos foi objeto de estudo de SEOW; THONG⁸⁶, em 1986. De acordo com estes autores, leucócitos polimorfonucleares (PMNs) quando ativados, liberam enzimas lisossômicas e radicais livres que desencadeiam processo inflamatório crônico. Utilizando metodologia *in vitro* foram analisados os efeitos do formocresol, glutaraldeído, eugenol e hidróxido de cálcio na aderência dos PMNs. Os resultados mostraram que o formocresol, o eugenol e o hidróxido de cálcio causaram lise de PMNs em altas concentrações a aderência de PMNs em baixas concentrações. O glutaraldeído não provocou quaisquer destes efeitos. Estes resultados comprovaram que o formocresol, hidróxido de

cálcio e eugenol podem causar danos ao tecido pulpar remanescente quando utilizados em pulpotomias de dentes decíduos.

Um estudo, comparando a citotoxicidade do formocresol concentrado, formaldeído a 19%, cresol a 35% e glutaraldeído a 2,5%, foi realizado por JENG; FEIGAL; MESSER⁴³, em 1987. Os autores utilizaram cultura de fibroblastos de pulpa de dentes humanos. Foram obtidos extratos das substâncias testadas e realizadas diluições seriadas dos mesmos. O dano celular provocado pelos extratos das substâncias-teste foi avaliado através do teste colorimétrico do vermelho neutro, que verifica integridade dos lisossomos da membrana celular. Os resultados mostraram que o glutaraldeído a 2,5% foi considerado de 15 a 20 vezes menos citotóxico que o formocresol concentrado e o formaldeído a 19%. O cresol a 35% mostrou citotoxicidade 40 vezes menor que o formocresol concentrado e o formaldeído a 19%. Baseados nestes resultados, os autores puderam concluir que o componente do formocresol concentrado que é responsável por sua alta toxicidade é o formaldeído a 19%.

A citotoxicidade do glutaraldeído a 2,5% e do formaldeído a 19% foi avaliada por SUN; FEIGAL; MESSER⁹⁶, em 1990. Os autores verificaram se o

tempo de exposição destas substâncias às células utilizadas no ensaio *in vitro* estava relacionado com o aumento da toxicidade. Cultura de fibroblastos da linhagem WI-38 foi utilizada para testar as substâncias. Extratos dos agentes utilizados foram colocados em contato com a cultura celular por períodos de quatro, oito e 24 horas. Após cada período, foi realizado teste de MTT, que determinou os efeitos causados pelos extratos na atividade da enzima desidrogenase mitocondrial nas células utilizadas no estudo. Os resultados mostraram que os efeitos citotóxicos do formaldeído a 19% não foram dependentes do tempo de exposição. Ao contrário, para o glutaraldeído alcançar seu máximo efeito citotóxico, foi necessário um período de tempo maior que o do formaldeído a 19%.

A análise histopatológica da reação pulpar de dentes de rato submetidos à pulpotomia com formocresol concentrado (formulação de Buckley) e o diluído a 1:5 foi realizada por DUARTE¹⁶, em 1991. Vinte e um ratos da linhagem Wistar foram divididos em sete grupos experimentais e seus dentes foram preparados para análise histopatológica após períodos de 24 horas, 3, 7, 14, 30, 60 e 90 dias. Os resultados mostraram que ambas substâncias provocaram alterações caracterizadas por ligeira

inflamação e necrose pulpar. O tecido pulpar dos dentes submetidos ao tratamento com formocresol diluído apresentou menor extensão de necrose em todos tempos experimentais.

HILL et al.³⁵, em 1991, compararam os efeitos citotóxicos do formocresol concentrado e do glutaraldeído a 2,5%, em cultura primária de fibroblastos de polpa humana e em células da linhagem HeLa. Após 24 e 48 horas a proliferação celular estava inibida, e as análises em microscopia óptica mostraram alterações morfológicas características de morte celular. As células expostas ao glutaraldeído estavam completamente fixadas após os períodos experimentais, mas permaneciam morfolologicamente normais.

O potencial carcinogênico da solução de glutaraldeído a 2,5% e do formocresol diluído a 1:5 em modelo experimental com hamsters, foi avaliada por SALLES⁸⁰, em 1993. O autor aplicou estes medicamentos sobre o tecido mucoso dos animais e realizou acompanhamento macroscópico e microscópico das alterações teciduais. Os achados mostraram que estas substâncias induzem alterações epiteliais hiperplásicas, sem estimular o aparecimento de papilomas e carcinomas.

Os efeitos do formocresol diluído a 1:5 e do glutaraldeído a 2,5% em tecido pulpar e periapical de ratos foi estudado microscopicamente por PEREIRA⁶⁵, em 1993. O tecido pulpar e dos dentes submetidos à pulpotomia com formocresol e que utilizaram pasta com formocresol diluído na sua composição apresentaram resposta inflamatória degenerativa. O tecido periapical destes dentes apresentou hiperemia. Os dentes submetidos ao tratamento com glutaraldeído a 2,5% apresentaram menor agressividade aos tecidos.

SANTOS⁸¹, em 1998, analisando a citotoxicidade *in vitro* de fármacos empregados na terapia endodôntica de dentes decíduos, comparou a ação da pasta de Guedes-Pinto (à base de iodofórmio, paramono-clorofenol canforado e corticosteróide), formocresol concentrado, glutaraldeído e do ácido fosfórico sobre as linhagens de fibroblastos NIH-3T3 e FP-1. Na análise da viabilidade celular em curto prazo (por períodos de 5, 10 e 15 horas) e em longo prazo (até 7 dias), a contagem celular pelo método da exclusão com o corante “Trypan Blue” mostrou que o glutaraldeído e o formocresol concentrado inviabilizaram os fibroblastos imediatamente após

o contato inicial com os mesmos. Estes resultados mostraram, de acordo com a autora, o nível de citotoxicidade severo destes medicamentos.

2.3.2 Hidróxido de cálcio

RUSSO; OLIVEIRA⁷⁸, em 1975, compararam a reação pulpar de dentes decíduos de cães submetidos à pulpotomia com formocresol e hidróxido de cálcio. Foram utilizados doze cães e os cortes histológicos dos dentes foram avaliados em microscopia óptica, após período experimental de 30 dias. Foi notada presença de inflamação em dentes submetidos a ambos tipos de tratamento. No grupo tratado com hidróxido de cálcio, a ocorrência de tecido pulpar sadio foi mais freqüente em polpas sem processo inflamatório prévio à pulpotomia. Em dentes submetidos ao formocresol foi notada a ausência de tecido pulpar sadio e alterações patológicas mais intensas em polpas inflamadas.

ÖZATA et al.⁶⁴, em 1987, compararam a resposta histológica da polpa de dentes decíduos de 14 ovelhas submetidas a pulpotomias com formocresol concentrado e hidróxido de cálcio. Os animais foram sacrificados por períodos que variaram de um a 180 dias. A análise

histológica mostrou que todos dentes submetidos ao tratamento com hidróxido de cálcio apresentaram tecido pulpar saudável. Doze dos quatorze dentes que receberam formocresol também mostraram resposta histológica positiva.

A análise histopatológica da polpa de dentes decíduos de cães submetidos à pulpotomia com pasta de hidróxido de cálcio P.A. e pasta de óxido de zinco e eugenol contendo formocresol e glutaraldeído, foi realizada por GIRO; BAUSELLS; PERCINOTO²⁸ em 1991. Após períodos experimentais de 15, 30 e 45 dias, a análise histopatológica mostrou que as substâncias testadas foram consideradas agressivas aos tecidos pulpares, provocando necrose de coagulação, inflamação aguda e crônica de intensidades variadas e áreas de reabsorção interna e externa. A pasta de hidróxido de cálcio P.A. foi o único material a induzir formação de barreira mineralizada, embora incompleta e irregular.

FADAVI; ANDERSON¹⁹, em 1996, compararam a resposta pulpar em dentes decíduos de macacos submetidos à pulpotomia, ao hidróxido de cálcio, óxido de zinco e eugenol reforçado (IRM®) e ao osso seco congelado (FDB). Após tempos experimentais de seis semanas e de seis

meses, os dentes extraídos foram preparados para análise histopatológica, que mostrou vitalidade pulpar em 100% dos dentes tratados com FDB e em 75% dos tratados com hidróxido de cálcio após seis semanas. Pontes de dentina estavam presentes em 87,5% dos tratados com FDB e em 75% com hidróxido de cálcio. Após seis meses, 100% dos dentes submetidos ao hidróxido de cálcio apresentavam indícios de necrose pulpar, pontes de dentina eram visíveis em 50% e, em 100%, foi notada presença de infiltrado inflamatório moderado e severo.

A resposta pulpar de dentes decíduos de cães a um sistema adesivo e a um cimento de hidróxido de cálcio foi avaliada por RIBEIRO et al.⁷⁵, em 2000. Após tempos experimentais de sete, 30 e 45 dias os dentes foram preparados para análise histopatológica. Os resultados mostraram presença e persistência de resposta inflamatória de diferentes intensidades nos três períodos experimentais. Não houve diferença estatisticamente significativa na variação da resposta inflamatória para os materiais avaliados.

2.3.3 Sulfato férrico

O sulfato férrico a 15,5%, solução hemostática, foi primeiramente proposto como medicamento para pulpotomias em dentes decíduos por LANDAU; JOHNSEN⁵¹, em 1988. Estes autores, utilizando dentes de primatas, encontraram achados histológicos favoráveis quando compararam cortes de polpas submetidas à pulpotomia com esta solução com outros de polpas em que realizada pulpotomia com hidróxido de cálcio. Em relação ao mecanismo de ação da solução, os autores relataram que existe uma reação do sangue com os íons sulfato e ferro em meio ácido, o que causa aglutinação das proteínas sangüíneas. Estas proteínas aglutinadas ocluem os orifícios dos capilares sangüíneos.

COTES et al.¹², em 1997, compararam a resposta histológica da polpa de dentes de ratos, submetidas a pulpotomias com formocresol diluído e solução de sulfato férrico. Os autores analisaram o grau de inflamação e a extensão do dano pulpar, semanalmente, durante quatro semanas. Dentre os achados, notou-se presença de dano pulpar com sinais de necrose, com ambos materiais, e grau de inflamação menor em polpas

expostas ao formocresol diluído. Os pesquisadores ratificaram a necessidade de mais estudos com a solução de sulfato férrico para embasar seu uso clínico.

Objetivando estabelecer o efeito da solução de sulfato férrico a 15,5% e do formocresol diluído na proporção de 1:5 na polpa de primatas, FUKS et al.²⁴, em 1997b, analisaram cortes histológicos da polpa de uma amostra de 79 dentes decíduos de primatas alocados aleatoriamente nos grupos avaliados. Os resultados mostraram presença de infiltrado inflamatório em 42% dos dentes tratados com solução de sulfato férrico a 15,5%, e em 52% dos tratados com formocresol diluído. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre estes dois grupos. Os autores concluíram que, na amostra avaliada, os materiais estudados mostraram comportamento semelhante quanto à presença de infiltrado inflamatório em tecido pulpar.

2.3.4 Agregado trióxido mineral (MTA)

A resposta celular ao agregado trióxido mineral (MTA) foi avaliada por KOH et al.⁴⁸ em 1998. Para isto avaliou a citomorfologia de osteoblastos da linhagem MG-63 expostos ao MTA e ao óxido de zinco e eugenol reforçado (IRM®) em uma placa de Petri, pelo período de um a sete dias. A citomorfologia foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostraram que as células que ficaram em contato com o MTA por até três dias permaneceram saudáveis. Em contraste, as células expostas ao IRM® apareceram com morfologia alterada. Os autores concluíram que o MTA oferece um substrato biologicamente compatível para células ósseas.

OSORIO et al.⁶³, em 1998, compararam a toxicidade do MTA e de outros materiais de aplicação endodôntica. Utilizando os protocolos 10993-5⁴¹ e 10993-12⁴² da ISO e o ensaio do MTT, expuseram extratos das substâncias a fibroblastos da linhagem L-929. Dentre todos agentes

avaliados, o experimento do MTT mostrou que o MTA foi o que menos inibiu a viabilidade celular.

A citotoxicidade do MTA foi estudada *in vitro* por KAISER; JOHNSON; TIPTON⁴⁴, em 2000. Para isto, os autores utilizaram células de ligamento periodontal humano. O MTA foi comparado com outros agentes utilizados em obturação retrógrada, o amálgama de prata e o “Super-EBA®”. Após a exposição das células aos extratos dos materiais por 24 horas, foi realizado teste de viabilidade celular denominado MTT, que verifica a atividade da enzima desidrogenase mitocondrial em nível celular. A análise dos resultados mostrou que, dentre os materiais avaliados, o MTA é o menos citotóxico, o que comprova a viabilidade de sua utilização para esta finalidade.

HOLLAND et al.³⁶, em 2001, compararam o MTA com o cimento tipo “Portland” e, para isto, realizaram pulpotomia em dezoito dentes de cães, perfazendo um total de 26 raízes, sendo que treze recobertas com MTA e as restantes com o cimento “Portland”. Os cães foram sacrificados sessenta dias após os tratamentos. A análise histológica dos dentes foi realizada visando verificar presença de ponte de dentina, infiltrado inflamatório, de

células gigantes e microorganismos. Os resultados mostraram que no grupo do MTA, dez casos revelaram polpa vital e com presença de ponte dentinária sem infiltrado inflamatório. O grupo tratado com cimento tipo “Portland” mostrou dez casos de formação de ponte dentinária sem infiltrado inflamatório. Em ambos grupos foram notadas formações de novas camadas odontoblásticas abaixo da ponte de dentina. A análise estatística não mostrou diferenças entre os resultados dos grupos avaliados. Os autores relataram que a única diferença na composição entre os materiais avaliados foi a presença de óxido de bismuto no MTA, e que esta substância não interfere no resultado histológico final.

Uma pesquisa com o objetivo de avaliar a resposta histopatológica da polpa de dentes de cães expostas mecanicamente e capeadas com adesivo autocondicionante, MTA e pasta de hidróxido de cálcio, foi realizada por QUEIROZ⁶⁹ em 2002. A amostra constou de 26 pré-molares de três cães e o período experimental foi de 90 dias. Os resultados mostraram necrose pulpar em 100% dos dentes tratados com adesivo autocondicionante, além de ausência de camada odontoblástica, infiltrado inflamatório misto e presença de reabsorções cementária e óssea. Nos dentes tratados com

MTA e pasta de hidróxido de cálcio notou-se presença de ponte dentinária em 100% dos casos, integridade de camada odontoblástica, ausência de infiltrado inflamatório e nenhum sinal de reabsorção de tecidos mineralizados. A análise dos resultados mostrou que o MTA e o hidróxido de cálcio são materiais que permitem reparo de tecido pulpar exposto, ao contrário de sistemas adesivos.

DOMINGUEZ et al.¹⁵, em 2003, utilizaram modelo experimental em cães para comparar o comportamento histológico de polpa de dentes submetidos à pulpotomia e capeamento pulpar direto. A amostra constou de quinze cães e os períodos experimentais foram de 50 dias para seis animais e 150 dias para os restantes. Dentes não submetidos aos tratamentos serviram de controle. Os materiais utilizados foram o MTA, hidróxido de cálcio e agente adesivo dentinário. Os autores, através de microscopia eletrônica de varredura, ainda verificaram se houve a formação de ponte dentinária ou não. Os resultados mostraram que, ao comparar o infiltrado inflamatório dos dentes tratados com MTA com o dos dentes não tratados, não houve diferença de significância estatística quaisquer dos períodos experimentais. Baseados nos resultados, os autores concluíram que o MTA

ofereceu respostas pulparez melhores, tanto no capeamento pulpar direto quanto nas pulpotomias, do que o hidróxido de cálcio e o agente adesivo dentinário.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho propõe-se a estabelecer uma escala de citotoxicidade entre substâncias utilizadas em pulpotomias de dentes decíduos.

Foram utilizadas as condições descritas nas normas ISO 10993-5⁴¹ e 10993-12⁴² células da linhagem Balb-c 3T3 para atingir os objetivos específicos descritos a seguir:

- Definir a TD₅₀ para formocresol, formocresol diluído, sulfato férrico, hidróxido de cálcio e agregado trióxido mineral.

- Avaliar a função mitocondrial (redução do MTT) na presença dos extratos na TD₅₀.

- Avaliar a integridade da membrana celular (captação do Vermelho Neutro) na presença dos extratos na TD₅₀.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Soluções

- Meio de cultura – DMEM (Gibco LabTM, Life Technologies Inc.; Grand Island, NY, EUA).

Meio de Eagle modificado por Dulbecco, que corresponde a 13,45 g/L do pó comercial (Gibco LabTM, Life Technologies Inc.; Grand Island, NY, EUA), acrescido de 1,2 g/L de NaHCO₃, 0,025 g/mL de ampicilina e 0,1 g/mL de estreptomicina.

- Tampão Fosfato Salino – PBS-A:

O tampão fosfato salino (pH 7,4) foi constituído por: 137 mM de cloreto de sódio, 2,68 mM de cloreto de potássio, 1,47 mM de fosfato diácido de

potássio e 8,1 mM de fosfato monoácido de sódio. Para as soluções de PBS-Ca⁺² foi acrescentado 1,0 mM de cloreto de cálcio.

- Tripsina:

Solução de tripsina 0,1% (m/v) foi preparada em PBS-A contendo 1 mM de EDTA.

- MTT:

Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difeniltetrazólio (Sigma Chemical CoTM; St. Louis, MO, EUA).

- VN:

Vermelho neutro (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenazina) (Sigma Chemical CoTM; St. Louis, MO, EUA).

As soluções de PBS-Ca²⁺, DMEM e tripsina foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore ($\varnothing = 0,22 \mu\text{m}$). O tampão PBS-A foi esterilizado em autoclave a 120°C por 20 min. Todas as soluções foram

armazenadas entre 4°C e 5°C, com exceção da tripsina que foi estocada a 20°C negativos.

4.1.2 Substâncias-teste

Foram utilizadas para os experimentos as seguintes substâncias-teste:

- Formocresol concentrado (FC, Fórmula e Ação Farmácia Magistral Ltda®; São Paulo-SP): manipulado de acordo com a formulação de Buckley, ou seja, 19% formaldeído, 35% cresol, 18,7% glicerina e 31% de água.
- Formocresol diluído a 20% (FCD, Fórmula e Ação Farmácia Magistral Ltda®; São Paulo-SP): formocresol na formulação de Buckley diluído a 20% em água destilada.
- Agregado trióxido mineral (MTA, Angelus® - Odonto-Lógica Ind. de Produtos Odontológicos Ltda; Londrina-PR): 80% de cimento “Portland” e 20% de óxido de bismuto.

- Hidróxido de cálcio P.A. (HC, Fórmula e Ação Farmácia Magistral Ltda®; São Paulo-SP): $\text{Ca}(\text{OH})_2$ em pó. Farmacopéia Brasileira IV, 1998.
- Solução de sulfato férrico a 15,5% (SF, Fórmula e Ação Farmácia Magistral Ltda®; São Paulo-SP): $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ em solução a 15,5%.

4.2 Método

4.2.1 Cultura de células

Fibroblastos de ratos da linhagem Balb-c 3T3, (ATCC CCL 163, clone A31, American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA), foram cultivados em frasco de cultura com Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo NaHCO_3 (1,2 g/L), ampicilina (0,025 g/L), estreptomicina (0,1 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Cultilab®; Campinas-SP). Os frascos foram mantidos em estufa (REVCO™, EUA) a uma temperatura de 37°C, em atmosfera de 5% de CO_2 .

4.2.2 Obtenção dos extratos

Os extratos puros das substâncias-teste foram obtidos em meio de cultura DMEM livre de SFB. Para o MTA e o HC foi utilizada a proporção preconizada pelas normas da ISO 10993-12⁴², ou seja, 0,1g/mL (material/meio de cultura DMEM sem SFB). Para as soluções de SF, FC e FCD foi arbitrada a proporção de 0,1 mL/mL (material/meio de cultura DMEM sem SFB). Os extratos permaneceram durante 24h, em estufa 37° C, conforme preconizado pelas normas ISO 10993-12⁴².

A partir dos extratos puros foram realizadas diluições destes em meio de cultura DMEM adicionado de 10% SFB. Para os extratos puros do MTA, HC e SF foram realizadas diluições na proporção de 1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000. Para o FC e FCD foram realizadas diluições dos extratos puros na proporção de 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 e 1/100000.

4.2.3 Ensaios de citotoxicidade

Todos os ensaios de citotoxicidade foram realizados em placas de cultura de 24 poços (modelo 92024, TPP™, Suíça), semeando-se 3×10^4 células em estágio de semiconfluência (Figura 1) por poço (17.143 células/cm²), em 1,0 mL de DMEM adicionado de 10% SFB. Foi utilizada uma placa de 24 poços para cada substância avaliada.

FIGURA 1 - Fibroblastos Balb-c 3T3 em estágio de semi-confluência (10X)

Após um período de incubação de 48h, o meio foi removido e as células foram tratadas com as diferentes diluições dos extratos, adicionadas de 10% SFB. Nos poços correspondentes ao grupo controle, o meio (DMEM+10% SFB) foi trocado. Após 24 h, o meio de cultura contendo o extrato foi removido e as células lavadas com PBS-A. Procedeu-se, então, aos ensaios de citotoxicidade definidos a seguir. Para cada substância-teste foram realizados dois experimentos independentes e o tratamento com cada diluição dos extratos foi feito em triplicata. Foram utilizadas como controle negativo células não expostas aos extratos.

4.2.4 Definição da TD₅₀ para cada substância-teste

Para cada substância-teste foi definida a TD₅₀ (mg/mL), dose que causa a morte de 50% das células em relação ao controle negativo. Esta

dose define o ranqueamento das substâncias-teste em termos de citotoxicidade, ou seja, quanto maior a TD_{50} , menor o efeito citotóxico.

Após 24 horas de exposição às diferentes diluições dos extratos das substâncias-teste, as células foram coletadas e armazenadas em microtubos tipo “*Eppendorf*” para posterior contagem. Previamente à coleta, foi colocado um volume de 100 μL de formol 37% filtrado por microtubo, para fixação das células.

As células de cada poço foram removidas, utilizando-se 200 μL de tripsina 0,25%. Para a inativação da tripsina foram adicionados 400 μL de DMEM +10% SFB, sendo este volume transferido para um microtubo tipo “*Eppendorf*”. Em seguida, o poço foi lavado com 300 μL de PBS-A para auxiliar na remoção de células remanescentes, sendo transferidos para o respectivo microtubo contendo, cada um, o volume final de 1000 μL .

As células foram contadas em microscópio óptico (LEICATM, modelo DMIL, Leica Microsystems Wetzler GmbH), utilizando a câmara de “*Neubauer*”. O número de células correspondente a cada concentração do

extrato foi calculado em relação ao grupo controle negativo (células não expostas aos extratos), considerado como 100%.

Após a contagem do número relativo de células para cada uma das diluições, foi elaborado um gráfico, utilizando-se o software “Origin 6.0”™, mostrando o número relativo de células comparadas com o grupo controle negativo (células não tratadas), para cada uma das diluições previamente definidas. A TD₅₀ (mg/mL) foi obtida graficamente pela extrapolação dos pontos, identificando-se a concentração da droga que resultaria em 50% de células.

4.2.5 Medida da redução do MTT

Este ensaio quantitativo *in vitro*, desenvolvido por MOSSMANN⁵⁷ (1983) e reavaliado e otimizado por HANSEN; NIELSEN; BERG³³ (1989), para estimativa de proliferação e sobrevivência celular, é definido na literatura como apropriado para estimativa de citotoxicidade (SCHWEIKL; SCHMALZ⁸⁵, 1996) e baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase,

uma enzima do Ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, capaz de converter o sal de tetrazolium (dimetiltiazol difenil tetrazolium, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor azul escura. Esta capacidade, que somente células vivas possuem, indica atividade mitocondrial e conseqüente viabilidade celular.

Este ensaio é uma forma precisa de ranquear os materiais avaliados em ordem decrescente de citotoxicidade. Este ensaio foi realizado semeando-se 3×10^4 células em estágio de semiconfluência por poço ($17.143 \text{ células/cm}^2$), em 1,0 mL de DMEM adicionado de 10% SFB, Após incubação por 48 horas em estufa a 37°C , com atmosfera de 5% de CO_2 , as células foram expostas às respectivas TD_{50} de cada uma das substâncias-teste por um período de 24 horas. O meio então foi removido e as células foram expostas a uma solução de 0,5mg de MTT/ mL de DMEM sem SFB, por 4h, a 37°C . Foram realizadas a remoção desta solução e a extração do pigmento insolúvel reduzido intracelularmente com 1 mL de etanol/poço, sob agitação suave por 10 minutos em mesa agitadora. Em seguida, fez-se a leitura no espectrofotômetro (Ultrospec 2000TM - GE

Healthcare™) da solução extraída dos poços, no comprimento de onda de 570 nm.

As substâncias-teste foram ranqueadas de acordo com a porcentagem de função mitocondrial, considerando-se o grupo controle negativo (células não expostas ao extrato) como 100%. Quanto maior a função mitocondrial, maior a viabilidade celular e menor a citotoxicidade.

Foram realizados dois ensaios independentes e em triplicata para cada dose TD₅₀ de cada uma das substâncias-teste.

4.2.6 Medida da captação de vermelho neutro (VN)

Este ensaio se baseia na aplicação de um corante (vermelho neutro) que penetra a membrana celular de células vivas, difundindo-se e concentrando-se nos lisossomos. Este ensaio permite a distinção entre células viáveis e as danificadas ou mortas, baseado na capacidade que os lisossomos têm de absorver o corante. A determinação, através de leitura em espectrofotômetro, da quantidade de vermelho neutro retido nas células expostas aos extratos das substâncias-teste, comparado com grupo

controle negativo, possibilita a definição da toxicidade (BABICH; BORENFREUND⁴, 1990).

Este ensaio foi realizado semeando-se 3×10^4 células em estágio de semiconfluência por poço ($17.143 \text{ células/cm}^2$), em 1,0 ml de DMEM adicionado de 10% SFB. Após incubação por 48 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 , as células foram expostas às TD_{50} de cada uma das substâncias-teste por um período de 24 horas. O meio então foi removido e as células tratadas com DMEM contendo o VN ($50 \mu\text{g/ml}$). As placas foram incubadas por 3h, 37°C , para permitir a captação do corante pelos lisossomos das células viáveis. As células foram lavadas com PBS- Ca^{+2} e o corante foi extraído em uma solução de etanol 50% e ácido acético 1%, colocando-se 1,0 mL dessa solução em cada poço. Em seguida, fez-se a leitura em espectrofotômetro (UltrospecTM 2000 – GE HealthcareTM) da solução extraída dos poços no comprimento de onda de 540 nm.

As substâncias-teste foram ranqueadas de acordo com a porcentagem de corante vermelho neutro retido nas células, considerando-se o grupo controle negativo (células não expostas ao extrato) como 100%.

Quanto maior a quantidade de corante, maior a viabilidade celular e menor a citotoxicidade.

4.2.7 Determinação da citotoxicidade

Conforme as normas 10993-5⁴¹ da ISO preconizam, a avaliação qualitativa da citotoxicidade em ensaios *in vitro* pode ser realizada através da classificação das substâncias-teste avaliadas em não-citotóxicas, levemente citotóxicas, moderadamente citotóxicas e severamente citotóxicas, de acordo com os resultados dos ensaios realizados.

SLETTEN; DAHL⁸⁸ (1999) e LÖNROTH; DAHL^{54,55} (2001, 2003) definiram para cada uma das classificações citadas, faixas de porcentagem representativas da viabilidade celular. Para esta pesquisa foram definidas faixas, que estão resumidas na Tabela 1.

TABELA 1 - Classificação do grau de citotoxicidade de materiais de acordo com a porcentagem de viabilidade celular residual relativa (comparado ao grupo controle negativo)

Citotoxicidade	Viabilidade celular (%)
Não citotóxico	>90
Levemente	80 a 89
Moderadamente	50 a 79
Severamente	0 a 49

4.2.8 Análise estatística

Todos os dados apresentados foram expressos em média \pm desvio padrão. Os níveis de significância entre as amostras foram analisados segundo Análise de variância (ANOVA), através do software InstatTM. Nos casos onde o desvio padrão das amostras seja significativamente diferente

(Teste de Bartlett), os dados foram transformados no valor recíproco ($y=1/y$), sendo considerada significativa a diferença entre o grupo controle e o grupo tratado se $p<0,05$ (Teste de Comparações Múltiplas de Dunnett).

5 RESULTADOS

A Figura 2 demonstra o efeito das diferentes diluições dos extratos das substâncias-teste no número de fibroblastos da linhagem Balb-c 3T3 após exposição pelo período de 24 horas. A barra horizontal identifica a concentração da solução-teste que causa a morte de 50% das células, definindo a TD_{50} (mg/mL) para a exposição durante o período de 24 horas em relação ao grupo controle.

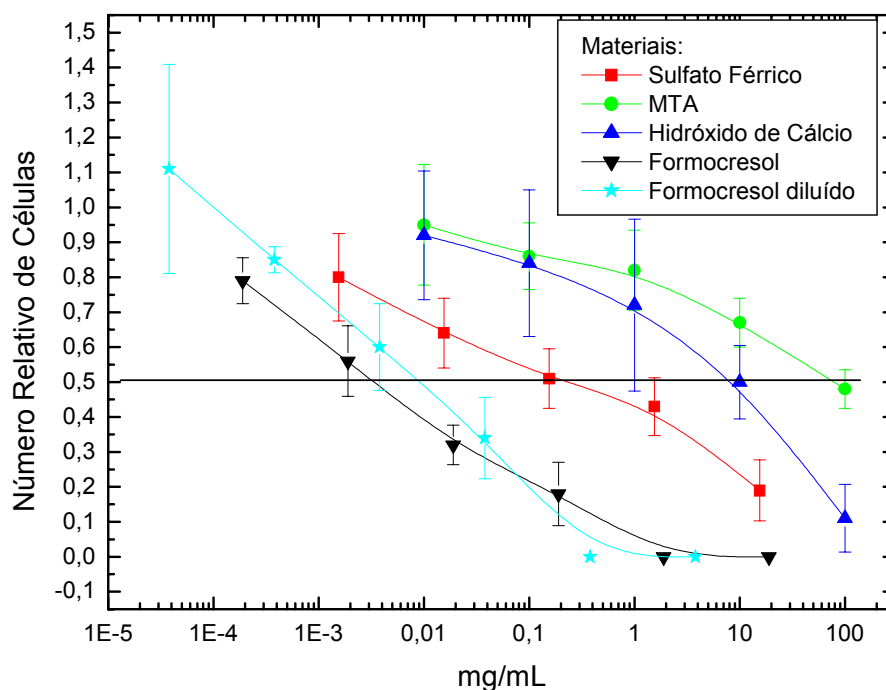


FIGURA 2 - Efeito das diferentes diluições dos extratos das substâncias-teste (legenda) no número de fibroblastos da linhagem Balb-c 3T3 após exposição pelo período de 24 horas

A partir da Figura 2 foi possível determinar, por extrapolação dos pontos, a concentração da substância-teste responsável pela morte de 50% das células (Tabela 2).

TABELA 2 - Valor da dose TD₅₀ (mg/mL) para cada as substâncias-teste avaliadas

Substância -teste	TD ₅₀ (mg/mL)
MTA	79,72
HC	7,74
SF	0,24
FCD	8,29 x 10 ⁻³
FC	3,07 x 10 ⁻³

Estes resultados (Tabela 2) mostram que podemos ordenar a citotoxicidade da seguinte maneira: FC > FCD > SF > HC > MTA.

É interessante notar que o HC mostrou ser aproximadamente dez vezes mais citotóxico que o MTA, com o valor da TD₅₀ de, respectivamente, 79,72 e 7,74 mg/mL. Este valor é ainda maior para o FCD, que se mostrou

aproximadamente 27 vezes mais citotóxico que o SF, 2,7 vezes menos que o FC. Entretanto, quando comparamos o FCD e FC com o MTA, estes são, respectivamente, cerca de 10.000 e 26.000 vezes mais citotóxicos.

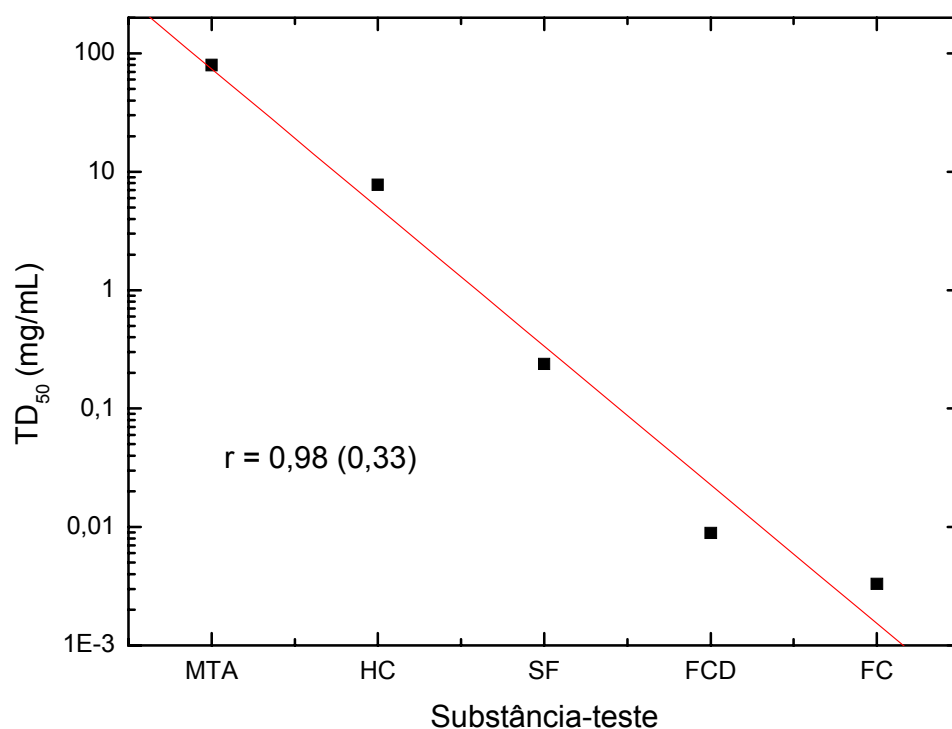


FIGURA 3 - Substâncias-teste em função de sua citotoxicidade, baseada no valor da dose TD_{50}

A partir da determinação da TD_{50} , procurou-se entender os mecanismos celulares da toxicidade dos compostos avaliados. A análise inicial baseou-se no uso do VN e do MTT, os quais indicam, respectivamente, a integridade da membrana celular e a atividade mitocondrial (Figura 4).

A Figura 4 mostra o resultado destes ensaios. Foram avaliados o MTA, HC, SF, FCD e o FC. As barras representam a média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. As linhas verticais sobre as barras representam o desvio-padrão e as horizontais a equivalência estatística.

O ensaio de captação do vermelho neutro demonstrou que o MTA, HC e o SF não afetaram as células quando comparados com o grupo controle. Por outro lado, o FC e o FCD proporcionaram a redução da captação do vermelho neutro em cerca de 65% em relação ao controle ($p < 0,05$).

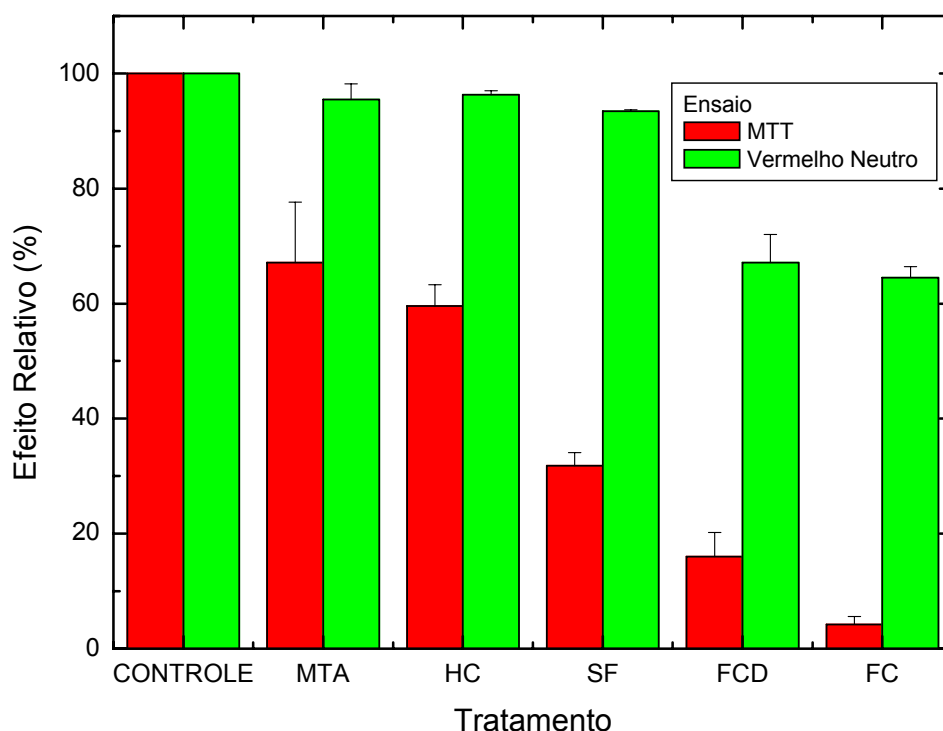


FIGURA 4 - Efeitos citotóxicos das diferentes substâncias-teste na TD_{50} avaliadas utilizando os ensaios do MTT (barras vermelhas) e Vermelho Neutro (barras verdes), representados como porcentagem do grupo controle, considerado 100%

A ISO 10993-12 propõe a classificação dos compostos em 4 categorias quanto à sua toxicidade, a saber: não citotóxico, levemente citotóxico, moderadamente citotóxico e severamente citotóxico. Porém, não se estabelecem os limites para esta classificação. LONROTH; DAHL, em 2001, estudando a toxicidade do cimento ionômero de vidro, e em 2003 ao avaliarem a citotoxicidade de componentes de materiais dentários, utilizaram estes parâmetros para definir a escala de toxicidade definindo faixas precisas para cada categoria.

A Tabela 3 resume esta classificação, de acordo com os parâmetros discutidos acima e compara o grau de toxicidade dos materiais testados de acordo com os ensaios realizados. É possível perceber que a contagem de células permite a estratificação dos resultados de forma mais detalhada, com menor superposição dentre os materiais testados, ou seja, permite melhor discriminação do efeito dos materiais.

Tabela 3 - Classificação do MTA, HC, SF, FCD e FC quanto à citotoxicidade determinada através da contagem de células, redução do MTT e incorporação do VN

Citotoxicidade	Viabilidade celular (% em relação ao controle)			
	Faixa	Contagem de células ¹	MTT ²	VN ²
Não-citotóxico	> 90%	MTA	-	MTA, HC, SF
Levemente cit.	80 a 89	HC	-	-
Moderadamente	50 a 79	SF	MTA, HC	FCD, FC
Severamente	< 50	FCD, FC	SF, FCD, FC	-

¹ Tomando-se como referência a concentração do composto que permitiu a viabilidade de 90% das células na presença do extrato do MTA, determinou-se o percentual de células sobreviventes para as outras substâncias.

² Dados obtidos da Figura 3 para os compostos na TD₅₀.

6 DISCUSSÃO

O ranqueamento dos medicamentos mais utilizados clinicamente para a pulpotomia de dentes decíduos em função de sua citotoxicidade *in vitro*, poderá ajudar a posicionar qualquer substância com possível indicação para este tipo de procedimento no que diz respeito à toxicidade, comparando-o com as substâncias mais empregadas atualmente ou outras que possam ser desenvolvidas.

A definição, para cada uma das substâncias-teste avaliadas, da concentração tóxica para 50% das células quando comparadas ao grupo controle negativo (Figura 2), TD_{50} , é um dos indicadores de citotoxicidade mais confiáveis, pois esta concentração tóxica está em um ponto intermediário entre os primeiros sinais de toxicidade e a ausência de metabolismo ou morte celular (HANKS et al.³⁰, 1991; BARILE⁵, 1994; HANKS; WATAHA; SUN³², 1996; GEURTSEN et al.²⁷, 1998).

Nesta pesquisa, além de servir como parâmetro para definição de uma escala de citotoxicidade, esta concentração também foi aplicada para cada uma das substâncias-teste, como referência para realização dos ensaios MTT e VN.

HANKS et al.³¹, em 1993, e KINOMOTO; CARNES; EBISU⁴⁷, em 2001, para estimar a citotoxicidade de agentes clareadores dentários; RATANASATHIEN et al.⁷², em 1995, ao estabelecer um ranqueamento para adesivos dentinários; GEURTSEN et al.²⁷, em 1998, para ordenar monômeros de resinas compostas, e ZHANG; TORABINEJAD; LI¹⁰⁵, em 2003, para avaliar a toxicidade *in vitro* de um irrigante de canais radiculares, também definiram a TD₅₀ como parâmetro para os ensaios colorimétricos do MTT e VN.

Os valores da TD₅₀ mostrados na Tabela 2 indicam que, dentre as substâncias avaliadas, o FC mostrou ser o mais citotóxico, com valor de TD₅₀ cerca de 26.000 vezes menor que o encontrado para o MTA, considerado o agente menos citotóxico, e cerca de 2.500 vezes menor que o HC, 65 que o SF e 2,7 que o FCD.

Baseado no cálculo da TD_{50} , um ranqueamento entre todas substâncias-teste pode ser estabelecido desta forma: FC>FCD>SF>HC>MTA.

O formocresol concentrado ou de Buckley já foi comparado com outros agentes utilizados em pulpotomias de dentes decíduos, apresentando sempre maior grau de reação tóxica, como em pesquisas de SEOW; THONG⁸⁶ (1986), que o considerou maior causador de processo inflamatório degenerativo pulpar que o hidróxido de cálcio, eugenol e glutaraldeído a 2,5%.

SALLES⁸⁰, em 1993, e PEREIRA⁶⁵, no mesmo ano, compararam os efeitos do formocresol com os provocados pelo glutaraldeído a 2,5% em hamsters e ratos, respectivamente. Ambos concluíram ser o formocresol a substância responsável pelo maior dano tecidual.

COTES et al.¹², em 1997, compararam a reação do tecido pulpar ao formocresol com a solução de sulfato férrico a 15,5% em dentes de rato, mostrando também presença de processo inflamatório em virtude da presença do formocresol em contato direto com tecido pulpar.

A literatura científica mostra-se extremamente escassa no que diz respeito a publicações em que as normas da ISO 10993-5⁴¹ e 10993-12⁴² para ensaios de toxicidade *in vitro* de substâncias utilizadas em endodontia odontopediátrica fossem aplicadas. Os trabalhos cuja abordagem metodológica mais se assemelham ao desta tese são os de JENG; FEIGAL; MESSER⁴³ (1987), SUN; FEIGAL; MESSER⁹⁶ (1990) e de SANTOS⁸¹ (1998).

A pesquisa de JENG; FEIGAL; MESSER⁴³, em 1987, estudou efeitos tóxicos de diversas diluições do formocresol concentrado e de seus componentes, o formaldeído a 19% e o cresol a 35%, em cultura primária de fibroblastos de polpa humanos. Não foram definidas a TD₅₀ tampouco foram levados em consideração os ensaios MTT e VN. Dentre as conclusões desta pesquisa, a principal é que o formaldeído a 19% e o formocresol concentrado apresentam efeito tóxico semelhante, muito maior que o do cresol a 35%. Este fato caracteriza o formaldeído a 19% como o componente responsável pela quase totalidade da citotoxicidade do formocresol concentrado. Esta conclusão serviu de base para o cálculo da TD₅₀ do formocresol nesta tese.

A metodologia empregada por SUN; FEIGAL; MESSER⁹⁶, em 1990, lançou mão de várias diluições de formocresol que entraram em contato com linhagem de fibroblastos humanos WI-38 por períodos experimentais que variaram de 4 a 24 horas. A citotoxicidade em função da concentração e tempo de exposição foi medida com o ensaio MTT. Foi comprovado que a toxicidade máxima do formocresol manifesta-se em pequenas concentrações e num espaço de tempo mínimo. Este é o único relato na literatura que emprega este experimento com o formocresol.

A toxicidade *in vitro* de substâncias utilizadas em terapias endodônticas de dentes decíduos, em linhagens de células imortalizadas NIH-3T3, foi pesquisada por SANTOS⁸¹, em 1998, que avaliou o formocresol, glutaraldeído e a pasta composta por um corticosteróide, iodofórmio e paramonoclorofenol canforado. Mesmo com metodologia diferente da aplicada neste trabalho, sem levar em consideração a TD₅₀, a obtenção de extratos das substâncias-teste e ensaios colorimétricos, a autora concluiu que o formocresol apresentou maior citotoxicidade que as outras substâncias estudadas.

A Tabela 2 mostra ainda que o MTA foi considerado, dentre os materiais avaliados, o menos citotóxico. Este baixo grau de citotoxicidade do MTA está amparado em trabalho de OSORIO et al.⁶³, de 1998 que, utilizando protocolos da ISO para ensaios de citotoxicidade, tal qual nesta pesquisa, compararam este material com outros de indicação endodôntica, concluindo que o MTA não exerce efeito tóxico em fibroblastos da linhagem L-929.

KOH et al.⁴⁸, em 1998, avaliaram a resposta celular do MTA em osteoblastos da linhagem MG-63, utilizando microscopia eletrônica de varredura, relatando presença de células saudáveis, mesmo após três dias de contato com o material.

A padronização da ISO foi utilizada por KEISER; JOHNSON; TIPTON⁴⁴, em 2000, para estudar a citotoxicidade do MTA em células do ligamento periodontal humano, comparando-o com outros materiais para obturação retrógrada de canais de dentes permanentes.

QUEIROZ⁶⁹, em 2002 e DOMINGUEZ et al.¹⁵, em 2003, avaliaram o MTA como material para aplicação direta em tecido pulpar de cães. Ambas pesquisas mostraram que polpas dentárias em contato com este material

são induzidas a formar tecido dentinário adjacente e não apresentam alterações inflamatórias degenerativas.

O HC foi considerado, dentro das condições experimentais, o segundo material menos citotóxico, apresentando, de acordo com os valores de TD_{50} , citotoxicidade aproximadamente 2.500 vezes menor que o do FC e 933 que o FCD.

A menor citotoxicidade do HC, quando comparada à do FC, também foi comprovada pelos trabalhos de RUSSO; OLIVEIRA⁷⁸, em 1975, de GIRO; BAUSELLS; PERCINOTO²⁸, em 1991 e de QUEIROZ⁶⁹, em 2002, que avaliaram histologicamente a polpa de dentes decíduos e permanentes de cães, expostas a estes dois materiais. ÖZATA et al.⁶⁴, em 1987, utilizando modelo experimental em dentes decíduos de ovelhas, não encontraram diferenças significantes entre o HC e o FC, em achados histológicos. Este fato pode ter ocorrido em virtude das características da polpa de dentes de ovelhas, que apresentam potencial de recuperação significativamente maior que outros animais mais comumente utilizados em pesquisas deste tipo.

A citotoxicidade do HC, como componente de cimentos obturadores, foi avaliada dentro dos padrões preconizados pelas normas da ISO, por

BELTES et al.⁶, em 1995 e por HUANG et al.³⁷, em 2002. Mesmo mostrando leve grau de toxicidade celular é indicado pelos autores para uso clínico.

O valor da TD₅₀ do SF o posicionou, dentro da escala de citotoxicidade, como sendo cerca de 332 e 32 vezes mais tóxico que o MTA e o HC, respectivamente. Quando comparado ao FC e FCD, mostrou-se cerca de 78 e 29 vezes menos citotóxico, respectivamente.

O SF, ao contrário do MTA e do HC, não induz regeneração do tecido pulpar adjacente quando aplicado em contato direto com a polpa. Esta substância age por hemostasia, não estimulando formação de ponte dentinária (LANDAU; JOHNSEN⁵¹, 1988; COTES et al.¹², 1997).

Pesquisas histológicas comparando efeito do SF e do FC na polpa de ratos (LANDAU; JOHNSEN⁵¹, 1988; COTES et al.¹², 1997; FUKS et al.²⁴, 1997b), evidenciaram que os mecanismos de toxicidade do SF não diferem daqueles encontrados com FC e FCD, com presença marcante de células características de infiltrado inflamatório.

A menor citotoxicidade apresentada pelo FCD em relação ao FC nesta pesquisa corrobora os trabalhos de LOOS; HAN⁵³, em 1971, através de análise imunohistoquímica; por ABDO¹, em 1975, em estudo histológico em

dentes de cães; por FUKS; BIMSTEIN; BRUCHIM²⁵ (1983), em estudo radiográfico e histológico em dentes de primatas; e DUARTE¹⁶, em 1991, que avaliou histologicamente dentes de ratos submetidos à pulpotomia com estes materiais, sendo que o FCD, mesmo com resposta histológica sem diferenças significantes em relação ao FC, apresentou menor extensão de necrose nos tempos experimentais estudados.

Um dos principais aspectos positivos da realização dos ensaios de citotoxicidade *in vitro* seguindo as padronizações das normas 10993-5⁴¹ e 10993-12⁴² da ISO, é a garantia de reprodutibilidade (WATAHA; CRAIG; HANKS¹⁰¹, 1992; SCHMALZ⁸², 1994; HANKS; WATAHA; SUN³², 1996).

A Figura 3 mostra as substâncias-teste avaliadas em função de suas respectivas TD₅₀. O coeficiente de correlação, gerado pela regressão linear dos pontos, próximo ao valor 1 ($r = 0,98$, $sd = 0,33$) e a linearidade da curva, favorecem a reprodutibilidade destes ensaios e futuras comparações de outras substâncias potencialmente viáveis para utilização em pulpotomias de dentes decíduos, com as analisadas nesta pesquisa, se todas condições experimentais forem seguidas.

As linhagens de células imortalizadas utilizadas nestes ensaios possuem as mesmas características e garantem a reprodutibilidade destes experimentos em qualquer laboratório que possua infraestrutura para realização deste tipo de pesquisa (WATAHA; CRAIG; HANKS¹⁰¹, 1992; HUANG; CHANG³⁸, 2002; LÖNROTH; DAHL⁵⁵, 2003; SOUZA COSTA et al.⁹¹, 2003).

O entendimento dos mecanismos celulares de toxicidade das substâncias-teste analisadas foi o principal objetivo dos ensaios colorimétricos de redução do MTT e captação do corante vermelho neutro. Através destes experimentos, considerados apropriados para estimativa de citotoxicidade, é possível identificar se o comprometimento da viabilidade celular foi em função da redução da atividade mitocondrial (MTT) ou alteração da integridade da membrana celular (VN) (MOSSMANN⁵⁷, 1983; HANSEN; NIELSEN; BERG³³, 1989; BABICH; BORENFREUND⁴, 1990; SCHWEIKL; SCHMALZ⁸⁵, 1996).

A Figura 4 mostra os resultados das leituras de absorvância para os ensaios MTT e VN. A captação do corante VN demonstrou que os extratos do MTA, HC e SF não afetaram as células, quando comparados com o grupo

controle, ao contrário do FC e FCD, que diminuíram a viabilidade celular em cerca de 65% em relação ao controle.

Por outro lado, a leitura dos resultados do ensaio MTT evidenciou uma relação linear entre o efeito relativo das TD_{50} das substâncias-teste e a redução do MTT. Esta linearidade foi bastante semelhante à apresentada na Figura 2, que mostrou a relação entre as substâncias-teste e a citotoxicidade das mesmas, baseada na TD_{50} .

Pode-se então inferir que as substâncias utilizadas em pulpotomias de dentes decíduos afetam mais fortemente a atividade mitocondrial do que a integridade de membrana celular. O ensaio MTT mostrou-se melhor correlacionado com os resultados obtidos pela contagem celular, devendo ser considerado um marcador mais acurado que o VN para a avaliação da citotoxicidade *in vitro* destas substâncias.

De acordo com os resultados deste ensaio, a toxicidade dos materiais pode ser estabelecida da seguinte forma: FC>FCD>SF>HC>MTA, sendo todos significativamente diferentes do que o controle ($p<0,01$).

Esta diferença de sensibilidade entre os ensaios colorimétricos vai ao encontro dos achados de SCHWEIKL; SCHMALZ⁸⁵, em 1996, de SLETTEN; DAHL⁸⁸, em 1999, de LÖNROTH; DAHL^{54,55} em 2001 e 2003.

SCHWEIKL; SCHMALZ⁸⁵, em 1996, compararam a especificidade dos ensaios MTT, VN e de proliferação celular para o estabelecimento da citotoxicidade de cimentos ionômeros de vidro, fosfato de zinco e um compósito. De acordo com estes autores, a diferença de sensibilidade entre os experimentos colorimétricos pode variar, dependendo do material que está sendo avaliado.

SLETTEN; DAHL⁸⁸, em 1999, e LÖNROTH; DAHL em 2001⁵⁴ e 2003⁵⁵ também encontraram graus de sensibilidade diferentes entre os ensaios MTT e VN. Estes autores concordaram que o mesmo material, nas mesmas condições experimentais, pode ser enquadrado em diferentes graus de citotoxicidade em cada um destes experimentos. Estes trabalhos levantam a possibilidade de substâncias em estado líquido afetarem o metabolismo celular mais acentuadamente em nível mitocondrial.

Um achado interessante na pesquisa de LÖNROTH; DAHL⁵⁵ (2003), que avaliou a citotoxicidade de diferentes líquidos e pós, componentes de

materiais dentários, e que pode ser extrapolado para esta tese é o de que os ensaios MTT e VN exibiram padrões semelhantes quando os pós foram analisados. Os líquidos, entretanto, pareceram afetar mais as células em nível mitocondrial.

Esta tese apresentou resultados semelhantes, pois o FC e o FCD (líquidos) inibiram a viabilidade celular, quando comparado ao grupo controle, em uma faixa maior que 70%, sendo considerados severamente citotóxicos, conforme mostra a Tabela 2. Entretanto, no ensaio de captação do VN, estas substâncias afetaram a viabilidade celular numa faixa entre 11% e 40%, sendo enquadrados, conforme a Tabela 2, como levemente citotóxicos. O SF, também um líquido, apresentou comportamento diferente nos dois ensaios, sendo classificado como levemente citotóxico no MTT e não-citotóxico no VN.

O MTA e o HC, substâncias em pó, se posicionaram em uma mesma faixa em ambos ensaios, sendo classificados como não-citotóxicos.

As substâncias líquidas, pela facilidade de dissolução em meio aquoso durante a obtenção dos extratos, parecem ser mais sensíveis aos testes de citotoxicidade que as sólidas e as que se apresentam em pó.

Este fato realça a importância da realização da definição da TD₅₀ e de ambos testes colorimétricos, tal como feito nesta tese. A análise de todas variáveis envolvidas nos experimentos fornece mais dados para o entendimento dos mecanismos de citotoxicidade dos materiais estudados.

Uma questão que deve ser abordada com cautela diz respeito à interpretação dos resultados dos testes *in vitro* de citotoxicidade. O que se deve ter em mente ao analisar as respostas dos experimentos *in vitro* é que o seu objetivo principal é demonstrar o grau de toxicidade de uma substância e não a reação tecidual que esta provoca. Um material que apresenta resultados insatisfatórios em testes *in vitro* de toxicidade pode ou não ser descartado. Se forem seguidos princípios para a limitação deste problema, este material pode vir a ter aplicabilidade clínica (SPANGBERG⁹³, 1978; MURPHY⁵⁹, 1988; BARILE⁵, 1994).

O ensaio de citotoxicidade com cultura primária de células ou linhagens imortalizadas não substitui os ensaios *in vivo*, mas certamente diminui sobremaneira a necessidade de experimentos em animais e humanos, que serão realizados somente quando os resultados dos testes in

vitro apontarem indícios de biocompatibilidade (MURPHY⁵⁹, 1988; SCHMALZ; BROWNE⁸³, 1995).

Os resultados obtidos pelo FC, FCD e SF nesta pesquisa, mostrando serem estes materiais severamente e moderadamente citotóxicos, devem servir de base para a busca por alternativas mais biocompatíveis para realização de pulpotomias em dentes decíduos. Esta busca passa, certamente, pela realização de ensaios *in vitro* de citotoxicidade.

Mesmo com resultados extremamente insatisfatórios em ensaios *in vitro* e *in vivo* realizados com o FC e FCD (SEOW; THONG⁸⁶, 1986; HILL et al.³⁵, 1991), estas substâncias continuam sendo amplamente utilizadas como primeira opção clínica para tratamento de dentes decíduos com comprometimento pulpar reversível (PRIMOSCH; GLOMB; JERREL⁶⁶, 1997; HUNTER; HUNTER³⁹, 2003).

O SF, mesmo com resultados insatisfatórios no experimento MTT e em análises histológicas em animais, é outro agente que vem sendo apresentado como alternativa clínica para o formocresol em pulpotomias de dentes decíduos (IBRICELIC; AL-JAME⁴⁰, 2000; BURNETT; WALKER⁸, 2002).

O HC, mesmo apresentando respostas satisfatórias em testes clínicos e radiográficos (RUSSO; OLIVEIRA⁷⁸, 1975; SCHRÖDER⁸⁴, 1978; FADAVI; ANDERSON¹⁹, 1996; GRUYTHUYSEN; WEERHEIJM²⁹, 1997) e nos ensaios de toxicidade *in vitro*, apresenta limitações quando utilizado em pulpotomias de dentes decíduos, pois existe a possibilidade de estimulação do aparecimento de reabsorções internas, problema este característico de todas substâncias que atuam fixando ou promovendo necrose superficial, deixando o remanescente da polpa radicular vital (GIRO; BAUSELLS; PERCINOTO, 1991; RIBEIRO et al., 2000).

Dentro da filosofia de mudança de enfoque na escolha de medicamentos para aplicação direta sobre tecido pulpar, o MTA é o que vem despontando como o mais promissor, tanto para dentes permanentes quanto para decíduos, pois apresenta resultados satisfatórios em ensaios *in vitro* de citotoxicidade (KOH et al.⁴⁸, 1998; KAISER; JOHNSON; TIPTON⁴⁴, 2000) e em estudos clínico-radiográficos em animais e humanos (EIDELMAN; HOLAN; FUKS¹⁷, 2001; HOLLAND et al.³⁶, 2001; QUEIROZ⁶⁹, 2002; DOMINGUEZ et al.¹⁵, 2003; RITWIK et al.⁷⁴, 2003; SHAYEGAN; PETEIN; ABBEELE⁸⁷, 2003).

Estes ensaios são considerados experimentos valiosos para a compreensão do comportamento biológico dos materiais e apresentam custo financeiro menor para investigar substâncias em desenvolvimento, reduzindo a probabilidade de surpresas quando testes clínicos em humanos e animais forem realizados. Somente aqueles materiais que provarem ter biocompatibilidade em níveis aceitáveis em uma bateria de ensaios *in vitro* e *in vivo* devem ser considerados para utilização clínica (HANKS; WATAHA; SUN³², 1996; SCHWEIKL; SCHMALZ⁸⁵, 1996; HAUMAN; LOVE³⁹, 2003).

É importante ratificar a importância de conhecer as limitações de um ensaio *in vitro* de toxicidade para interpretar seus resultados de maneira adequada. Ao avaliar a aplicabilidade clínica de um material, outros aspectos devem ser levados em consideração, tais como a sua indicação clínica e os resultados de experimentos em animais, *in situ* e *in vivo*.

Deve-se ter cuidado ao extrapolar os resultados apresentados por esta pesquisa para a rotina clínica do odontopediatra, pois o formocresol concentrado e o diluído, mesmo comprovadamente citotóxicos, são utilizados há muito tempo e, se o procedimento for realizado com base em

diagnóstico adequado e seguindo protocolo rigoroso, apresenta resultados clínicos satisfatórios.

A solução de sulfato férrico, mesmo com bons resultados clínicos e radiográficos, não vai ao encontro do que se busca de um material que possa ser considerado ideal para a pulpotomia de dentes decíduos, pois apresenta baixa biocompatibilidade.

O hidróxido de cálcio, mesmo com baixo grau de toxicidade celular e sua conhecida capacidade de induzir ponte dentinária, tem aplicação restrita para pulpotomias de dentes decíduos, em virtude de seu potencial para estimular o surgimento de reabsorções radiculares.

Em um momento em que princípios biológicos devem guiar a escolha por medicamentos que entrem em contato com tecido pulpar, o formocresol, tanto em sua forma concentrada como na diluída, deve ser deixado de lado.

A substância que tem mostrado ser promissora, apresentando características positivas de biocompatibilidade em todos ensaios *in vitro* aos quais é submetida, é o agregado trióxido mineral, ou MTA.

Os resultados desta pesquisa comprovaram esta característica, porém poucos estudos com acompanhamento clínico e radiográfico a longo prazo em dentes decíduos foram publicados (CUISIA et al.¹³, 2001; EIDELMAN; HOLAN; FUKS¹⁷, 2001; RITWIK et al.⁷⁴, 2003; SHAYEGAN et al.⁸⁷, 2003). Estudos preliminares mostram que o MTA é um material promissor para substituição do formocresol.

Deve-se realçar então, a necessidade de realização e publicação de mais pesquisas clínicas longitudinais com o MTA, metodologicamente adequadas para dentes decíduos, confirmando o rumo que a ciência está apontando e, deste modo, embasar cientificamente este material para uso clínico em odontopediatria.

7 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo permitem as seguintes conclusões:

- A determinação da TD_{50} , utilizando a metodologia proposta pelas normas da ISO 10993-12⁴² e 10993-5⁴¹, permitiu o estabelecimento de uma escala de potência adequada para a ordenação de compostos terapêuticos em função de sua toxicidade.
- A citotoxicidade das substâncias-teste pode ser ordenada em função do cálculo da TD_{50} , da maior para a menor: formocresol (FC), formocresol diluído (FCD), sulfato férrico (SF), hidróxido de cálcio P.A. (HC) e agregado trióxido mineral (MTA).
- O ensaio de redução do MTT mostrou ser mais adequado que o VN para definição da toxicidade *in vitro* para materiais utilizados em pulpotomias de dentes decíduos.
- Os materiais testados têm sua toxicidade mediada principalmente por alterações da função mitocondrial das células.

- As substâncias-teste avaliadas nesta pesquisa pouco interferem na integridade de membrana celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

1. ABDO, R.C.C. Efeitos do formocresol sobre o tecidos pulpar e periapical em dentes decíduos de cão (Estudo histológico). Bauru, 1976. 60 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

2. ALACAM, A. Long-term effects of primary teeth pulpotomies with formocresol, glutaraldehyde-calcium hydroxide and glutaraldehyde-zinc oxide eugenol on succedaneous teeth. J Pedod, v. 13, n. 4, p. 307-13, Summer 1989.

3. AVRAM, D.C.; PULVER, F. Pulpotomy medicaments for vital primary teeth. Survey to determine use and attitudes in pediatric dental practice and in dental schools throughout the world. J Dent Child, v. 56, n. 6, p. 426-34, Nov.-Dec. 1989.

¹ Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no documento "Referências Bibliográficas: exemplos", emanada pelo Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

4. BABICH, H.; BORENFREUND, E. Applications of the neutral red cytotoxicity assay to *in vitro* toxicology. *ATLA*, v. 18, p. 129-44, 1990.

5. BARILE, F.A. Mechanisms of cytotoxicology. In: _____ . Introduction to *in vitro* cytotoxicology. 1. ed. Boca Raton, CRC Press, 1994. Cap. 2, p. 27-57.

6. BELTES, P. et al. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers. *Endod Dent Traumat*, v. 11, n. 5, p. 245-9, Oct. 1995.

7. BOUILLAGUET, S. et al. Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials. *J Oral Rehab*, v. 29, n. 1, p. 7-13, Jan. 2002.

8. BURNETT, S.; WALKER, J. Comparison of ferric sulfate, formocresol, and a combination of ferric sulfate/formocresol in primary tooth vital pulpotomies: A retrospective radiographic survey. *J Dent Child*, v. 69, n. 1, p. 44-8, Jan/Apr. 2002.
9. CAMPS, J. et al. Efficiency and cytotoxicity of resin-based desensitizing agents. *Amer J Dent*, v. 15, n. 5, p. 300-4, Oct. 2002.
10. CASAS, M.J. et al. Long-term outcomes of primary molar ferric sulfate pulpotomy and root canal therapy. *Pediat Dent*, v. 26, n. 1, p. 44-8, Jan./Feb. 2004.
11. CHEN, R.S. et al. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent*, v. 31, n. 3, p. 223-9, Mar. 2003.
12. COTES, O. et al. Pulpal tissue reaction to formocresol vs. ferric sulfate in pulpotomized rat teeth. *J Clin Pediat Dent*, v. 21, n. 3, p. 247-53, Spring 1997.

13. CUISIA, Z.V. et al. A study of mineral trioxide aggregate pulpotomies in primary molars. *Pediat Dent*, v. 23, n. 2, p. 168, Mar./Apr. 2001.
14. DEAN, J.A. et al. Comparison of electrosurgical and formocresol pulpotomy procedures in children. *Int J Paed Dent*, v. 12, n. 3, p. 177-82, May 2002.
15. DOMINGUEZ, M.S. et al. Histological and scanning electron microscopy assessment of various endodontic vital pulp-therapy materials. *J Endod*, v. 29, n. 5, p. 324-33, May 2003.
16. DUARTE, D.A. Estudo histopatológico de dentes de ratos, submetidos a polpotomia, e tratados com formocresol de buckley e formocresol diluído a 1:5. São Paulo, 1991. 65 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

17. EIDELMAN, E.; HOLAN, G.; FUKS, A.B. Mineral trioxide aggregate vs. formocresol in pulpotomized primary molars: a preliminary report. *Pediat Dent*, v. 23, n. 1, p. 15-8, Jan./Feb. 2001.
18. ERSEV, H. et al. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells in vitro. *J Endod*, v. 25, n. 5, p. 359-63, May 1999.
19. FADAVI, S.; ANDERSON, A.W. A comparison of the pulpal response to freeze-dried bone, calcium hydroxide and zinc-oxide eugenol in primary teeth in two cynomolgus monkeys. *Pediat Dent*, v. 18, n. 1, p. 52-6, Jan./Feb. 1996.
20. FEI, A.Y.; UDIN, R.D.; JOHNSON, R. A clinical study of ferric sulfate as a pulpotomy agent in primary teeth. *Pediat Dent*, v. 13, n. 6, p. 327-32, Nov./Dec. 1991.

21. FEIGAL, R.J. et al. Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. *Arch Oral Biol*, v. 30, n. 8, p. 609-13, Aug. 1985.
22. FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells*. 4th ed. New York, Wiley-Liss, 2000.
23. FUKS, A.B. et al. Ferric sulfate versus dilute formocresol in pulpotomized primary molars: long-term follow-up. *Pediat Dent*, v. 19, n. 5, p. 327-30, Jul./Aug. 1997.
24. FUKS, A.B. et al. Pulp response to ferric sulfate, diluted formocresol and IRM in pulpotomized primary baboon teeth. *J Dent Child*, v. 64, n. 4, p. 254-9, Jul./Aug. 1997.
25. FUKS, A.B.; BIMSTEIN, E.; BRUCHIM, A. Radiographic and histologic evaluation of the effect of two concentrations of formocresol on

pulpotomized primary and young permanent teeth in monkeys.

Pediat Dent, v. 5, n. 1, p. 9-13, Mar. 1983

26. GEURTSSEN, W. et al. Cytotoxicity of 35 monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. J Biomed Mater Res, v. 41, n. 3, p. 474-80, Sep. 5/1998.
27. GEURTSSEN, W. et al. Cytotoxicity of four root canal sealers in permanent 3T3 cells and primary human periodontal ligament fibroblast cultures. Oral Surg, v. 85, n. 5, p. 592-7, May 1998.
28. GIRO, E.M.A.; BAUSELLS, H.I.I.; PERCINOTO, C. Estudo histopatológico em molares decíduos de cães submetidos à pulpotomia e proteção com hidróxido de cálcio, formocresol e glutaraldeído. Rev Odont UNESP, v. 20, n. 1, p. 51-62, 1991.

29. GRUYTHUYSEN, R.J.M.; WEERHEIJM, K.L. Calcium hydroxide pulpotomy with a light-cured cavity sealing material after two years. *J Dent Child*, v. 64, n. 4, p. 251-3, Jul./Aug. 1997.
30. HANKS, C.T. et al. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts. *J Dent Res*, v. 70, n. 11, p. 1450-5, Nov. 1991.
31. HANKS, C.T. et al. Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, *in vitro*. *J Dent Res*, v. 72, n. 5, p. 931-8, May 1993.
32. HANKS, C.T.; WATAHA, J.C.; SUN, Z. *In vitro* models of biocompatibility: a review. *Dent Mat*, v. 12, n. 3, p. 186-93, May 1996.
33. HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, v. 119, p. 203-10, 1989.

34. HAUMAN, C.H.J.; LOVE, R.M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal filling materials. *Int Endod J*, v. 36, n. 3, p. 147-60, Mar. 2003.
35. HILL, S.D. et al. Comparison of antimicrobial and cytotoxic effects of glutaraldehyde and formocresol. *Oral Surg*, v. 71, n. 1, p. 89-95, Jan. 1991.
36. HOLLAND, R. et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J*, v. 12, n. 2, p. 109-13, 2001.
37. HUANG, F.M. et al. 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*, v. 35, n. 2, p. 153-8, Feb. 2002.

38. HUANG, F.M.; CHANG, Y.C. Cytotoxicity of dentine-bonding agents on human pulp cells *in vitro*. *Int Endod J*, v. 35, n. 11, p. 905-9, Nov. 2002.
39. HUNTER, M.L.; HUNTER, B. Vital pulpotomy in the primary dentition: attitudes and practices of specialists in paediatric dentistry practicing in the United Kingdom. *Int J Paed Dent*, v. 13, n. 4, p. 246-50, Jul. 2003.
40. IBRICELIC, H.; AL-JAME, Q. Ferric sulfate as pulpotomy agent in primary teeth: twenty-month clinical follow-up. *J Clin Pediat Dent*, v. 24, n. 4, p. 269-72, Summer 2000.
41. INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices - part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva, International Organization for Standardization, 1996.

42. INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-12. Biological evaluation of medical devices - part 12: Sample preparation and reference materials. Geneva, International Organization for Standardization, 1996.
43. JENG, H.W.; FEIGAL, R.J.; MESSER, H.H. Comparison of the cytotoxicity of formocresol, formaldehyde, cresol, and glutaraldehyde using human pulp fibroblast cultures. *Pediat Dent*, v. 9, n. 4, p. 295-9, Dec. 1987.
44. KEISER, K.; JOHNSON, C.C.; TIPTON, D.A. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* v. 26, n. 5, p. 288-91, May 2000.
45. KETLEY, C.E.; GOODMAN, J.R. Formocresol toxicity: Is there a suitable alternative for pulpotomy in primary molars? *Int J Paed Dent*, v. 1, n. 2, p. 67-72, Aug. 1991.

46. KING, S.R.A.; McWHORTER, A.G.; SUE SEALE, N. Concentration of formocresol used by pediatric dentists in primary tooth pulpotomy. *Pediat Dent*, v. 24, n. 2, p. 157-9, Mar./Apr. 2002.
47. KINOMOTO, Y.; CARNES JR., EBISU, S. Cytotoxicity of intracanal bleaching agents on periodontal ligament cells in vitro. *J Endod*, v. 27, n. 9, p. 574-7, Sep. 2001.
48. KOH, E.T. et al. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J Endod*, v. 24, n. 8, p. 543-7, Aug. 1998.
49. KOPEL, H.M. et al. The effects of glutaraldehyde on primary pulp tissue following coronal amputation: an in vivo histologic study. *J Dent Child*, v. 47, n. 6, p. 425-430, Nov./Dec. 1980.
50. KOULAOUZIDOU, E. et al. In vitro evaluation of the cytotoxicity of a bleaching agent. *Endod Dent Traumat*, v. 14, n. 1, p. 21-5, Feb. 1998.

51. LANDAU, M.J.; JOHNSEN, D.C. Pulpal response to ferric sulfate in monkeys. *J Dent Res*, v. 67, Suppl., p. 215, 1988.
52. LEWIS, B. Formaldehyde in dentistry: a review for the millennium. *J Clin Pediat Dent*, v. 22, n. 2, p. 167-77, Winter 1998.
53. LOOS, P.J.; HAN, S.S. An enzyme histochemical study of the effect of various concentrations of formocresol on connective tissues. *Oral Surg*, v. 31, n. 4, p. 571-85, Apr. 1971.
54. LÖNROTH, E.C.; DAHL, J.E. Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odont Scand*, v. 59, n. 1, p. 34-9. Feb. 2001.
55. LÖNROTH, E.C.; DAHL, J.E. Cytotoxicity of liquids and powders of chemically different dental materials evaluated using

dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. Acta Odont Scand, v. 61, n. 1, p. 52-6, Feb. 2003.

56. MacDOUGALL, M. et al. Immortalized mouse odontoblast cell line MO6-G3 application for *in vitro* biocompatibility testing. Amer J Dent, v. 11, S11-S16. 1998. Special Issue.
57. MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods, v. 65, p. 55-63, 1983.
58. MULDER, G.R.; VAN AMERONGEN, W.E.; VINGERLING, P.A. Consequences of endodontic treatment of primary teeth. Part II. A clinical investigation into the influence of formocresol pulpotomy on the permanent successor. J Dent Child, v. 54, n. 1, p. 35-9, Jan./Feb. 1987.

59. MURPHY, W.M. The testing of endodontic materials *in vitro*. Int Endod J, v. 21, n. 2, p. 170-7, Mar. 1988.
60. MYERS, D.R. et al. Tissue changes induced by the absorption of formocresol from pulpotomy sites in dogs. Pediat Dent, v. 5, n. 1, p. 5-8, Mar. 1983.
61. NALCACI, A.; OZTAN, M.D.; YILMAZ, S. Cytotoxicity of composite resins polymerized with different curing methods. Int Endod J, v. 37, n. 2, p. 151-6, Feb. 2004.
62. NUNN, J.H.; SMEATON, I.; GILROY, J. The development of formocresol as a medicament for primary molar pulpotomy procedures. J Dent Child, v. 63, n. 1, p. 51-3, Jan./Feb. 1996.
63. OSORIO, R.M. et al. Cytotoxicity of endodontic materials. J Endod, v. 24, n. 2, p. 91-6, Feb. 1998.

64. ÖZATA, F.et al. Comparison of calcium hydroxide and formocresol pulpotomies in primary teeth in lambs: preliminary study. J Endod, v. 13, n. 7, p. 328-35, July 1987.

65. PEREIRA, A.C. Avaliação microscópica dos efeitos do glutaraldeído a 2% e formocresol diluído a 1/5 sobre os tecidos pulpaes e periapicais de molares de ratos, após realização de pulpotomias. Bauru, 1993. 115 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

66. PRIMOSCH, R.E.; GLOMB, T.A.; JERREL, R.G. Primary tooth pulp therapy in predoctoral pediatric dental programs in the United States. Pediat Dent, v. 19, n. 2, p. 188-22, Mar./Apr. 1997.

67. PRUHS, R.J.; OLEN, G.A.; SHARMA, P.S. Relationship between formocresol pulpotomies on primary teeth and enamel defects on their permanent successors. J Amer Dent Ass, v. 94, n. 4, p. 698-700, Apr. 1977.

68. PUPPIN-RONTANI, R.M.; POSSOBON, R.F.; KASSAWARA, A.B.C. Estudo retrospectivo de pulpotomias realizadas com formocresol em dentes decíduos. *J Bras Odontoped Odonto Bebe*, v. 2, n. 7, p. 206-10, 1999.
69. QUEIROZ, A.M. Adesivo dentinário autocondicionante e agregado trióxido mineral (MTA): avaliação histopatológica após aplicação direta sobre tecido pulpar, em dentes de cães. Ribeirão Preto, 2002. 265 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
70. RANLY, D.M. Pulpotomy therapy in primary teeth. New modalities for old rationales. *Pediat Dent*, v. 16, n. 6, p. 403-9, Nov./Dec. 1994.
71. RAPPAPORT, H.M.; LILLIY, G.E.; KAPSIMALIS, P. Toxicity of endodontic filling materials. *Oral Surg*, v. 18, p. 785-802, 1964.

72. RATANASATHIEN, S. et al. Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res*, v. 74, n. 9, p. 1602-6, Sept. 1995.
73. REDIG, D.F. A comparison and evaluation of two formocresol pulpotomy technics utilizing "Buckley's" formocresol. *J Dent Child*, v. 35, n. 1, p. 22-9, Jan. 1968.
74. RITWIK, P. et al. MTA pulpotomies in the primary molars: results after 3 years. *Int J Paed Dent*, v. 13, Suppl. 1, p. 11, 2003.
75. RIBEIRO, R.A. et al. Resposta pulpar de dentes decíduos de cães a um sistema adesivo ou ao cimento de hidróxido de cálcio. *Pesqui Odontol Bras*, v. 14, n. 1, p. 47-52, jan./mar. 2000.

76. ROLLING, I.; POULSEN, S. Formocresol pulpotomy of primary teeth and occurrence of enamel defects on the permanent successors. *Acta Odont Scand*, v. 36, n. 4, p. 243-6, Aug. 1978.
77. RUSSO, M.C. et al. In vivo fixative effect of formocresol on pulpotomized deciduous teeth of dogs. *Oral Surg*, v. 58, n. 6, p. 706-14, Dec. 1984.
78. RUSSO, M.C.; OLIVEIRA, J.D. Tissue reaction to calcium hydroxide or formocresol after pulpotomy in sound or inflamed deciduous pulps of dogs. *Rev Fac Odont Araçatuba*, v. 4, n. 1, p. 7-13, 1975.
79. RUTHERFORD, B.; FITZGERALD, M. A new biological approach to vital pulp therapy. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 6, n. 3, p. 218-29, 1995.
80. SALLES, C.L.F. Avaliação do potencial carcinogênico do formocresol diluído a 1/5 e do glutaraldeído a 2% no modelo experimental

DMBA - induzido. Bauru, 1993. 126 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

81. SANTOS, E.M. Análise da citotoxicidade in vitro de fármacos utilizados na terapia endodôntica de dentes decíduos: estudo comparativo da ação da pasta Guedes-Pinto, formocresol, glutaraldeído e ácido fosfórico sobre cultura de fibroblastos. São Paulo, 1998. 151 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
82. SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent*, v. 22, Suppl. 2, S6-11, 1994.
83. SCHMALZ, G.; BROWNE, R.M. The biological evaluation of medical devices used in dentistry. The influence of the European Union on the preclinical screening of dental materials. *Int Dent J*, v. 45, n. 4, p. 275-8, Aug. 1995.

84. SCHRÖDER, U. A 2-year follow-up of primary molars, pulpotomized with a gentle technique and capped with calcium hydroxide. *Scand J Dent Res*, v. 86, n. 4, p. 273-8, Jul. 1978.
85. SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G. Toxicity parameters for cytotoxicity testing of dental materials in two different mammalian cell lines. *Eur J Oral Sci*, v. 104, n. 3, p. 292-9, 1996.
86. SEOW, W.K.; THONG, Y.H. Modulation of polymorphonuclear leucocyte adherence by pulpotomy medicaments: effects of formocresol, glutaraldehyde, eugenol, and calcium hydroxide. *Pediat Dent*, v. 8, n. 1, p. 16-21, Mar. 1986.
87. SHAYEGAN, A.; PETEIN, M.; ABBEELE, V. Mineral trioxide aggregate as pulpotomy and pulpectomy agent in primary teeth. *Int J Paed Dent*, v. 13, Suppl. 1, p. 13, 2003.

88. SLETTEN, G.B.; DAHL, J.E. Cytotoxic effects of extracts of compomers. *Acta Odont Scand*, v. 57, n. 6, p. 316-22. Dec. 1999.
89. SMITH, N.L.; SUE SEALE, N.; NUNN, M.E. Ferric sulfate pulpotomy in primary molars: a retrospective study. *Pediat Dent*, v. 22, n. 3, p. 192-9, May/Jun. 2000.
90. SOUZA COSTA, C.A. et al. Cytotoxic effects of current dental adhesive systems on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mat*, v. 15, n. 6, p. 434-41, Nov. 1999.
91. SOUZA COSTA, C.A. et al. In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. *Biomaterials*, v. 24, n. 21, p. 3853-8, 2003.
92. SOUZA COSTA, C.A.; EDWARDS, C.A.; HANKS, C.T. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *Amer J Dent*, v. 14, n. 1, p. 25-30, Feb. 2001.

93. SPANGBERG, L.S.W. Correlation of In vivo and In vitro screening tests.
J Endod, v. 4, n. 10, p. 296-9, Oct. 1978.

94. STRANGE, D.M. et al. Outcome of formocresol/ZOE sub-base pulpotomies utilizing alternative radiographic success criteria.
Pediat Dent, v. 23, n. 4, p. 331-6, July/Aug. 2001.

95. STROPPA, S.C. Análise microscópica da resposta do complexo dentino-pulpar em pulpotomia de dentes decíduos de cães com uso de proteína morfogenética óssea. Bauru, 2003. 141 p.
Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

96. SUN, H.W.; FEIGAL, R.J.; MESSER, H.H. Cytotoxicity of glutaraldehyde and formaldehyde in relation to time of exposure and concentration. Pediat Dent, v. 12, n. 5, p. 303-7, Sep./Oct. 1990.

97. THOMPSON, K.S. et al. Alternative method of hemorrhage control in full strength formocresol pulpotomy. *Pediat Dent*, v. 23, n. 3, p. 217-22, May/June 2001.
98. VAN AMERONGEN, W.E.; MULDER, G.R.; VINGERLING, P.A. Consequences of endodontic treatment in primary teeth. Part I: A clinical and radiographic study of the influence of formocresol pulpotomy on the life-span of primary molars. *J Dent Child*, v. 53, n. 5, p. 364-70, Sep./Oct. 1986.
99. VAN WYK, C. W.; OLIVIER, A.; MARITZ, J.S. Cultures pulp fibroblasts: are they suitable for *in vitro* cytotoxicity testing? *J Oral Path Med*, v. 30, n. 3, p. 168-77, Mar. 2001.
100. VONO, A.Z. et al. Avaliação de pulpotomias com formocresol diluído 1:5. *Rev Gaúcha Odont*, v. 39, n. 2, p. 147-50, mar./abr. 1991.

101. WATAHA, J.C.; CRAIG, R.G.; HANKS, C.T. Precision of and new methods for testing *in vitro* alloy cytotoxicity. Dent Mat, v. 8, n. 1, p. 65-71, Jan. 1992.
102. WATERHOUSE, P.J.; NUNN, J.H.; WHITWORTH, J.M. An investigation of the relative efficacy of Buckley's Formocresol and calcium hydroxide in primary molar vital pulp therapy. Brit Dent J, v. 188, n. 1, p. 32-6, Jan. 2000.
103. WILLERSHAUSEN, B. et al. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. J Endod, v. 26, n. 12, p. 703-7, Dec. 2000.
104. YESILSOY, C.; FEIGAL, R.J. Effects of endodontic materials on cell viability across standard pore size filters. J Endod, v. 11, n. 9, p. 401-7, Sep. 1985.

105. ZHANG, W.; TORABINEJAD, M.; LI, Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-Tetrazolium method. *J Endod*, v. 29, n. 10, p. 654-7, Oct. 2003.

ABSTRACT

Toxicity of primary teeth pulpotomy agents.

In vitro study on immortalized fibroblast cell line Balb-c 3T3.

The main purpose of this study was to define a rank of *In vitro* toxicity of primary teeth pulpotomy agents, based on MTT and Neutral Red colorimetric essays, and on the definition of the TD₅₀ for each substance tested. Buckley's formocresol (FC), 20% diluted formocresol (FCD), calcium hydroxide P.A. (HC), 15,5% ferric sulfate solution (SF) and mineral trioxide aggregate (MTA) were tested on Balb-c 3T3 mouse fibroblasts. The cells were seeded in 24-well culture plates at a density of $3 \cdot 10^4$ cells/well and incubated for 24 h. to allow attachment. Extracts from the substances were obtained according to ISO 10993-12 standards. After incubation at a 37°C temperature in air atmosphere of 5% of CO₂, medium was aspirated and replaced with 1,0 mL of the extracts. The plates were incubated for 24 h.

and the cytotoxicity was assessed in a spectrophotometer. The absorbance was read at 560 nm. There were two independent experiments in triplicates. Mean test absorptions were calculated and expressed as a percentage of the control cells together with standard deviations. The statistical approach was carried out with the ANOVA, Bartlett and Dunnet tests ($p < 0,05$). Based on the TD50 results, the cytotoxicity can be ranked as: FC>FCD>SF>HC>MTA. Neutral Red test results showed that cells exposed to MTA, HC and SF did not affect the cells, when compared with control group, while FC and FCD reduced cell viability in approximately 65 %, when compared with control ($p < 0,05$). The MTT assay demonstrated that the cytotoxicity of the materials can be ranked as: FC>FCD>SF>HC>MTA, with all the substances statistically significant different compared with control cells ($p < 0,01$).