

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

1002  
515.463  
Y637  
T83

***AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE  
COMPOSTOS À BASE DE AGREGADO TRIÓXIDO  
MINERAL (PRO ROOT MTA<sup>®</sup>, MTA ANGELUS<sup>®</sup> E  
CIMENTO PORTLAND)  
EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE  
*Drosophila melanogaster****

**Aluna: Renata Hinhug Vilarinho**

**SISBI/UFU**



1000215654

**UBERLÂNDIA-MG**

2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

MOA  
615.463  
1697a  
TES/MEM

***AValiação da GENOTOXICIDADE DE COMPOSTOS À  
BASE DE AGREGADO TRIÓXIDO MINERAL (PRO ROOT  
MTA<sup>®</sup>, MTA ANGELUS<sup>®</sup> E CIMENTO PORTLAND)  
EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE  
*Drosophila melanogaster****

**Aluna:** Renata Hinhug Vilarinho

**Orientador:** Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

**Co-orientador:** Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Uberlândia para obtenção do Título de Mestre em  
Odontologia (Área de concentração: Cirurgia e  
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial).

**UBERLÂNDIA-MG**

2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

***AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE  
COMPOSTOS À BASE DE AGREGADO TRIÓXIDO  
MINERAL (PRO ROOT MTA<sup>®</sup>, MTA ANGELUS<sup>®</sup> E  
CIMENTO PORTLAND) EM CÉLULAS SOMÁTICAS  
DE *Drosophila melanogaster****

**Aluna: Renata Hinhug Vilarinho**

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2004. NOTA: \_\_\_\_

---

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola (Orientador)

---

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó (co-orientador)

---

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

**UBERLÂNDIA-MG  
2004**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais e esposo, que souberam compreender as minhas ausências e me deram força para que continuasse a buscar a realização de meus objetivos.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À Deus,

Obrigada por oferecer, junto com as dificuldades, a força capaz para sobrepujá-las!

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Adriano Mota Loyola**, Departamento de Patologia - UFU, pela compreensão, amizade e dedicação no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**, do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB) da Universidade Federal de Uberlândia (MG), pelo empenho na obtenção dos recursos materiais necessários ao desenvolvimento desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Ulrich Graf**, do Institute of Animal Sciences, Swiss Federal Institute of Technology (ETH) Zürich, Schwerzenbach - Suíça, pelo fornecimento das linhagens de *Drosophila melanogaster* e apoio necessário para a realização do Teste de Mutação e Recombinação Somática.

Ao **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (MG) e da Universidade do Estado de Minas Gerais – Centro Universitário de Patos de Minas (MG), pela colaboração e desempenho deste trabalho.

Aos **colegas do Núcleo de Entomologia**, LACEN – Palmas (TO), pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos **professores e auxiliares do Curso de Pós-Graduação em Odontologia** da Universidade Federal de Uberlândia que, indiretamente, contribuíram com a minha formação.

Aos **colegas do Laboratório de Mutagênese**: MSc. Bruno Lassmar Bueno Valadares; Cristina Celi da Costa; MSc. Denise Gonçalves Pereira; Elaine Sílvia Dutra; Leila Leal da Silva Bonetti; Lidiane Gonçalves D. Diniz; Msc. Luciana Pereira Silva; Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva; Shirleny Romualdo Cardoso; MSc. Silmara de Moraes Pantaleão; MSc. Vânia Maria Sartini Dutra Pimenta; MSc. Wanderlene Blanco Nunes e

Wender Ferreira Costa, pela convivência e pelas experiências compartilhadas e lições aprendidas durante a realização deste trabalho. Foi muito gratificante conhecê-los.

À Sr<sup>a</sup> **Maria Aparecida Vilela**, servente de limpeza do Laboratório de Mutagênese do INGEB-UFU, pela paciência, carisma e dedicação constante na execução experimental deste trabalho.

Aos **colegas do Curso de Pós-Graduação em Odontologia** da Universidade Federal de Uberlândia, em especial Luiz Gonzaga Lopes Filho e Rodrigo Dirceu, pelo convívio, estímulo e pela troca de experiências.

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG) e recebeu apoio financeiro das seguintes Entidades e Instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade Federal de Uberlândia-UFU.



## LISTA DE TABELAS

**TABELA 5.1** Número de moscas e frequência de manchas observadas em descendentes MH de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico de larvas com ProRoot MTA® (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL) e uretano (10,0 mM). .....30

**TABELA 5.2** Número de moscas e frequência de manchas observadas em descendentes MH de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico de larvas com MTA Angelus® (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL) e uretano (10,0 mM). ..... 31

**TABELA 5.3** Número de moscas e frequência de manchas observadas em descendentes MH de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico de larvas com cimento Portland (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL) e uretano (10,0 mM). .....32

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** Diferentes etapas do ciclo de vida da *D. melanogaster* (Griffiths *et al.*, 2000).....9
- Figura 2.2** Esquema do cruzamento padrão (ST) ..... 12
- Figura 2.3** (A) Esquema de divisão mitótica normal. (B) Esquema de aberração cromossômica (deleção) responsável pelo aparecimento de mancha simples do tipo *mwh*, de acordo com Gusmán-Rincón & Graf (1995) (com modificações). ..... 14
- Figura 2.4** Esquemas mostrando diferentes eventos genotóxicos responsáveis pela formação de manchas simples e gêmeas de acordo com Gusmán-Rincón & Graf (1995) (com modificações). Manchas gêmeas são obtidas por recombinação proximal do marcador *flr*(A), enquanto a recombinação mais distal produz manchas simples *mwh* somente (B)..... 15
- Figura 2.5** Possíveis esquemas de tratamento de larvas provenientes dos cruzamentos ST e HB, de acordo com Graf *et al.* (1984). Exposição aguda de 2-12 horas pode ser realizada em larvas de 48hs ou 72 hs. O tratamento crônico de 48 a 96 hs pode ser realizado em larvas de 24 a 72 hs..... 17
- Figura 2.6** (A) Fotomicrografia de pêlos normais (seta). (B) Mancha simples *mwh* (seta)..... 18
- Figura 2.6** (A) Fotomicrografia de pêlos *flare* (seta). (B) Mancha gêmea *multiple wing hairs/flare* (setas)..... 19
- Figura 4.2.4.1** Mesotórax de *D. melanogaster* mostrando as regiões A-E daa superfície da asa; notificação utilizada para o registro de manchas. A leitura das asas obedece a

seqüência A-E conforme evidenciado pelas setas (Garcia-Bellido & Merriam, 1971; Graf *et al.*, 1984).....27

**Figura 5.1** Distribuição da freqüência do tamanho de manchas simples após o tratamento crônico com diferentes concentrações de ProRoot MTA® (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL) e uretano (10,0 mM). **A)** Cruzamento padrão (ST); **B)** Cruzamento de alta bioativação (HB).....33

**Figura 5.2** Distribuição da freqüência do tamanho de manchas simples após o tratamento crônico com diferentes concentrações de MTA Angelus® (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL). **A)** Cruzamento padrão (ST); **B)** Cruzamento de alta bioativação (HB). .....34

**Figura 5.3** Distribuição da freqüência do tamanho de manchas simples após o tratamento crônico com diferentes concentrações de cimento Portland (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL). **A)** Cruzamento padrão (ST); **B)** Cruzamento de alta bioativação (HB). .....35

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - por cento

**BdS** – *Beaded serrate*

**BH** – Heterozigoto balanceado

**CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**CNPq** - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

***D. melanogaster*** – *Drosophila melanogaster*

**DDT** – *dichlorodiphenyltrichloroethane* (dicloro-difenil-tricloroetano)

**DNA** - Ácido Desoxirribonucléico

**FAPEMIG** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

**FDA** – *Food and Drugs Administration*

**Flr** – *flare* (chama de fogo)

**HB** – *High Bioactivation Cross* (Cruzamento de alta capacidade de bioativação metabólica).

**IRM** – *Intermediate Restorative Material*

**LACEN** – Laboratório de Análises Clínicas e Entomológicas

**Ltda.** - Limitada

**mg** - Miligrama

**MG** – Minas Gerais

**MH** - Trans-heterozigoto marcado

**mL** - mililitro

**mM** - Milimolar

**MTA** – *Mineral Trioxide Aggregate* (Agregado Trióxido Mineral)

**Mwh** – *multiple wing hairs* (pêlos múltiplos das asas)

**°C** – Grau centígrado

**ORR** – Oregon R

**PR** – Paraná

**SLRL** – *Sex Linked Recessive Lethal* (letal recessive ligado ao sexo)

**SMART** – *Somatic Mutation And Recombination Test* (Teste de Mutação e Recombinação Somática)

**ST** - Cruzamento padrão (Standard cross)

**TM3** – *Third multiple 3*

**TO** – Tocantins

**UFU** - Universidade Federal de Uberlândia

USA – United States of America

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Considerações Gerais .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Compostos à base de agregado de trióxido mineral .....	3
2.2 Teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) em células de asas de <i>D. melanogaster</i> .....	8
3. OBJETIVOS .....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	22
4.1 Agentes químicos .....	22
4.2 Teste para detecção de mutação e recombinação somática (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART) .....	23
4.3 Linhagens estoques de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	23
4.4 Cruzamentos entre as linhagens mutantes .....	24
4.5 Preparação das asas para análise .....	26
4.6 Análise microscópica das asas .....	26
4.7 Análise estatística .....	28
5 RESULTADOS.....	30
6 DISCUSSÃO .....	38

7 CONCLUSÕES.....42

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....43

*SUMMARY*



## RESUMO

Um grande número de agentes químicos, incluindo carcinógenos e não carcinógenos tem sido testado para mutagenicidade em *Drosophila melanogaster*. O estudo da mutagenicidade é uma importante base reguladora do material odontológico empregado clinicamente e que mantém contato direto com tecidos vivos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito genotóxico de diferentes substâncias à base de agregado trióxido mineral (MTA) (ProRoot<sup>®</sup>, Angelus<sup>®</sup>) utilizadas como cimento reparador e selante de comunicações entre o interior e exterior do dente; e o cimento Portland, utilizado na construção civil. Para tanto, foi empregado o teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas de *D. melanogaster* (SMART). Foram realizados dois tipos de cruzamentos: padrão – ST (fêmeas *flr*<sup>3</sup>/*TM3*, *BdS* cruzadas com machos *mwh*) e de alta capacidade de bioativação – HB (fêmeas *ORR*; *flr*<sup>3</sup>/*TM3*, *BdS* cruzadas com machos *mwh*). De ambos cruzamentos são obtidos descendentes: heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH). Nas asas dos indivíduos MH as manchas mutantes podem ser originadas tanto por mutações, deleções e recombinações, enquanto que nos BH somente eventos mutacionais levam à formação de manchas, uma vez que todos eventos recombinacionais são eliminados. Larvas obtidas de ambos cruzamentos foram tratadas indistintamente com diferentes concentrações de substâncias à base de MTA. Como controle positivo, foi utilizado o etil carbamato (uretano) (10,0 mM) e como controle negativo, água destilada estéril. As asas dos adultos emergentes MH de ambos cruzamentos foram analisadas quanto à ocorrência de manchas mutantes *mwh* (*multiple wing hairs*) e *flr* (*flare*). A contagem das manchas foi realizada por meio de microscópio óptico de luz. A análise estatística foi realizada por meio do teste

binomial condicional e o teste  $X^2$ , com nível de significância para  $p < 0,05$ . Os resultados mostraram um aumento dose-dependente no número de manchas, com resultado positivo para manchas pequenas simples e para o total de manchas. Esses resultados nos permitem sugerir que, nas condições experimentais utilizadas, o material à base de MTA é genotóxico, apresentando, no entanto, baixo potencial mutagênico.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Considerações Gerais

Investigações científicas têm sido realizadas com objetivo de obter produtos que apresentem propriedades físico-químicas e biológicas que possam induzir cicatrização óssea ou substituir estruturas dentárias (Costa, 2001).

Na avaliação das propriedades físico-químicas de um produto são utilizados, os testes de escoamento, tempo de endurecimento, espessura do filme, estabilidade dimensional, solubilidade, desintegração, adesividade, infiltração marginal, avaliação do pH, tensão superficial, densidade, etc., além de ensaios de tração, dureza e torção (Costa, 2001).

Na avaliação das características biológicas são empregados testes de biocompatibilidade, que se dividem em três níveis: testes iniciais, testes secundários e testes de aplicação clínica. Estes testes são importantes, pois determinam a capacidade que o produto possui para exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro sem, contudo, causar danos ou prejuízos ao mesmo (Costa, 2001).

Os testes iniciais são aqueles que avaliam, de maneira preliminar, um determinado material, caracterizando seu perfil de toxicidade em um sistema biológico específico. Dentre os testes utilizados com esta finalidade estão os testes de citotoxicidade, hemólise e testes de genotoxicidade (Costa, 2001).

Os testes de genotoxicidade avaliam o dano causado ao DNA, na presença ou ausência de sistemas metabólicos de ativação. Têm por objetivo avaliar o risco potencial que os compostos químicos ou misturas complexas representam para a saúde humana, devido à sua interação com o DNA e as alterações hereditárias (mutações) que podem causar (Sanchez, 1991).

Dentre os testes utilizados com esta finalidade está o teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas de *Drosophila melanogaster* (SMART) (Graf *et al.*, 1984).

O SMART apresenta alta sensibilidade (alta probabilidade de resultados positivos verdadeiros no teste com genotóxicos) e alta especificidade (alta probabilidade de resultados negativos verdadeiros no teste com não genotóxicos) (Graf & Singer, 1992).

Compostos à base de agregado de trióxido mineral (MTA), conhecidos comercialmente por ProRoot MTA® e MTA Angelus®, estão sendo utilizados na odontologia, visando o selamento endodôntico por métodos cirúrgicos, nas obturações retrógradas e perfurações acidentalmente geradas. Nestas situações o material odontológico mantém contato direto com células com metabolismo ativo, como osteoblastos e fibroblastos, necessitando assim ser biocompatível para que não ocasionem alterações indesejáveis (Costa, 2001).

Portanto, para que esses compostos possam ser utilizados adequadamente na clínica odontológica, faz-se necessário que os mesmos sejam investigados cientificamente, partindo-se dos testes iniciais em sistemas biológicos específicos, para que depois possam ser avaliados por meio de teste secundários e de aplicação clínica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Compostos à base de agregado trióxido mineral

Canais infectados abrigam numerosas espécies de bactérias que podem agredir os tecidos periradiculares e causar desenvolvimento de lesões periapicais. A remoção destes irritantes e a obliteração total do sistema de canais radiculares em 3 dimensões são os objetivos da terapia endodôntica não cirúrgica. No entanto, devido à complexidade do sistema de canais e à incapacidade de uma limpeza completa, usando as técnicas e os instrumentos disponíveis atualmente, os canais não podem ser sempre adequadamente tratados (Torabinejad *et al.*, 1993).

Nestas circunstâncias, o retratamento é a primeira opção. Na persistência do insucesso terapêutico, a cirurgia periradicular surge como uma alternativa de tratamento, em especial quando da presença de uma patologia persistente (Torabinejad *et al.*, 1993).

A obturação retrógrada é uma das diversas modalidades cirúrgicas empregadas, visando o selamento endodôntico apical (Carvalho & Okamoto, 1987; Friedman *et al.*, 1991; Rud & Andreasen, 1972). Vários materiais têm sido investigados, na busca daquele cujas propriedades físico-químicas e biológicas sejam adequadas à sua utilização nas obturações retrógradas (Gerhards & Wagner, 1996).

A primeira função da obturação retrógrada é selar o sistema de canais. O procedimento consiste na exposição e ressecção do canal radicular apical, assim como preparo de uma cavidade classe I e seu preenchimento com o material obturador (Bernabé & Holland, 1998).

De acordo com Gerhards & Wagner (1996), as características físico-químicas e biológicas ideais necessárias para o material de obturação retrógrada são as mesmas do material obturador. Este material deve ser: de fácil manipulação, radiopaco, dimensionalmente estável, bem tolerado pelos tecidos periapicais, aderir e selar o sistema

de canais em 3 dimensões. No entanto, não deve ser: tóxico, corrosivo, eletroquimicamente ativo e absorvível; e não deve sofrer alterações físico-químicas na presença de umidade.

O Agregado Trióxido Mineral (MTA) surgiu no início dos anos 90, como um material experimental desenvolvido pelo Prof. Mahmoud Torabinejad, da Universidade de Loma Linda – Califórnia, Estados Unidos da América, com o objetivo de selar as comunicações entre o interior e exterior do dente (Lee *et al.*, 1993).

O primeiro estudo sobre o MTA, foi uma avaliação *in vitro* de sua utilização em casos de perfuração radicular lateral de molares humanos. O seu emprego foi comparado ao do cimento *Intermediate Restorative Material* (IRM) e ao do amálgama de prata. As análises realizadas com auxílio de microscópio óptico, após imersão dos espécimes em azul de metileno, por 48 horas, demonstraram que o grupo do MTA apresentava os menores índices de infiltração marginal, sendo estatisticamente superior aos demais materiais. Desta forma, este material foi indicado como material retrobturador e no selamento de perfurações intra-radulares e da furca. (Lee *et al.*, 1993).

Outro estudo, utilizando dentes humanos, comparou a habilidade seladora do MTA com a do amálgama de prata e do IRM, através da infiltração marginal do corante fluorescente Rodamina B. Do mesmo modo, o MTA apresentou melhor capacidade de selamento (Torabinejad *et al.*, 1993).

No estudo das propriedades físicas e químicas do MTA, os autores definiram a composição química, pH, radiopacidade e compararam o tempo de endurecimento, a resistência compressiva e a solubilidade deste material ao amálgama, o Super-EBA e o IRM. O pó é composto principalmente de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico e óxido de silicato, além de pequena quantidade de outros óxidos minerais e da adição de óxido bismuto, principal responsável pela radiopacidade do material. Seu pH é 10,2 após a manipulação e 12,5 após 3 horas, mantendo-se então constante. Sua desvantagem em relação aos materiais comparados é apresentar tempo de presa de 2:45h, considerado longo, além de não ser possível a obtenção de uma consistência pesada que facilite sua condensação na cavidade (Torabinejad *et al.*, 1995a).

Neste mesmo estudo, analisando-se o pó do MTA constatou-se que o cálcio e o fósforo são os íons mais presentes. Devido a estes íons também serem os principais

componentes do tecido duro dentário, sugeriu-se que o MTA poderia ser biocompatível quando em contato com células e tecidos. As análises efetuadas demonstraram que o MTA, após tomar presa, passa a ser constituído por óxido de cálcio, na forma de cristais discretos, de fosfato de cálcio, com uma estrutura amorfa e aparência granular. A composição média dos cristais é de 87% de cálcio, 2,47% de sílica e o restante de oxigênio. As áreas de estrutura amorfa contêm 33% de cálcio, 49% de fosfato, 2% de carbono, 3% de cloreto e 6% de sílica (Torabinejad *et al.*, 1995a).

A citotoxicidade do MTA foi investigada em cultura de fibroblastos, usando a cobertura de ágar e métodos de liberação radiocrômica sendo constatado que este material é menos citotóxico que o IRM ou SuperEBA (Torabinejad *et al.*, 1995b).

Estudos de mutagenicidade com material utilizado em endodontia: IRM, Super-EBA e agregado trióxido mineral (MTA) foram realizados empregando-se o teste de Ames. Linhagens TA 98 e TA 1535 de *Salmonella typhimurium* foram utilizadas com o objetivo de avaliação da capacidade mutagênica direta e indireta deste material. Os autores concluíram que os mesmos não se mostraram mutagênicos pelo teste de Ames e sugeriram que experimentos com animais fossem conduzidos (Kettering & Torabinejad, 1995).

A interação complexa, entre tecido hospedeiro e material, foi examinada usando implantação óssea do material em mandíbulas de porcos *Guinea*. A reação tecidual ao MTA foi pequena, quando comparada à reação desenvolvida na presença do Super-EBA; e ambos se apresentaram biocompatíveis neste experimento (Torabinejad *et al.*, 1995c).

Um estudo foi conduzido para comparar a eficácia de selamento e biocompatibilidade do MTA, como material de preenchimento do ápice radicular, com o amálgama, em dentes mandibulares de cachorros. O resultado deste estudo mostrou capacidade superior de selamento do MTA e sua biocompatibilidade aos tecidos periradiculares. A análise histopatológica mostrou que a aplicação do MTA, como material de preenchimento do ápice radicular, não impede a regeneração de tecidos ósseo e dental. Sua presença tem sido associada à baixos níveis de inflamação, formação de fibras de tecido conjuntivo e indução de cementogênese (Torabinejad *et al.*, 1995c).

Em outro estudo de citotoxicidade investigou-se a citomorfologia de osteoblastos na presença do MTA e examinou-se a produção de citocinas. Comparando o MTA ao IRM,

observou-se que o MTA oferece substrato biologicamente ativo para células ósseas e estimula a produção de interleucina - 1 $\alpha$ ; interleucina - 1 $\beta$  e interleucina 6, que estão envolvidas na remodelação óssea (Torabinejad *et al.*, 1998).

Em 1998, o MTA foi avaliado e aprovado pela FDA americana (*U. S. Food and Drugs Administration*) e lançado comercialmente, em 1999, como ProRoot MTA® (Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma – USA) (Holland & Bernabé, 2003).

O ProRoot MTA® apresenta-se como um pó cinza, composto principalmente de silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, ferroaluminato tetracálcico, óxido de bismuto e sulfato de cálcio diidratado. De acordo com o fabricante, o ProRoot MTA® pode ainda conter até 0,6% de resíduos insolúveis livres, como a sílica cristalina e outros elementos livres como óxido de cálcio e óxido de magnésio, além de álcalis sob a forma de sulfatos (Holland & Bernabé, 2003).

Estudos clínicos mostraram bons resultados do MTA quando usado no tratamento de ápices radiculares incompletos, no reparo de perfurações, no capeamento pulpar direto e nas retrobturações (Torabinejad & Chivian, 1999).

Estudos conduzidos por meio de análises macroscópica, microscópica e pela difração de Raios-X mostraram semelhanças entre o MTA e o cimento Portland (cimento empregado em construções). Além disto, os materiais apresentaram comportamentos similares, suportando a formação de matriz em cultura de células como osteoblastos (MG-63). Quando aplicados como materiais de capeamento pulpar direto, em polpas de dentes de ratos, favoreceram a aposição de dentina reparadora, observada microscopicamente, duas semanas após injúria (Wucherpfennig & Green, 1999).

As propriedades químicas e antibacterianas de alguns materiais, inclusive do cimento Portland (Cimento Itaú – MG) e MTA foram avaliadas por Estrela *et al.* (2000). Os autores observaram que o cimento Portland possuía os mesmos elementos químicos do MTA, exceto o bismuto. Verificaram, ainda, que o cimento Portland tinha pH e atividade antibacteriana similar ao MTA.

Foi realizado um estudo utilizando-se o cimento Portland (cimento Itaú® - Minas Gerais), o MTA e o hidróxido de cálcio quimicamente puro, preenchendo tubos de dentina e implantando-os em tecido subcutâneo de ratos. Os resultados observados foram



semelhantes entre o MTA e cimento Portland. Ou seja, foram observadas granulações de calcita em contato com os materiais estudados e também dentro dos túbulos dentinários. Diante dos resultados obtidos, os autores sugeriram que o mecanismo de ação dos três materiais estudados é similar (Holland *et al.*, 2001).

A análise histomorfológica de 26 dentes de cães submetidos a proteção pulpar com MTA e cimento Portland, após pulpotomia, mostrou a formação de ponte de tecido duro completa e polpa isenta de inflamação, para ambos materiais (Holland *et al.*, 2001). Os resultados obtidos com os dois materiais estudados estão de acordo com resultados anteriores observados com o MTA, quando aplicado sobre polpa dental (Faraco Júnior & Holland, 2001). Além disso, esses resultados sugerem que os dois materiais são similares e confirmam o mesmo mecanismo de ação demonstrado por Holland *et al.* (2001) em tecido subcutâneo de rato.

Bernabé & Holland (2002), utilizando canais radiculares de dentes de cães contaminados realizaram retrobturações com o MTA e cimento Portland (cimento Itaú – Minas Gerais). Após o período de 180 dias, puderam observar resultados similares entre os dois produtos. A análise histopatológica demonstrou, em grande parte dos espécimes analisados, deposição de tecido cementário em contato direto com o material retrobturador, caracterizando o selamento biológico.

Baseados na série de estudos realizados com o MTA, bem como nos estudos que compararam o MTA ao cimento Portland, a empresa Angelus® Odonto-Lógica, Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., com sede em Londrina-PR, realizou uma série de análises, até chegar à fórmula de um MTA nacional, lançado no comércio com a denominação de MTA-Angelus®, concorrendo com o ProRoot MTA® produzido pela Dentsply (Tulsa Dental, Oklahoma – USA) (Holland & Bernabé, 2003).

Saidon *et al.* (2003) realizando implantes de ProRoot MTA® e cimento Portland em mandíbulas de cobaias, verificaram após 2 e 12 meses que o reparo ósseo ocorria adjacente a ambos materiais, com processo inflamatório mínimo, comprovando que os mesmos são bem tolerados quando implantados.

Yaltirik *et al.* (2004) avaliou, durante o período de noventa dias, a reação do tecido conjuntivo subcutâneo ao ProRoot MTA® e ao amálgama e observou boa tolerância dos

tecidos frente aos dois materiais. Um achado importante foi a presença de calcificação distrófica no tecido conjuntivo adjacente ao MTA. Os autores sugerem outros experimentos que confirmem os seus achados.

## 2.2 Teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas de *Drosophila melanogaster*

A *Drosophila melanogaster*, popularmente conhecida como mosca da fruta, foi um dos primeiros animais a serem intensivamente estudados geneticamente. Tem sido utilizada para estudos de mutagenicidade desde 1927, quando H. J. Müller desenvolveu o teste SLRL (letal recessivo ligado ao sexo) e demonstrou que os raios-X induzem mutação (Graf *et al.*, 1984).

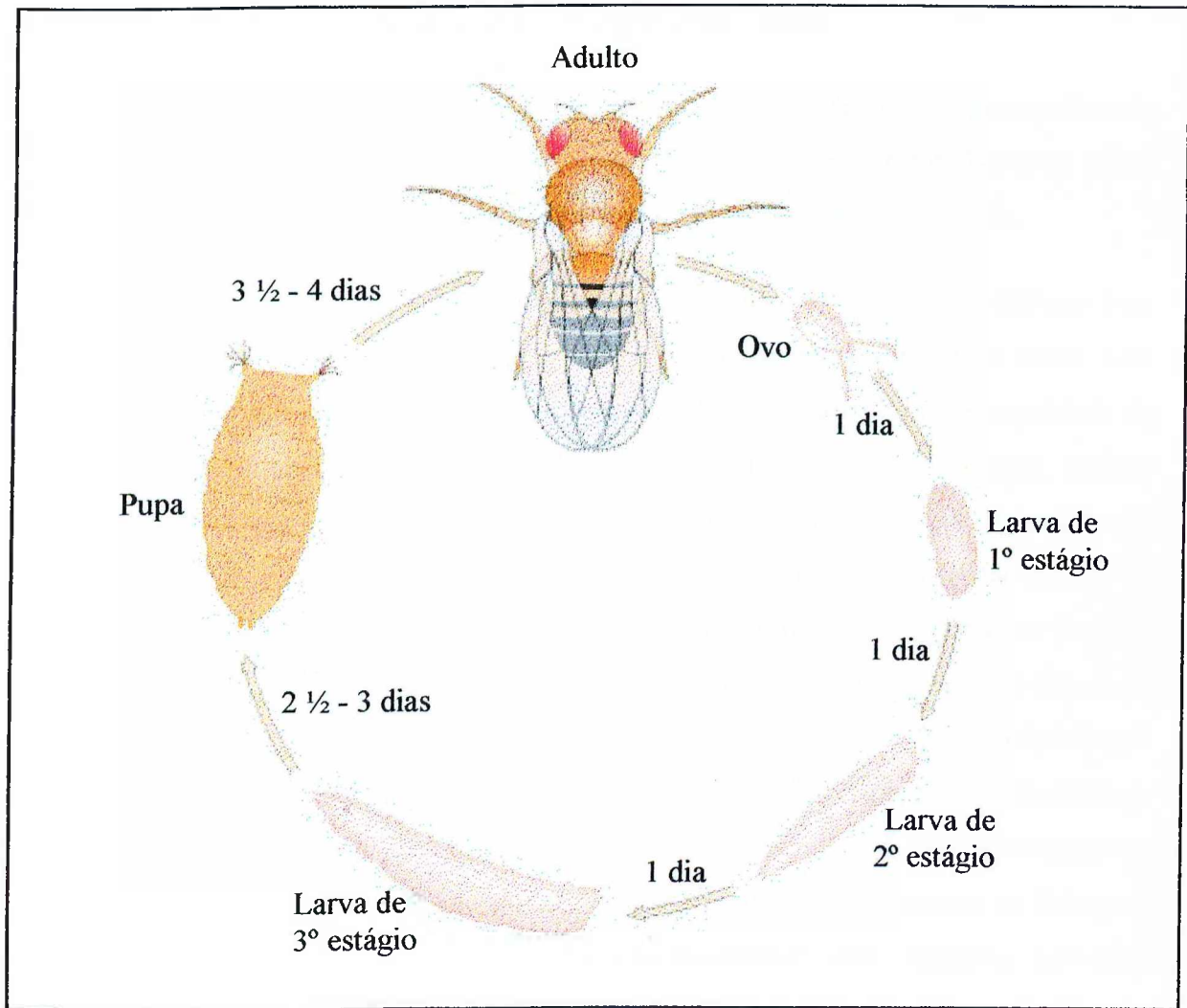
No laboratório do Dr. T. H. Morgan (USA), logo após a redescoberta dos trabalhos de Mendel, a *D. melanogaster* foi reconhecida como um animal experimental ideal para estudos genéticos. Devido ao seu pequeno tamanho, fácil manutenção em laboratório, pequeno tempo de geração, grande progênie, baixo número de cromossomos e por possuir cromossomos salivares gigantes, Morgan utilizou a *D. melanogaster* para elucidar os mecanismos da herança Mendeliana e para construir os primeiros mapas de ligação gênica (Graf *et al.*, 1992).

Testes bem definidos para a verificação da mutagenicidade de agentes físicos e químicos têm sido desenvolvidos em *D. melanogaster*, os quais são capazes de medir um amplo espectro de danos genéticos induzidos em células germinativas, assim como em células somáticas (Würgler *et al.*, 1984). Além disso, já está muito bem documentado o fato de que a *D. melanogaster* possui um eficiente sistema para o metabolismo de agentes xenobióticos (Baars, 1980; Hällstrom *et al.*, 1984; Vogel, 1980).

O teste para detecção de mutação e recombinação somática em *D. melanogaster* (SMART) é um teste útil na detecção de alterações genéticas ocorridas no disco imaginal das asas (Graf *et al.*, 1984). Este tem como base o fato de que, durante o início do desenvolvimento embrionário da *Drosophila*, grupos de células dos discos imaginais se

separam e proliferam durante o desenvolvimento larval até diferenciarem, durante a metamorfose, em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas, etc.) (Graf *et al.*, 1984; Graf & Würigler, 1986).

A **Figura 2.1** mostra as diferentes etapas: ovo, larva de primeiro estágio, larva de segundo estágio, larva de terceiro estágio, pupa e adulto; do ciclo de vida da *D. melanogaster*.



**Figura 2.1** Diferentes etapas do ciclo de vida da *D. melanogaster* (Griffiths *et al.*, 2000).

O tecido alvo é o disco imaginal do desenvolvimento larval. A duração total dos 3 estágios à 25°C é de 4 dias (1+1+2 dias). Durante este período as células indiferenciadas do disco imaginal proliferam até a diferenciação do estágio pupal, onde órgãos distintos do imago são formados. A estimativa de duração completa do ciclo mitótico, durante o

crescimento exponencial do disco imaginal, é de 8 a 10,6 horas para as asas (Bryant, 1970).

A utilização da *D. melanogaster*, como um organismo eucarioto que ativa enzimaticamente promutágenos e procarcinógenos, faz do SMART um teste eficiente na detecção de um amplo espectro de alterações genéticas, tais como mutações de ponto, aberrações cromossômicas e recombinações mitóticas (Graf *et al.*, 1984; Graf & Singer, 1992; Vogel, 1980; Vogel & Zijlstra, 1987; Würigler *et al.*, 1984).

O SMART tem se mostrado sensível a um amplo espectro de agentes genotóxicos de diferentes classes químicas, assim como para misturas complexas (Graf & Würigler, 1986; Graf & Singer, 1992; Guzmán-Rincón & Graf, 1995; van Schaik & Graf, 1991).

No SMART são utilizados dois genes marcadores, com expressões fenotípicas bem definidas. O marcador *multiple wing hairs (mwh)* é mantido na linhagem como uma mutação viável em homozigose recessiva. O gene *mwh* está localizado na extremidade do braço esquerdo do cromossomo 3 (3-0,3) e, em condições de homozigose, produz múltiplos tricomas por célula, ao invés de apenas um único tricoma, como normalmente acontece. O marcador *flare 3 (flr<sup>3</sup>)*, é uma mutação recessiva que afeta a forma do pêlo da asa. Ele também está localizado no braço esquerdo do cromossomo 3, mas em posição mais proximal (3-38,8). Ele produz pêlos mal formados que têm a forma de uma chama de fogo. Todos os três alelos mutantes conhecidos são letais em homozigose recessiva nos zigotos (os zigotos homozigotos para o *flr* não são capazes de desenvolver moscas adultas). Ao contrário, células homozigotas do disco imaginal são viáveis e levam à formação de células mutantes nas asas. Devido à letalidade no zigoto, o alelo *flr* é mantido na linhagem estoque com a presença de um "balanceador cromossômico" com múltiplas inversões cromossômicas (do inglês: TM3, BdS- *Third multiple 3, Beaded-Serrate*) (Guzmán-Rincón & Graf, 1995).

O cruzamento entre as linhagens *mwh/mwh* (machos) e *flr<sup>3</sup>/TM3, BdS*, (fêmeas) conhecido como cruzamento padrão, permite a obtenção de dois tipos de descendentes: [1] trans-heterozigoto marcado (MH) (*mwh +/+ flr<sup>3</sup>*) - asas fenotipicamente do tipo selvagem; [2] heterozigoto balanceado (BH) (*mwh +/+ TM3, BdS*) - asas do tipo serrilhada (Figura 2.2).

Nos descendentes MH é possível detectar a ocorrência de diferentes eventos genéticos, tais como mutação, aberração cromossômica (deleção) e recombinação. No entanto, nos descendentes BH são detectadas apenas mutação e deleção, devido ao fato de o balanceador *TM3* carregar inversões múltiplas que impedem a recombinação mitótica (Guzmán-Rincón & Graf, 1995). A recombinação pode levar à perda da heterozigose e ocorre como resposta celular ao dano do DNA (Würgler, 1992).

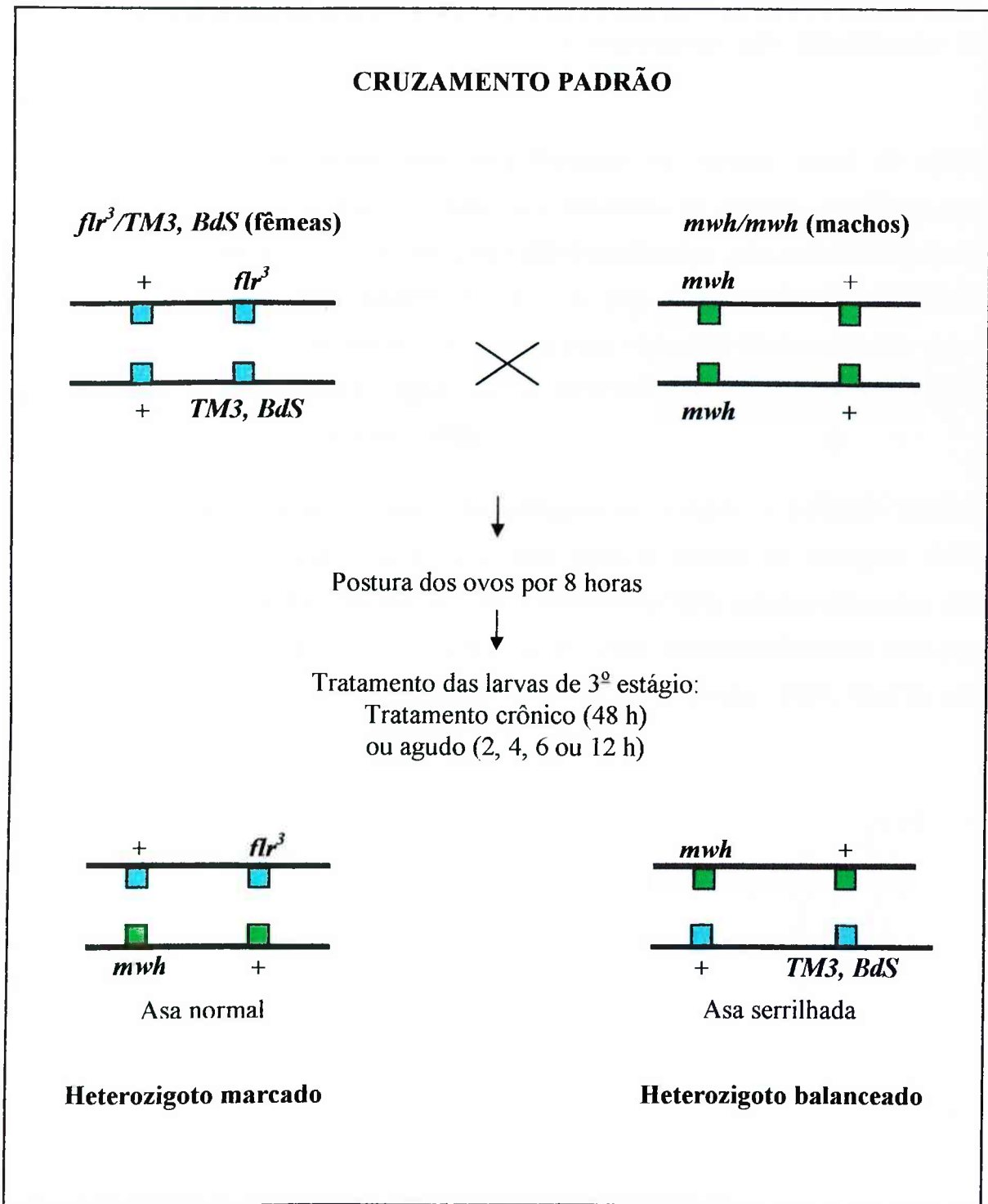


Figura 2.2 Esquema do cruzamento padrão (ST).

A **Figura 2.3 A** mostra esquema da divisão mitótica normal. As **Figuras 2.3 B; 2.4 A** e **2.4 B** mostram diferentes eventos genotóxicos responsáveis pelo aparecimento de manchas mutantes.

Com o objetivo de desenvolver uma linhagem de moscas capaz de ativar promutágenos, de uma forma mais eficiente, que dependem da ativação metabólica por enzimas citocromo P450, Frölich & Würgler (1989) construíram uma nova linhagem de moscas *flr<sup>3</sup>* que carrega os cromossomos 1 e 2 de uma linhagem Oregon R (ORR) resistente ao DDT (Dapkus & Merell, 1977). Esta nova linhagem ficou conhecida como linhagem *ORR; flr<sup>3</sup>* e possui alta capacidade de bioativação devido aos altos níveis de citocromo P450 (Hällstrom & Blanck, 1985).

Essa linhagem apresenta algumas desvantagens em relação à linhagem padrão. Quando é realizado o cruzamento entre fêmeas *mwh* e machos da linhagem ORR (cruzamento de alta capacidade de bioativação – cruzamento HB), ocorrem alterações nos padrões de pêlos, dificultando a classificação das manchas, apresentando baixa produção de ovos, com atrasos no desenvolvimento larval (Frölich & Würgler, 1991; Graf & van Schaik, 1992).

1 célula

Mitose

2 células

Clones

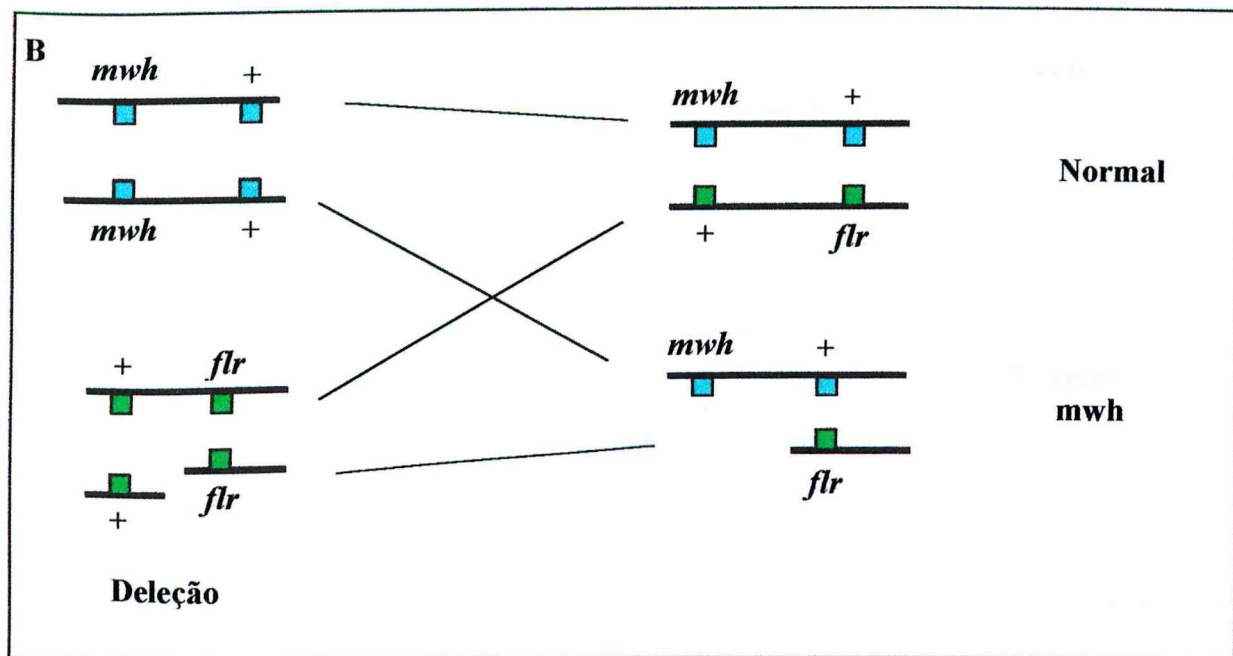
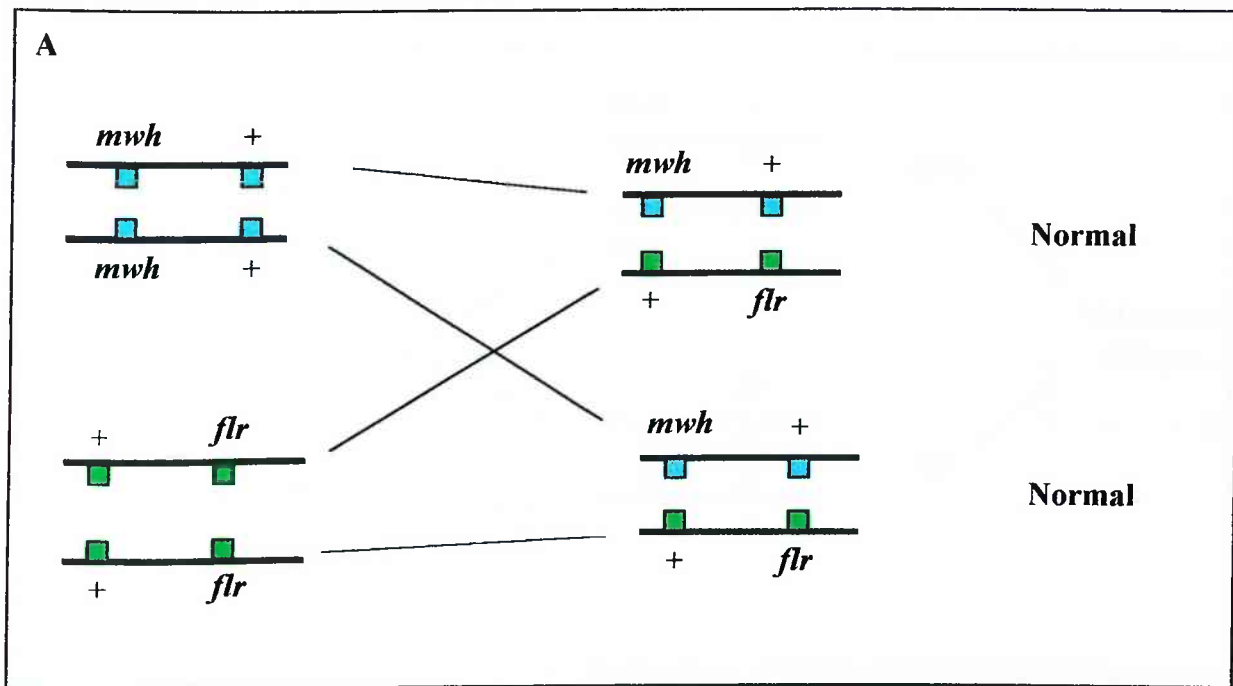


Figura 2.3 (A) Esquema de divisão mitótica normal. (B) Esquema de aberração cromossômica (deleção) responsável pelo aparecimento de mancha simples do tipo *mwh*, de acordo com Gusmán-Rincón & Graf (1995) (com modificações).



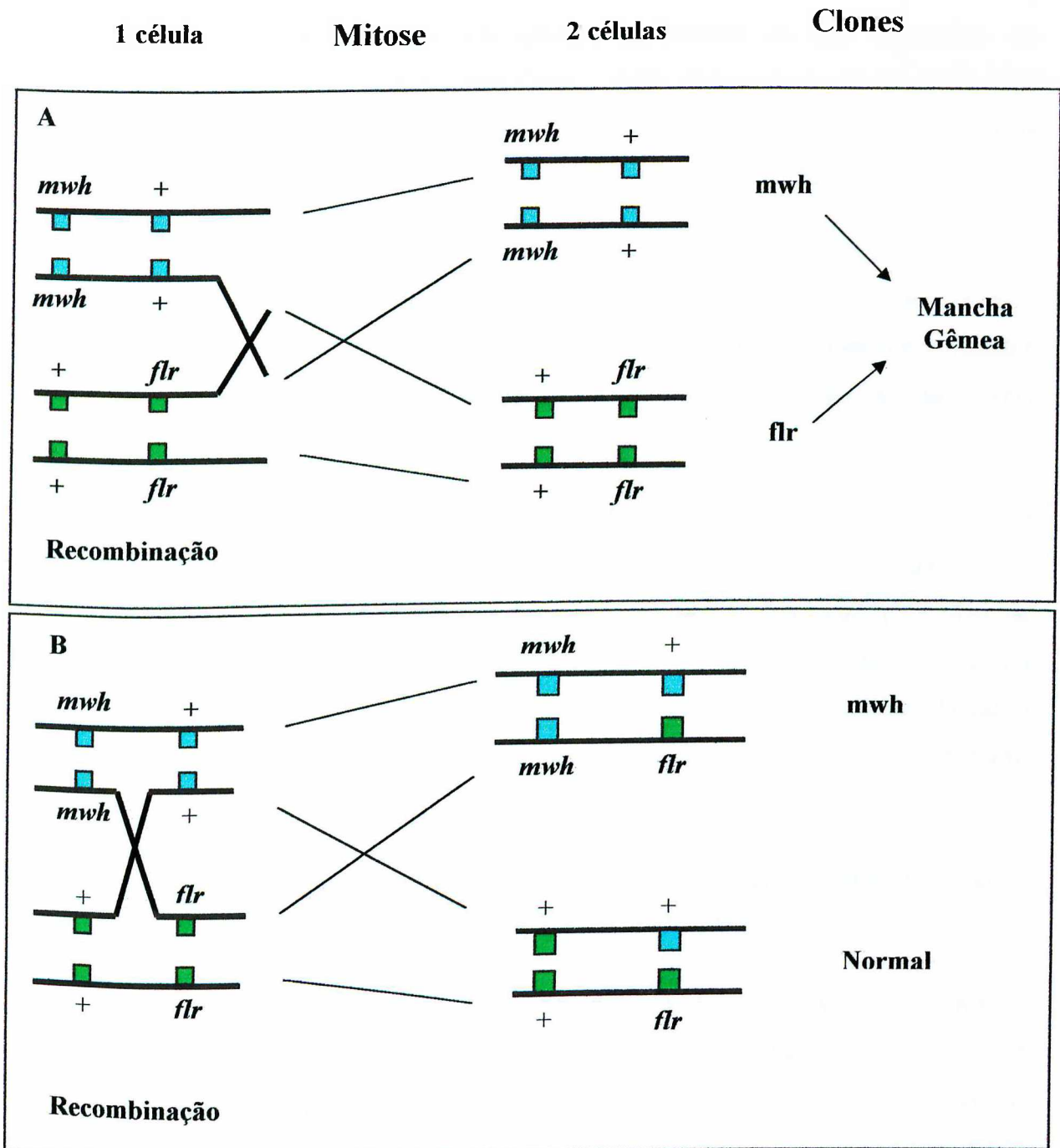


Figura 2.4 Esquemas mostrando diferentes eventos genotóxicos responsáveis pela formação de manchas simples e gêmeas de acordo com Gusmán-Rincón & Graf (1995) (com modificações). Manchas gêmeas são obtidas por recombinação proximal do marcador *flr* (A), enquanto a recombinação mais distal produz manchas simples *mwh* somente(B).

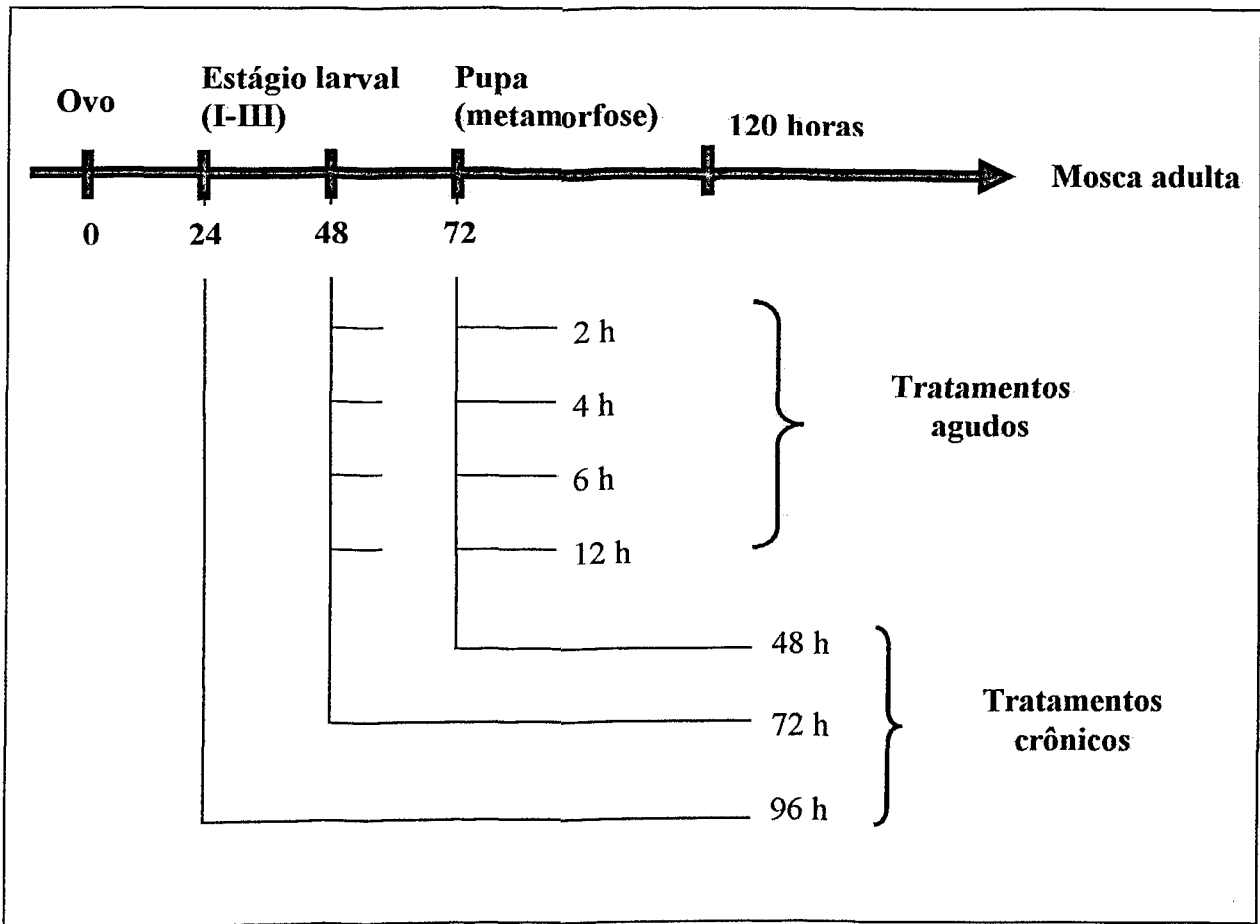
Os problemas relacionados com o cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB) foram solucionados com a realização de um cruzamento aprimorado (Graf *et al.*, 1992), que ficou conhecido como cruzamento aprimorado de alta capacidade de bioativação ("Improved High Bioactivation Cross" - IHB). Este cruzamento foi obtido pelo cruzamento de fêmeas  $ORR; flr^3/TM3, BdS$ , com machos *mwh*. Os descendentes desses cruzamentos têm um padrão de pêlos normais, exibindo alta capacidade de bioativação.

O cruzamento HB também produz dois tipos de progênie: 1] trans-heterozigoto marcado (*mwh +/+ flr<sup>3</sup>*) - asas fenotipicamente do tipo selvagem; 2] heterozigoto balanceado (*mwh +/+ TM3, BdS*) - asas do tipo *serrilhada*. No entanto, esses descendentes apresentam nos cromossomos 1 e 2 os genes que permitem produção de altos níveis constitutivos de citocromo P450.

As larvas derivadas dos cruzamentos ST e HB podem ser tratadas cronicamente (um a quatro dias) ou de forma aguda (períodos de uma a doze horas) (Figura 2.5). Normalmente, o teste para detecção de manchas em asas é realizado por meio de tratamento de larvas de três dias de idade, que são alimentadas com meio de cultura instantâneo mais o agente químico a ser testado, até o resto do desenvolvimento larval, o que corresponde a um tratamento de aproximadamente 48 horas (Guzmán-Ricón & Graf, 1995).

O teste oferece a possibilidade do uso de diferentes vias de tratamento com o composto teste: via oral, inalação ou por injeção (Graf *et al.*, 1984).

Pré-tratamentos para a detecção de agentes antigenotóxicos podem ser agudos ou crônicos. Normalmente, faz-se pré-tratamento de larvas de dois dias de idade, que são alimentadas por um período de 24h com um agente que se deseja determinar o potencial antigenotóxico e, logo após, essas larvas são lavadas com água e transferidas para frascos contendo o agente genotóxico em meio de cultura. As larvas são alimentadas nesse meio até empuparem (Abraham & Graf, 1996).



**Figura 2.5.** Possíveis esquemas de tratamento de larvas provenientes dos cruzamentos ST e HB, de acordo com Graf *et al.* (1984). Exposição aguda de 2-12 horas pode ser realizada em larvas de 48hs ou 72 hs. O tratamento crônico de 48 a 96 hs pode ser realizado em larvas de 24 a 72 hs.

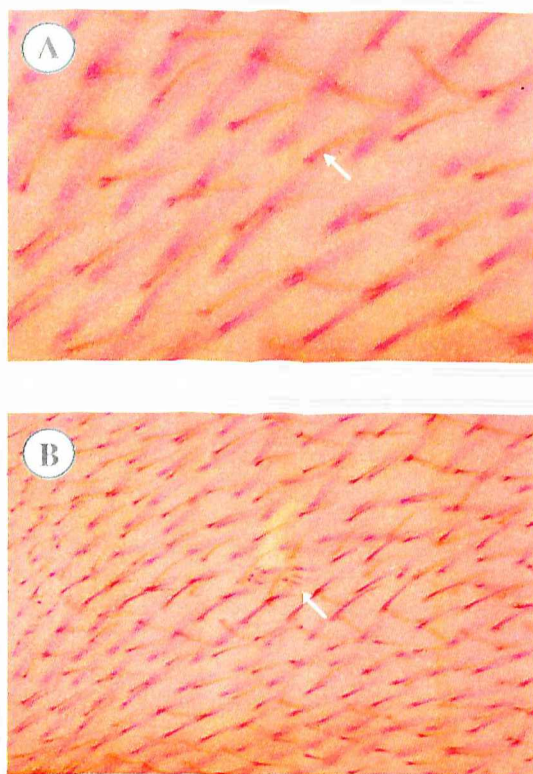
Após a eclosão, as moscas adultas são coletadas dos frascos de tratamento e estocadas em frascos contendo etanol 70% para posterior análise das asas.

Caso ocorra uma alteração genética em uma das células do disco imaginal, tal alteração estará presente em todas as células descendentes, e formará um clone de células mutantes. A alteração genética é responsável por uma mudança visível no fenótipo. Assim sendo, as células mutantes serão detectadas como uma mancha de pêlos mutantes na asa da mosca adulta (Guzmán-Rincón & Graf, 1995).

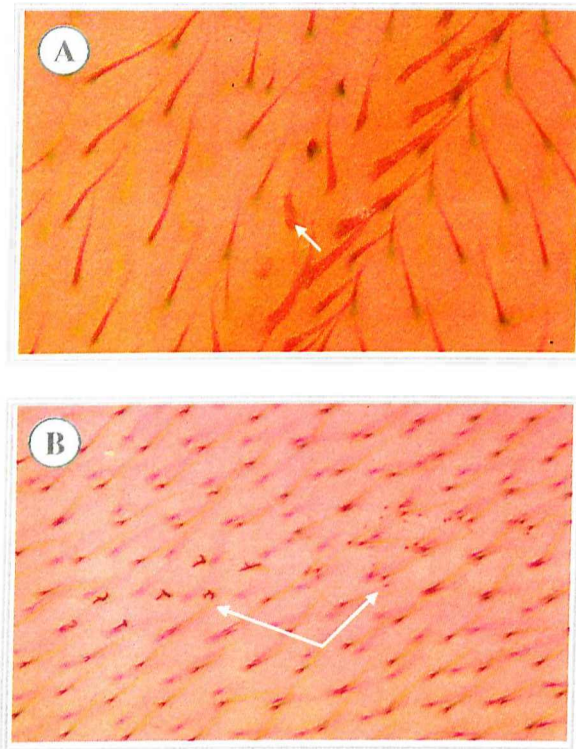
As manchas (células que apresentam pêlos mutantes) produzidas por mutações, deleções e/ou recombinações são classificadas em: simples pequenas (1-2 células - mwh ou

flr), simples grandes (três ou mais células - mwh ou flr) e gêmeas, que são formadas pela presença de manchas mwh e flr adjacentes (Graf *et al.*, 1984).

A **Figura 2.6** mostra fotomicrografia de pêlos normais (A) e mancha simples *mwh* (B) e a **Figura 2.7** mostra fotomicrografia de pêlos *flare* (A) e mancha gêmea *multiple wing hairs/flare* (B), em microcópico óptico de luz, com objetiva de 40X.



**Figura 2.6** (A) Fotomicrografia de pêlos normais (seta). (B) Mancha simples mwh (seta).



**Figura 2.6** (A) Fotomicrografia de pêlos *flare* (seta). (B) Mancha gêmea *multiple wing hairs/flare* (setas).

Teoricamente, o tamanho da mancha reflete o número de divisões mitóticas ocorridas após a indução da alteração genética. Acreditando-se que todas as células dividem-se numa mesma taxa, o tamanho da mancha é diretamente proporcional ao número de divisões ( $n$ ), alcançando um tamanho que varia de  $2^0$  a  $2^n$  (Graf *et al.*, 1984).

As manchas gêmeas são produzidas exclusivamente pela recombinação mitótica, ao passo que as manchas simples são formadas a partir de vários tipos de eventos mutacionais e recombinacional. Existe uma clara correlação entre o tempo de indução e a frequência de manchas simples, assim como o tamanho das mesmas. Em larvas jovens são induzidas poucas manchas, mas de grande tamanho, ao passo que nas larvas mais velhas, as frequências são consideravelmente maiores, mas os tamanhos das manchas são menores. (Graf *et al.*, 1992). Praticamente não foram observadas manchas gêmeas em larvas muito jovens e em larvas muito velhas

Katz & Foley (1993) mostraram por meio de uma série de experimentos, os efeitos de altas e baixas temperaturas na frequência espontânea de manchas. Os autores observaram um aumento no número de manchas pequenas mwh em temperaturas altas ( $29^{\circ}$  C). Nas altas temperaturas as células do disco imaginal dividem-se mais rapidamente, tendo, as células, um tempo menor para realizar o reparo, fazendo que o mesmo fique menos eficiente.

### 3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico de compostos à base de agregado de trióxido mineral, em células somáticas de *D. melanogaster*. Estes compostos são empregados como material odontológico, com apresentação comercial de ProRoot MTA® e MTA Angelus® e na construção civil, onde é denominado de cimento Portland.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Agentes químicos

1. ProRoot MTA® (Dentsply Tulsa Dental, Oklahoma – USA), lote 000721
2. MTA Angelus® (Angelus Odonto-Lógica Indústria de Produtos Odontológicos Ltda, Londrina, Paraná, Brasil), lote 1141
3. Cimento Portland ( Cimento Tocantins S.A., Votorantim Cimentos, Brasília, Brasil)
4. Etil carbamato (Uretano, CAS nº 51-79-6, Fluka AG, Buchs, Suíça).

Todos os compostos foram dissolvidos em água destilada estéril imediatamente antes do uso.

Como controle positivo foi utilizado o etil carbamato (uretano) dissolvido também em água destilada estéril, resultando na concentração de 10 mM.

Como controle negativo, foi utilizada a água destilada estéril.



#### 4.2. Teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas de *Drosophila melanogaster* (Graf *et al.*, 1984).

O teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas de *Drosophila melanogaster* foi desenvolvido por Graf *et al.* (1984).

##### 4.2.1 Linhagens estoques

Foram utilizadas três linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster*, portadoras dos marcadores genéticos *multiple wing hairs* (*mwh*, 3-0,3) e *flare* (*flr*<sup>3</sup>, 3-38,8):

1. *Multiple wing hairs* (*mwh*), com constituição genética *y; mwh jv*.
2. *Flare-3* (*flr*<sup>3</sup>), com constituição genética *flr*<sup>3</sup>/*In* (3LR)TM3, *ri p<sup>o</sup> sep I(3)89Aabx<sup>34e</sup>* e *BdS*.
3. *ORR; flare-3* (*ORR; flr*<sup>3</sup>), com constituição genética *ORR/ORR; flr*<sup>3</sup>/*In*(3LR)TM3, *ri p<sup>o</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup>* e *BdS*.

Os estoques foram mantidos em frascos de 1/4 de litro contendo meio de cultura para *Drosophila melanogaster* (820 ml de água, 25g de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), 11g de ágar, 156g de banana e 1g de nipagin).

Fêmeas virgens (*flr<sup>3</sup>* e *ORR; flr<sup>3</sup>*) foram mantidas em frascos contendo meio de cultura padrão e fermento fresco por 2 a 3 dias. Machos (*mwh*) foram coletados no mesmo tipo de frasco. No terceiro dia as moscas foram cruzadas (aproximadamente 100 fêmeas para 50 machos).

#### 4.2.2 Cruzamentos entre as linhagens mutantes

##### 1) Cruzamento padrão (ST - "Standard Cross") (Graf *et al.*, 1989)

Fêmeas *flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>r</sup>* cruzadas com machos *mwh/mwh*.

##### 2) Cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB - "High Bioactivation Cross") (Graf e van Schaik, 1992).

Fêmeas *ORR; flr<sup>3</sup>/In(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep I(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e BdS* cruzadas com machos *mwh/mwh*.

Ovos foram coletados por um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico (*S. cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após a remoção das moscas desses frascos, os ovos foram mantidos neste meio. Após  $72 \pm 4$  horas, larvas de 3<sup>o</sup> estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de aproximadamente 100 larvas foram transferidas para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e

8,0 cm de altura) contendo 1,5 g de meio de purê de batata (Yoki Alimentos S.A.) e 5,0 ml de diferentes concentrações do agente teste (10,0; 20,0 e 40,0 mg/ml).

Estas concentrações foram obtidas através da diluição dos materiais ProRoot MTA, MTA Angelus e cimento Portland em água destilada estéril. As concentrações empregadas foram determinadas em experimento piloto.

Os compostos à base de MTA, apresentaram dificuldade de dissolução em água destilada estéril. Como consequência obtinha-se uma suspensão de partículas, com as quais foram feitos os tratamentos, via oral, por meio da alimentação de larvas de terceiro estágio. No entanto, de acordo com Valência *et al.* (1984) é perfeitamente possível detectar a mutagenicidade de compostos que não permitem uma dissolução completa do soluto (agente teste), permanecendo nestes casos uma suspensão.

O uretano foi diluído em água destilada estéril e foi empregado no tratamento como controle positivo. A água destilada estéril foi utilizada como controle negativo.

Todo procedimento experimental foi conduzido a temperatura de 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) e umidade relativa de aproximadamente 65%.

De ambos os cruzamentos foram obtidos dois tipos de descendentes: [1] trans-heterozigoto marcado (MH) (*mwh +/+ flr<sup>3</sup>*) - asas fenotipicamente do tipo selvagem; [2] heterozigoto balanceado (BH) (*mwh +/+ TM3 Bds*) - asas fenotipicamente do tipo serrilhada. As moscas adultas emergentes, 10 a 12 dias após ovoposição, foram coletadas e fixadas em etanol 70%. Nos dois cruzamentos realizados, os descendentes MH são diferenciados dos descendentes BH pelo aspecto fenotípico das asas (marcador serrate).

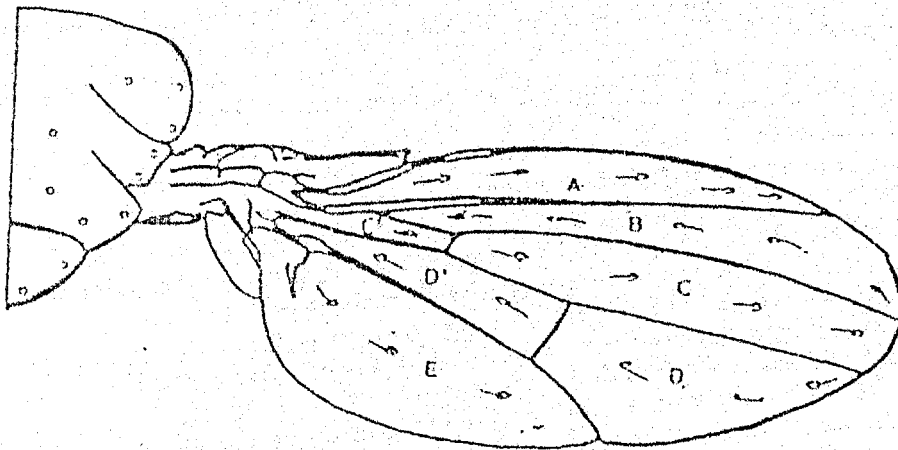
### 4.2.3 Preparação das asas para análise

As asas das moscas foram estendidas e fixadas, sobre lâminas secas, com solução de Faure (30g de goma arábica, 20 ml de glicerol, 1,5 g de hidrato de cloral e 50 ml de água destilada) e colocadas para secar em placas aquecedoras (40°C) por 24 h. Após esse período, as lâminas foram montadas com lamínulas, em solução de Faure. Sobre a lamínula foi adicionado um peso de metal (aproximadamente 400g), para que as asas ficassem com a superfície plana, e deixadas secar por 48 h.

### 4.2.4 Análise microscópica das asas

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico de luz (Olympus, BH-C2, Japão) em objetiva 40X. Ambas superfícies das asas foram analisadas para presença de manchas (Figura 4.2.4.1) Foram registrados o número e os tipos de manchas encontradas (simples ou gêmeas), assim como o tamanho das mesmas e a posição em que se encontram na asa. Em cada caso, o tamanho da mancha foi determinado pela contagem do número de células das asas que exibem o fenótipo mutante *mwh* ou *flr<sup>3</sup>*. Três categorias de manchas foram observadas: 1) Manchas *mwh* simples, 2) manchas *flr<sup>3</sup>* simples, e 3) manchas gêmeas mostrando áreas *mwh* e *flr<sup>3</sup>*. As manchas simples são produzidas somente por mutação, deleção, ou recombinação mitótica entre dois marcadores. As manchas gêmeas são produzidas exclusivamente por recombinação mitótica ocorrida entre o marcador proximal *flr<sup>3</sup>* e o centrômero (Graf *et al.* 1984).

Nos indivíduos portadores de genótipo *mwh*<sup>+/+TM3</sup>, *BdS* as manchas mutantes aparecem apenas como manchas simples do tipo *mwh* produzidas por mutação, deleção ou não disjunção, pois devido à presença de uma série de inversões cromossômicas no cromossomo balanceador, as células resultantes de recombinação mitótica são inviáveis. A fração de manchas encontradas nas asas dos trans-heterozigotos marcados, que não ocorre devido à recombinação mitótica, é calculada dividindo-se a frequência de manchas *mwh* encontrada nas asas dos heterozigotos balanceado, pela frequência de manchas *mwh* encontrada nas asas dos trans-heterozigotos marcados.



**Figura 4.2.4.1** Mesotórax de *D.melanogaster* mostrando as regiões A – E da superfície da asa; notificação utilizada para o registro de manchas. A leitura das asas obedece a seqüência A – E conforme evidenciado pelas setas (Garcia-Bellido & Merriam, 1971; Graf *et al*, 1984).

#### 4.2.5 Análise estatística

As freqüências de manchas por asa das séries tratadas foram comparadas com o controle negativo (água destilada estéril). Duas hipóteses foram usadas para distinguir entre as possibilidades de um resultado positivo, inconclusivo ou negativo. Na hipótese nula foi assumido a ausência de diferença na freqüência de mutações entre o controle e a série tratada. A hipótese alternativa postulou *a priori* que o tratamento resulta em um aumento na freqüência de mutações que é  $m$  vezes maior que a freqüência espontânea.

Esta hipótese alternativa é recusada se a freqüência de mutação é significativamente menor que o aumento da freqüência postulada. A recusa indica que o tratamento não produz aumento necessário para considerar o tratamento como mutagênico. Se nenhuma das 2 hipóteses for recusada, os resultados são considerados inconclusivo, uma vez que não se pode aceitar as suas hipóteses acontecendo simultaneamente.

Na aplicação prática de decisão do procedimento se define uma específica hipótese alternativa necessária para que a freqüência de mutação da série tratada seja  $m$  vezes que a série controle e a usa junto com a hipótese nula. Isto ocorre quando ambas hipóteses são recusadas. O que significa que o tratamento é fraco mutagênico, mas permite que a freqüência de mutação seja significativamente menor que  $m$  vezes a freqüência controle.

Particularmente no caso de ambas hipóteses alternativa e nula serem recusadas, será interessante conhecer o intervalo de confiança de  $m$ , por exemplo, um múltiplo estimado pelo qual a freqüência de mutação na série experimental é maior que a freqüência espontânea. O valor estimado é dado pela fórmula:

$$mc = \frac{(nt/n)Nc}{(nc/n)NT}$$

Onde Nc e NT representa os respectivos tamanhos da amostra do controle e série tratada, Nc e NT, os respectivos números de mutações encontradas, e n o total de mutações em ambas séries somadas.

Para a hipótese alternativa no teste, considera-se  $m=2$  como um fator de multiplicação para o total de todas as manchas e para as manchas pequenas simples (1-2 células), pois ambos tem uma alta incidência espontânea, e  $m=5$  para as manchas gêmeas que em comparação tem uma baixa incidência espontânea. (Graf *et al.*, 1984)

Para testar contra hipóteses foi aplicado um teste binomial condicional (Kastenbaum & Bowman, 1970) ou teste do  $X^2$  para proporções (Frei & Würigler, 1988). Ambos apresentam como vantagem não ser necessário estimar a verdadeira frequência espontânea de mutação para testar as hipóteses.

O teste binomial condicional foi usado com níveis de significância  $\alpha=\beta=0,05$  (Frei & Würigler, 1988).

Para a análise estatística, as manchas foram agrupadas da seguinte forma: 1) manchas simples pequenas de 1 ou 2 células (mwh ou flr<sup>3</sup>); 2) manchas grandes simples com 3 ou mais células (mwh ou flr<sup>3</sup>); e 3) manchas gêmeas, com áreas mwh e flr<sup>3</sup>. Estes três tipos de manchas foram avaliados separadamente.

## 5. RESULTADOS

Todos os tratamentos de larvas de *D. melanogaster* com compostos à base de agregado de trióxido mineral (MTA) (Pro Root MTA<sup>®</sup>; MTA Angelus<sup>®</sup> e cimento Portland), foram realizados concomitantemente aos tratamentos com água destilada estéril (controle negativo) e uretano (controle positivo). Desta forma, há apenas um controle negativo e um controle positivo, para todo o grupo experimental.

A **Tabela 5.1** mostra o número de moscas e a frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* dos cruzamentos ST e HB após tratamento crônico (48 h) de larvas com água destilada estéril (controle negativo); com diferentes concentrações de Pro Root MTA<sup>®</sup> (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL) e com uretano (10 mM).

A frequência total de manchas por mosca observada no controle negativo do cruzamento ST foi de 0,25; enquanto que no cruzamento HB foi ligeiramente maior (0,75).

As frequências de manchas pequenas simples e o total de manchas mutantes por indivíduo, induzidas pelo uretano no cruzamento ST, foram estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) quando comparadas com as frequências espontâneas observadas no controle negativo. No entanto, no cruzamento HB, foram observadas frequências estatisticamente significativas para todas as categorias de manchas mutantes (pequenas simples, grandes simples, gêmeas, e total de manchas).

Quando testado no cruzamento padrão, o Pro Root MTA<sup>®</sup> induziu aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas mutantes pequenas simples para todas as concentrações testadas, e na frequência total de manchas para os tratados com 20,0 e 40 mg/mL. No entanto, quando o Pro Root MTA<sup>®</sup> foi testado no cruzamento de alta bioativação, as frequências de manchas mutantes foram inconclusivas para todas as categorias de manchas e para todas as concentrações testadas.

A **Figura 5.1** mostra a distribuição do tamanho de manchas simples após o tratamento crônico com água destilada estéril; com diferentes concentrações de Pro Root MTA<sup>®</sup> e com uretano.

A **Tabela 5.2** mostra as frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* dos cruzamentos ST e HB tratados com diferentes concentrações de MTA Angelus<sup>®</sup> (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL).



O MTA Angelus<sup>®</sup>, quando testado no cruzamento padrão, induziu aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas mutantes pequenas simples e no total de manchas, para todas as concentrações testadas. No entanto, quando o MTA Angelus<sup>®</sup> foi testado no cruzamento de alta bioativação, foi verificado aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas mutantes pequenas simples e no total de manchas, apenas para os tratados com 20,0 mg/mL.

A **Figura 5.2** mostra a distribuição do tamanho de manchas simples após o tratamento crônico com diferentes concentrações de MTA Angelus<sup>®</sup>.

A **Tabela 5.3** mostra o número de moscas e a frequência de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* dos cruzamentos ST e HB após tratamento crônico (48 h) de larvas com diferentes concentrações de cimento Portland (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL).

O cimento Portland induziu aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas mutantes pequenas simples e na frequência total de manchas para os tratados com 20,0 e 40 mg/mL, tanto nos descendentes do cruzamento padrão, quanto nos descendentes do cruzamento de alta bioativação.

A **Figura 5.3** mostra a distribuição do tamanho de manchas simples após o tratamento crônico com água destilada estéril; com diferentes concentrações de cimento Portland.

**TABELA 5.1** Número de moscas e frequência de manchas observadas em descendentes MH de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico de larvas com Pro Root MTA® (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL) e uretano (10,0 mM)

Tratamento	Número de indivíduos	Frequência de manchas por indivíduo (nº de manchas) Diagnóstico estatístico <sup>a</sup>			
		Pequenas simples (1-2 células) <sup>b</sup> m=2	Grandes Simples (>2 células) <sup>b</sup> m=5	Gêmeas m=5	Total de manchas m=2
<b>Cruzamento ST</b>					
Pro Root MTA®					
00,0	20	0,15 (03)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,25 (05)
10,0	20	0,50 (10) +	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,50 (10) i
20,0	20	1,35 (27) +	0,00 (00) i	0,00 (00) i	1,35 (27) +
40,0	20	1,40 (28) +	0,20 (04) i	0,00 (00) i	1,60 (32) +
Uretano					
10,0	20	3,65 (73) +	0,40 (08) i	0,15 (03) i	4,20 (84) +
<b>Cruzamento HB</b>					
Pro Root MTA®					
00,0	20	0,55 (11)	0,15 (03)	0,05 (01)	0,75 (15)
10,0	20	0,95 (19) i	0,05 (01) i	0,00 (00) i	1,00 (20) i
20,0	20	0,85 (17) i	0,05 (01) i	0,05 (01) i	0,95 (19) i
40,0	20	0,85 (17) i	0,10 (02) i	0,00 (00) i	0,95 (19) i
Uretano					
10,0	20	7,10 (142) +	1,00 (20) +	1,00 (20) +	9,10 (182) +

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância:  $\alpha = \beta = 0,05$ . <sup>b</sup> Incluindo manchas simples flr<sup>3</sup> raras.

**TABELA 5.2** Número de moscas e frequência de manchas observadas em descendentes MH de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico de larvas com MTA Angelus® (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL) e uretano (10,0 mM)

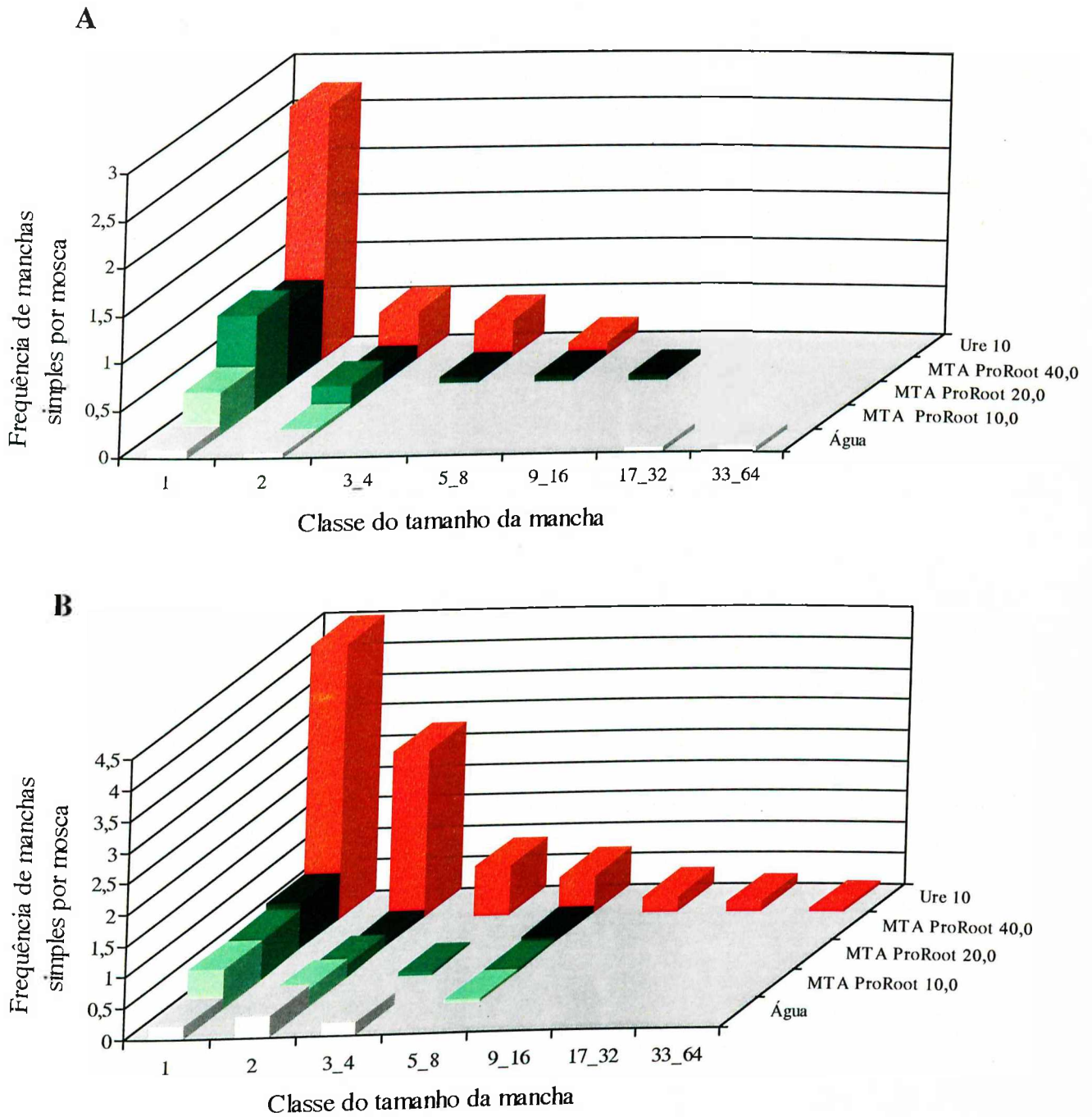
Tratamento	Número de indivíduos	Frequência de manchas por indivíduo (nº de manchas) Diagnóstico estatístico <sup>a</sup>			
		Pequenas simples (1-2 células) <sup>b</sup> m=2	Grandes Simples (>2 células) <sup>b</sup> m=5	Gêmeas m=5	Total de manchas m=2
<b>Cruzamento ST</b>					
MTA Angelus					
00,0	20	0,15 (03)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,25 (05)
10,0	20	1,10 (22) +	0,30 (06) i	0,00 (00) i	1,40 (28) +
20,0	20	1,35 (27) +	0,20 (04) i	0,05 (01) i	1,60 (32) +
40,0	20	1,40 (28) +	0,20 (04) i	0,00 (00) i	1,60 (32) +
Uretano					
10,0	20	3,65 (73) +	0,40 (08) i	0,15 (03) i	4,20 (84) +
<b>Cruzamento HB</b>					
MTA Angelus					
00,0	20	0,55 (11)	0,15 (03)	0,05 (01)	0,75 (15)
10,0	20	1,40 (28) i	0,05 (01) i	0,00 (00) i	1,45 (29) i
20,0	20	1,70 (34) +	0,00 (00) i	0,05 (01) i	1,75 (35) +
40,0	20	1,25 (25) i	0,15 (03) i	0,00 (00) i	1,40 (28) i
Uretano					
10,0	20	7,10 (142) +	1,00 (20) +	1,00 (20) +	9,10 (182) +

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância:  $\alpha = \beta = 0,05$ . <sup>b</sup> Incluindo manchas simples flr<sup>3</sup> raras.

**TABELA 5.3** Número de moscas e frequência de manchas observadas em descendentes MH de *Drosophila melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico de larvas com cimento Portland (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL) e uretano (10,0 mM)

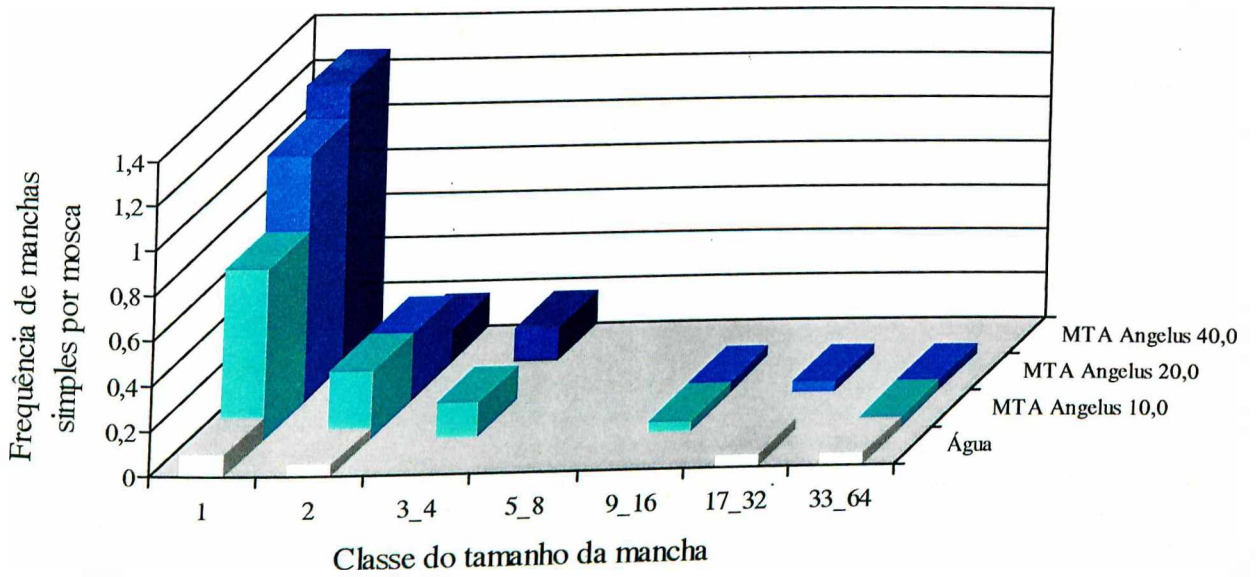
Tratamento	Número de indivíduos	Frequência de manchas por indivíduo (nº de manchas) Diagnóstico estatístico <sup>a</sup>			
		Pequenas simples (1-2 células) <sup>b</sup>	Grandes Simples (>2 células) <sup>b</sup>	Gêmeas	Total de manchas
		m=2	m=5	m=5	m=2
<b>Cruzamento ST</b>					
Cimento Portland					
00,0	20	0,15 (03)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,25 (05)
10,0	20	0,40 (08) i	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,40 (08) i
20,0	20	1,45 (29) +	0,40 (08) i	0,05 (01) i	1,90 (38) +
40,0	20	2,10 (42) +	0,05 (01) i	0,05 (01) i	2,20 (44) +
Uretano					
10,0	20	3,65 (73) +	0,40 (08) i	0,15 (03) i	4,20 (84) +
<b>Cruzamento HB</b>					
Cimento Portland					
00,0	20	0,55 (11)	0,15 (03)	0,05 (01)	0,75 (15)
10,0	20	0,90 (18) i	0,15 (03) i	0,00 (00) i	1,05 (21) i
20,0	20	1,20 (24) +	0,30 (06) i	0,10 (02) i	1,60 (32) +
40,0	20	1,35 (27) +	0,10 (02) i	0,05 (01) i	1,50 (30) +
Uretano					
10,0	20	7,10 (142) +	1,00 (20) +	1,00 (20) +	9,10 (182) +

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância:  $\alpha = \beta = 0,05$ . <sup>b</sup> Incluindo manchas simples flr<sup>3</sup> raras.



**Figura 5.1** Distribuição do tamanho de manchas simples após o tratamento crônico com diferentes concentrações de Pro Root MTA® (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL) e uretano (10 mM). **A)** Cruzamento padrão (ST); **B)** Cruzamento de alta bioativação (HB).

A



B

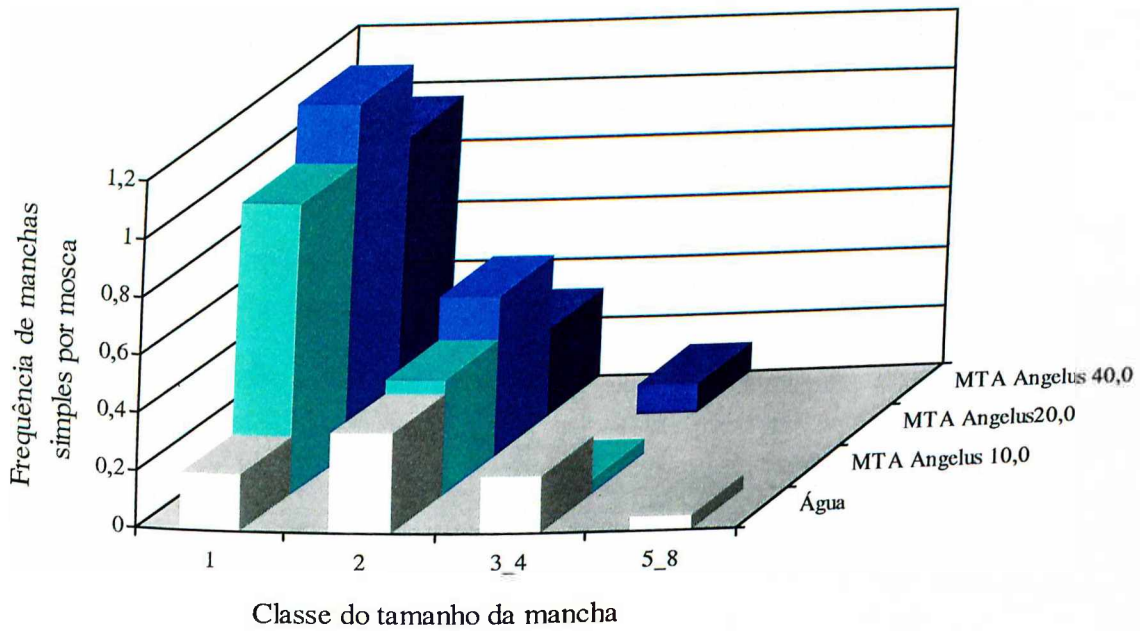
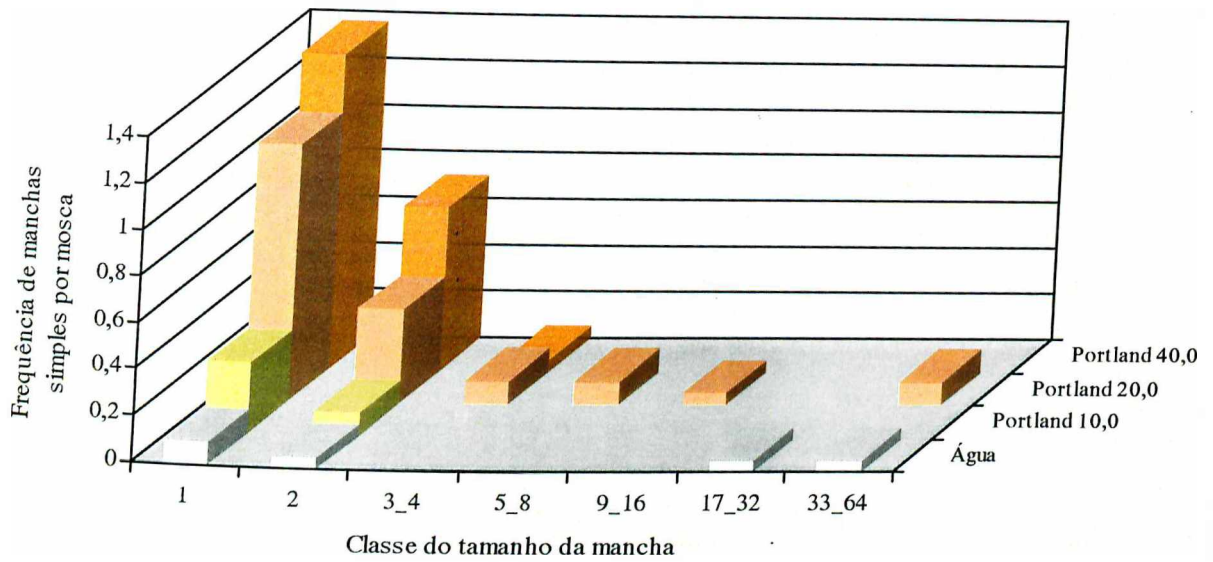


Figura 5.2 Distribuição do tamanho de manchas simples após o tratamento crônico com diferentes concentrações de MTA Angelus (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL). A) Cruzamento padrão (ST); B) Cruzamento de alta bioativação (HB).

A



B

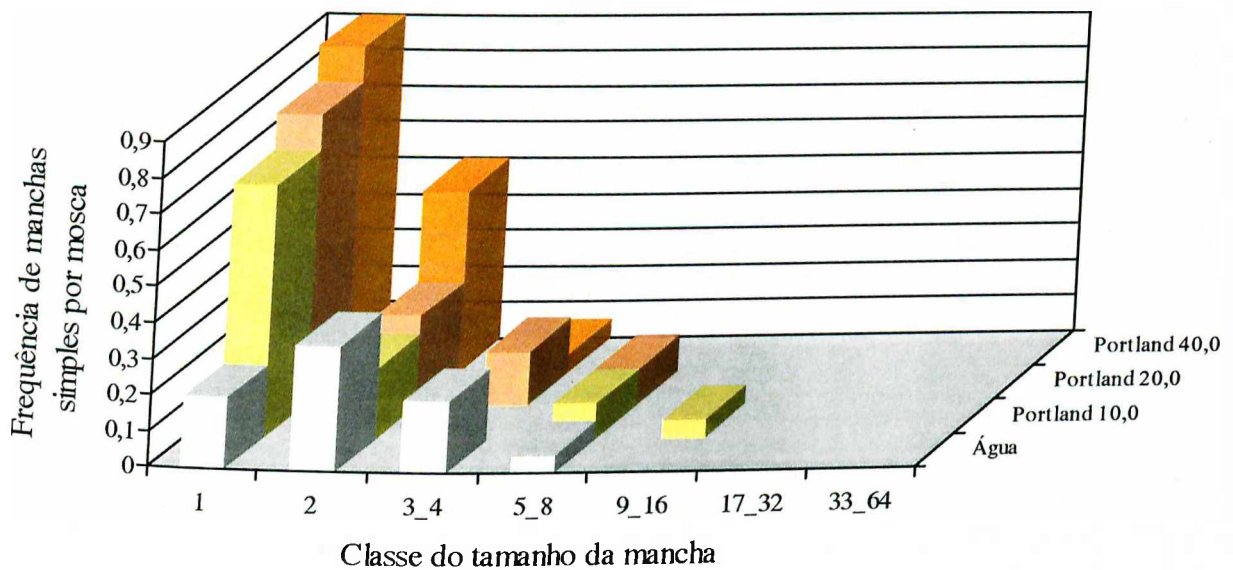


Figura 5.3 Distribuição do tamanho de manchas simples após o tratamento crônico com diferentes concentrações de cimento Portland (10,0; 20,0 e 40,0 mg/mL). A) Cruzamento padrão (ST); B) Cruzamento de alta bioativação (HB).

## 6. Discussão

Considerando-se que os cimentos endodônticos não mantêm contato somente com o cimento e a dentina (tecidos pobre em células), mas também com tecidos periapicais (osso e ligamento periodontal) e podem, acidentalmente, penetrar no seio maxilar e canal mandibular, a avaliação da compatibilidade biológica deste material é essencial, uma vez que esses produtos deverão exercer suas funções específicas, sem, contudo, causar danos ou prejuízos aos pacientes.

Os testes iniciais de biocompatibilidade avaliam, entre outros parâmetros, a genotoxicidade do composto. A avaliação genotóxica é um parâmetro importante devido à correlação existente entre a capacidade de uma substância induzir mutação ou dano cromossômico, e desenvolvimento de uma neoplasia. Por outro lado, é também importante como base de referência para a regulamentação clínica do produto testado.

A avaliação da genotoxicidade de produtos odontológicos normalmente é realizada por meio do teste de Ames em bactérias. Este teste está incluído nas especificações da American Dental Association, assim como nas especificações do International Dental Federation's Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials.

O teste de Ames tem por objetivo avaliar a capacidade de determinados compostos químicos ou misturas complexas induzirem mutações no genoma de linhagens de *Salmonella typhimurium*, organismo procarioto, através da reversão do fenótipo histidina negativo (*his*) para histidina positivo (*his*<sup>+</sup>) na presença ou ausência de sistemas metabólicos de ativação. Este sistema metabólico não é intrínseco da linhagem, mas é incluído por uma fração microssomal de fígado de rato (S9), um sistema de ativação enzimática, que permite a avaliação dos metabólitos da substância em teste.

Dentre os produtos utilizados na odontologia, que foram avaliados pelo teste de Ames, estão diferentes tipos de adesivos dentinários (Bey *et al.*, 1994) e outros cimentos endodônticos (Örstavik & Hongslo, 1985; Stea *et al.*, 1994), incluindo-se os compostos à base de agregado de trióxido mineral (MTA) (Kettering & Torabinejad, 1995). Os compostos à base de MTA apresentaram resultados negativos, o que permitiram concluir que os mesmos não possuem efeitos genotóxicos (Kettering & Torabinejad, 1995),



Resultados positivos obtidos no teste de Ames, quando avaliados isoladamente, não são suficientes para determinar a carcinogenicidade de um material. Da mesma forma, compostos sem potencial carcinogênico, em animais e humanos, podem ser mutagênicos quando avaliados por este teste (Ames, 1975). Além disso, é possível observar resultados falsos negativos, quando o composto for um promutágeno e o sistema de metabolização for ineficaz (Prival, 1983).

Mesmo frente a resultados negativos, como os encontrados com os compostos à base de MTA por Kettering & Torabinejad (1995), faz-se necessário utilizar outros testes de mutagenicidade de curta duração, assim como de estudos de carcinogenicidade animal, para a confirmação do potencial mutagênico/carcinogênico de um determinado produto.

Os testes de genotoxicidade realizados com *D. melanogaster* são caracterizados pela rapidez, quando comparado com os demais testes *in vivo* com organismos procariotos e eucariotos, apesar de terem a mesma importância que os testes realizados com organismos eucariotos (Vogel *et al.*, 1999).

O teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas de *D. melanogaster* (SMART) tem sido amplamente utilizado na detecção de agentes genotóxicos (Spanó *et al.*, 2001). Um aspecto importante da aceitabilidade do SMART é o fato da detecção de xenobióticos que necessitam de ativação metabólica. Linhagens constituídas por altos níveis de citocromo P450, proporcionam um estudo mais sensível para várias classes de prómutagenos e procarcinógenos. Assim sendo, a *D. melanogaster* é um organismo eucarioto que se assemelha ao sistema enzimático do mamífero, embora as atividades não sejam tão altas como as do fígado humano (Frolich & Würigler, 1989).

As enzimas de metabolização, enzima citocromo P450, são responsáveis pela detoxificação ou ativação e excreção de diferentes toxinas químicas, agentes genotóxicos e carcinogênicos. (Chroust *et al.*, 2001).

O SMART foi empregado neste estudo, para a avaliação genotóxica dos compostos à base de MTA: ProRoot MTA®; MTA Angelus® e cimento Portland (cimento Tocantins - Brasília (DF), Brasil), uma vez que, comprovadamente, possui alta sensibilidade e alta especificidade (Frei & Würigler, 1995; Graf *et al.*, 1984).

Prómutagenos são substâncias que apresentam maiores frequências de manchas mutantes quando submetidas ao cruzamento HB, após serem ativadas por citocromo P450 (Frölich & Würigler, 1989; Graf & van Schaik, 1992).

O uretano é um conhecido promutágeno, metabolicamente ativado pelo sistema enzimático citocromo P450, especialmente CYP6A2. Neste experimento, o uretano foi utilizado como controle positivo, induzindo aumento estatisticamente significativo para as três categorias de manchas mutantes ( $P < 0,05$ ) para ambos cruzamentos.

Neste experimento, nenhum dos compostos à base de MTA apresentou aumento na frequência de manchas mutantes no cruzamento HB, quando comparado com os resultados observados no cruzamento ST. Conclui-se que, esses compostos teste não são ativados via citocromo P450. Os resultados sugerem que a enzima citocromo P450 teve ação detoxificante para os três materiais, uma vez que foi observada redução da genotoxicidade dos descendentes, assim como redução de manchas grandes nos diferentes agentes testados. (Figuras 5.1, 5.2 e 5.3)

Neste trabalho, a frequência total de manchas por mosca observada no controle negativo do cruzamento HB (0,75) foi ligeiramente maior que a frequência observada no cruzamento ST (0,25). Estes resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que, as frequências de manchas espontâneas encontradas no cruzamento HB são, geralmente, mais elevadas que as frequências observadas no cruzamento ST (Graf & van Schaik, 1992; Lehmann *et al.*, 2000; Cunha *et al.*, 2001).

As Figuras 5.1. A e 5.1. B mostram a distribuição do tamanho das manchas simples, observada após o tratamento crônico com uretano, para ambos cruzamentos, onde é possível observar o predomínio de manchas pequenas simples e o decréscimo na frequência de manchas grandes, de acordo com o aumento do tamanho. Estes dados estão de acordo com aqueles apresentados por Graf *et al.* (1984); Spanó *et al.* (2001) e Souza *et al.* (2003), quando testaram diferentes compostos químicos.

Manchas gêmeas são produzidas exclusivamente por recombinação mitótica, ao passo que manchas simples são formadas a partir de diferentes tipos de eventos genotóxicos, tais como mutação, aberração cromossômica (deleção) e recombinação. Manchas pequenas simples podem ser conseqüências de eventos espontâneos, ou aberrações cromossômicas (Graf *et al.*, 1992).

No presente estudo, a baixa frequência de manchas gêmeas induzidas pelos compostos à base de MTA (ProRoot MTA®; MTA Angelus® e cimento Portland), em ambos cruzamentos (ST e HB), nos permite sugerir que esses compostos não possuem atividade recombinogênica. No entanto, isto somente poderá ser confirmado após a análise de manchas mutantes induzidas nos descendentes heterozigotos balanceados.

O tamanho da mancha reflete o número de divisões mitóticas ocorridas após a indução da alteração genética (Graf *et al.*, 1984). Assim, a diferença dos tamanhos das manchas nos diferentes agentes testados, corresponde ao mecanismo de ação diferentes deste materiais, apesar de apresentarem composição química semelhantes.

No cruzamento de alta bioativação utilizando o Pro Root MTA® (Figura 5.1.B) é possível visualizar presença de manchas grandes até a classe 33-64. Enquanto que para os materiais MTA Angelus® e cimento Portland, observa-se redução da manchas grandes. (Figuras 5.2.B e 5.3.B). Esta redução é o reflexo da diminuição da ação do agente depois da metabolização do mesmo.

As Tabelas 5.1; 5.2 e 5.3 mostram alguns resultados considerados inconclusivos pelo teste estatístico empregado. De acordo com Frei & Würigler (1995), para que não existam resultados inconclusivos, a amostra adequada deve ser de 55 indivíduos, o que corresponde a 110 asas analisadas (aproximadamente  $2,75 \times 10^6$  células de asas analisadas por série de tratamento).

Devido ao fato dos compostos à base de MTA serem misturas complexas, faz-se também necessário analisar isoladamente cada um de seus principais constituintes, para que possamos verificar quais componentes de suas fórmulas são os principais responsáveis pela indução dos efeitos genotóxicos detectados.

## 7. Conclusões

O presente estudo e artigos preliminares demonstram que a *D. melanogaster* é um sistema eucariótico versátil para a determinação da atividade genotóxica de compostos químicos *in vivo*.

Os resultados dos nossos experimentos permitem concluir que compostos à base de MTA são agentes genotóxicos diretos (não necessitam de ativação metabólica) e a genotoxicidade do cimento Portland é superior ao MTA Angelus® e este por sua vez é superior ao ProRoot MTA®.

Os resultados sugerem que compostos à base de MTA são agentes mutagênicos, mas não recombinogênicos. Além disso, o sistema enzimático citocromo P450 tem ação detoxificante contra efeitos genotóxicos do MTA.

Os resultados inconclusivos obtidos na análise estatística indicam ser necessário aumentar o número amostral (55 moscas por tratamento) para que possam ser obtidos resultados conclusivos.

Os resultados positivos obtidos na análise estatística indicam que é necessário analisar os descendentes com asa serrilhada, para que possam ser calculadas as taxas de recombinação induzidas pelos compostos à base de MTA.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, S.K.; GRAF, U. Protection by coffee against somatic genotoxicity in *Drosophila*: role of bioactivation capacity. *Food Chem. Toxicol.*, v.34, p. 1-14, 1996.
- AMES, J.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella*/ mammalian microsome mutagenicity tests. *Mutat. Res.*, v.31, p. 347-364, 1975.
- BAARS, A.J. Biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster* and its relevance for mutagenicity testing. *Drug. Metab. Rev.* v.11, p. 191-221, 1980.
- BERNABÉ, P.F.E.; HOLLAND, R. Cirurgia parentodôntica: quando indicar e como realizá-la. In: Gonçalves, E.; Feller, C. *Atualização na Clínica Odontológica*. São Paulo. Artes Médicas, 1998.
- BERNABÉ, P.F.E.; HOLLAND, R. O emprego do MTA. Tratamento de perfurações (furca e raiz) e cirurgia parentodôntica. *Arquivo Dental Gaúcho*, v.9, n.2, p. 20-23, 2002.

- BEY, B.; SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, H. Mutagenicity of dentin bonding agents. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.28, p. 1061-1067, 1994.
- BRYANT, P.J. Cell lineage relationship in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, v.22, p. 389-411, 1970.
- CAIRNS, J. The origin of human cancers. *Nature*, v. 289, p. 353-357, 1981.
- CARVALHO, C.P.; OKAMOTO, T. *Cirurgia bucal*. Fundamentos experimentais aplicados à clínica. São Paulo: Panamericana, p. 97-102, 1987.
- COSTA, C.A.S. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: Estrela, C. *Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia*. 1ª ed. São Paulo: Artes Médicas, p. 147-160, 2001.
- CUNHA, K.S.; REGULY, M.A.; GRAF, U.; ANDRADE, H.H.R. Taxanes: the genetic toxicity of paclitaxel and docetaxel in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, v.16, p. 79-84, 2001.

DAPKUS, J.; MERRELL, D.J. Chromosomal analysis of DDT resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. v.87, p. 685-697, 1977.

ESTRELA, C.; BAMMAN, L.L.; ESTRELA, C.R.A.; SILVA, R.S.; PÉCORÁ, J.D. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz. Dent. J.*, v.11, n.1, p. 3-9, 2000.

FARACO JÚNIOR, I.M.; HOLLAND, R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent. Traumatol.*, v.17, n.4, p. 163-166, 2001.

FREI, H.; WURGLER, F.E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, v. 334, p. 247-258, 1995.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.*, v. 203, p. 297-308, 1988.

FRIEDMAN, S.; ROTSTEIN, L.; KOREN, L.; TROPE, M. Dye leakage in retrofilled dog teeth and its correlation with radiographic healing. *J. Endod.*, v, 17, n.8, p. 392-395, 1991.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F.E. New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, v. 216, p. 99-104, 1989.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F.E. The high bioactivation cross for the SMART assay wing. *Drosophila Inf. Serv.*, v.70, p. 246-247, 1991.

GERHARDS, F.; WAGNER, W. Sealing ability of five different retrograde filling materials. *J. Endod.*, v.22, n.9, p. 392-395, 1996.

GRAF, U.; ABRAHAM, S.K.; GUZMÁN-RINCÓN, J. AND WURGLER, F.E. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* v.402, n.1-2, p. 203-209, 1998.

GRAF, U.; BADOUX, M.; HOLLINGER, E. The carcinogen DAB is highly genotoxic in the improved high bioactivation cross of the *Drosophila* wing spot test (SMART). *Drosophila Inf. Serv.*, v.71, p. 235-6, 1992.



GRAF, U.; SINGER, D. Genotoxicity testing of promutagens in wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Rev. Int. Contam Ambient.*, v.8, p. 15-27, 1992.

GRAF, U.; VAN SCHAİK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, v.271, p. 59-67, 1992.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E. Investigation of coffee in *Drosophila* genotoxicity tests. *Food Chem. Toxic.*, v.24, p. 835-42, 1986.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.6, p. 153-188, 1984.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. Principles of Genetics. In: An Introduction to Genetic Analysis. Seventh edition . 2000. Disponível em: [http://www.mhhe.com/biology/desmid/brian/RIGI2250/Week\\_Que/FlyLife.jpg](http://www.mhhe.com/biology/desmid/brian/RIGI2250/Week_Que/FlyLife.jpg).

Acesso em: 28 maio de 2004.

GUZMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. *Biomonitoring and Biomarkers as indicators of environmental change*. New York, Plenum Press, p. 169-181, 1995.

HÄLLSTROM, I.; BLANCK A.; ATUMA, S. Genetic variation in cytochrome P450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Pharmacol.*, v.33, p. 13-20, 1984.

HÄLLSTROM, I.; BLANCK, A. Genetic variation in cytochrome P-450 system in *Drosophila melanogaster*. I - Chromosomal determination of some cytochrome P-450 dependent reactions. *Chem. Biol. Interact*, v.56, p. 157-171, 1985.

HOLLAND R.; BERNABÉ, P.F.E. MTA e cimento Portland: considerações sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas. In: Cardoso, R.J.A.; Machado, M.E.L. *Odontologia Arte e Conhecimento*. 1ª ed. São Paulo: Artes Médicas. cap. 11., p. 225-264, 2003.

HOLLAND, R.; DE SOUZA, V.; MURATA, S.S.; NERY, M.J.; BERNABÉ, P.R.; OTOBONI FILHO, J.A.; DEZAN JÚNIOR, E. 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. 109-113, 2001.

- KASTENBAUM, M.A.; BOWMAN, K.O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.*, v.9, p. 527-549, 1970.
- KATZ, A.J.; FOLEY, T.A. Effect of temperature on frequencies of spots in *Drosophila* wing-spot assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.22, p. 54-58, 1993.
- KETTERING, J.D; TORABINEJAD, M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root end fillings materials. *J. Endod.*, v.21, n.11, p. 537-539, 1995.
- LEE, S.J.; MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J. Endod.*, v.19, n.11, p. 541-544, 1993.
- LEHMANN, M.; GRAF, U.; REGULY, M.L.; DE ANDRADE, H.H.R. Interference of tannic acid on the genotoxicity of mitomycin C, methylmethanesulfonate, and nitrogen mustard in somatic cells of *Drosophila melanogaster* *Environ. Mol. Mutagen.*, v.36, n. 3, p. 195-200 2000.

- MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods of *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v.113, p. 173-215, 1983.
- ÖRSTAVIK, D.; HONGSLO, J.K. Mutagenicity of endodontic sealers. *Biomaterials*, v.6, p. 129-132, 1985.
- PRIVAL, M.J. The *Salmonella* mutagenicity assay: promises and problems. *Ann. N. J. Acad. Sci.*, v.407, p. 154-163, 1983.
- RUD, J.; ANDREASEN, J.O. A study of failures after endodontic surgery by radiographic, histologic and stereomicroscopic methods. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.*, v.1, p. 311-328, 1972.
- SAIDON, J.; HE, J.; ZHU, Q.; SAFAVI, K.; SPANBERG, L.S.W. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, v.95, p. 483-489, 2003.
- SANCHEZ, P.S. Ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella Typhimurium*. Teste de Ames. In: Rabello-Gay, M.N. *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios*

de avaliação. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/ Revista Brasileira de Genética, p. 13-33, 1991.

SOUZA, N.C.; CARVALHO, S.; SPANÓ, M.A.; GRAF, U. Absence of genotoxicity of a phytotherapeutic extract from *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 41, p. 293-299, 2003.

SPANÓ, M.A.; FREI, H.; WÜRGLER, F.E.; GRAF, U. Recombinagenic activity of four compounds in the Standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. *Mutagenesis*, v. 16, p. 385-394, 2001.

STEA, S.; SAVARINO, L.; CAIPETTI, G.; CENNI, E.; STEA, S.; TROTTA, F.; MOROZZI, G.; PIZZOFERRATO, A. Mutagenic potential of root canal sealers: Evaluation through Ames testing. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.28, p. 319-328, 1994.

TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J. Endod.*, v.25, p. 197-205, 1999.

TORABINEJAD, M.; HONG C.U.; PITT FORD, T.R.; KARIYAWASAM, S.P. Tissue reaction to implanted SuperEBA and mineral trioxide aggregate in mandible of guinea pigs: a preliminary report. *J. Endod.*, v.21, p. 569-571, 1995c.

TORABINEJAD, M.; HONG, C.U.; MCDONALD, F.; PITT FORD, T.R. Physical and chemical properties of new root end filling material. *J. Endod.*, v.21, p. 349-353, 1995b.

TORABINEJAD, M.; KOH, E.T.; MCDONALD, F., PITT FORD, T.R. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J. Endod.*, v.24, n.8, p. 543-547, 1998.

TORABINEJAD, M.; WATSON, T.F.; PITT FORD, T.R. The sealing ability of a mineral trioxide aggregate as a root end filling material. *J. Endod.*, v.19, p. 591-595, 1993.

TORABINEJAD, M.; WILDER SMITH, P.; PITT FORD, T.R. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root end filling materials. *J. Endod.*, v.21, p. 295-299, 1995a.

VALENCIA, R.; ABRAHAMSON, S.; LEE, W.R.; VON HALLE, E.S.; WOODRUFF, R.C.; WÜRGLER, F.E.; ZIMMERING, S. Chromosome mutation tests for mutagenesis in

*Drosophila melanogaster*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program. *Mutat. Res.*, v.134, p. 61-88, 1984.

VAN SCHAİK, N.; GRAF, U. Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, v.260, p. 99-104, 1991.

VOGEL, E.W. Genetical relationship between resistance to insecticides and procarcinogens in two *Drosophila* populations. *Arch. Toxicol.* v.43, p. 201-211, 1980.

VOGEL, E.W.; GRAF, U.; FREI, H.; NIVARD, M.M.J. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. In McGregor, D. B., Rice, J. M. and Venitt, S. (eds) The use of Short- and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation. IARC Scientific Publications n° 146. IARC, Lyon, p. 427-470, 1999.

VOGEL, E.W.; ZIJLSTRA, J.A. Mechanistic and methodological aspects of chemically-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, v.182, p. 243-264, 1987.

WUCHERPFENNIG, A.L.; GREEN, D.B. Mineral trioxide vs Portland cement: two biocompatible filling materials (abstract). *J. Endod.*, v.25, n.4, p. 308, 1999.

WÜRGLER, F.E. Recombination and gene conversion. *Mutat. Res.*, v.284, p. 3-14, 1992.

WÜRGLER, F.E., SOBELS, F.H.; VOGEL, E. *Drosophila* as an assay system for detecting genetic changes. In: Handbook of mutagenicity test procedure (B.J., KILBEY et al., EDS), 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier, Amsterdam p. 555-601, 1984.

YALTIRIK, M.; OZBAS, H.; BILGIC, B.; ISSEVER, H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J. Endod.*, v.30, n.2, p. 95-99, 2004.



## SUMMARY

Chemical agents have been submitted to Somatic Mutation And Recombination Tests (SMART) in *Drosophila melanogaster*. The SMART assays are important parameters of initial biocompatibility tests for dental materials used for different clinical purpose and that has direct contact with tissues which are rich in cells. The purpose of the present study was to investigate the genotoxic potential of mineral trioxide aggregate: ProRoot MTA®, MTA Angelus® (used to fill and to seal root canals in endodontic treatments) and Portland cement (which is available in masonry supply houses). The wing SMART was used for testing these materials. Two crosses were carried out to produce the experimental larval progeny: the Standard cross – ST (*flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>f</sup>* females crossed with *mwh* males) and the High bioactivation cross – HB (ORR: *flr<sup>3</sup>/TM3, Bd<sup>f</sup>* females crossed with *mwh* males). Each cross produces two types of progeny: marker heterozygous flies (MH) and balancer heterozygous flies (BH). In the wing of MH individuals, mutant spots can be originated from point mutation, deletion and recombinational events. For HB individuals, all mutant spots are due to mutation (point mutation and chromosomal aberrations) because recombinational events are suppressed in inversion-heterozygous cells with the multiply inverted TM3 balancer chromosome. The larval progeny of both crosses were tested with different concentrations of mineral trioxide aggregate (10.0; 20.0 and 40.0 mg/mL). Etilcarbamate (urethane) (10.0 mM) was used as positive control, while distilled water was used as negative control. The wings of the emerging adults flies were analysed for the occurrence of different types of mutant spots: single spots (*mwh* or *flr* phenotype) or twin spots (*mwh* clone adjacent to *flr* clone). Both the dorsal and the ventral surfaces of the wings were analysed under a compound microscope at 400X magnification. The statistical analyses used the binomial conditional test and the chi-square test, at the 5% significance level. The results were dose dependent, with positive results for small single spots and to total of single spots. These results suggest that, in these experimental conditions, the mineral trioxide aggregate is genotoxic but with weak mutagenic potential.