

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
“PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY”

AGTHA CHRISTIE MOREIRA SILVA

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DOIS CIMENTOS ENDODÔNTICOS À BASE
DE RESINA EPÓXI: CITOTOXICIDADE E DETECÇÃO DE BIOMARCADORES**

DUQUE DE CAXIAS
2018

AGTHA CHRISTIE MOREIRA SILVA

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DOIS CIMENTOS ENDODÔNTICOS À BASE DE RESINA EPÓXI: CITOTOXICIDADE E DETECÇÃO DE BIOMARCADORES

Dissertação apresentada à Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy” como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Endodontia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thais Accorsi Mendonça

DUQUE DE CAXIAS

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE/BIBLIOTECA - UNIGRANRIO

S586e Silva, Agtha Christie Moreira.

Estudo comparativo entre dois cimentos endodônticos à base de resina epóxi: citotoxicidade e detecção de biomarcadores / Agtha Christie Moreira Silva. – 2018.

36 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (mestrado em Odontologia com ênfase em endodontia) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2018.

“Orientadora: Profa. Thais Accorsi Mendonça”.

Bibliografia: f. 34-36.

1. Odontologia. 2. Endodontia. 3. Cimentos dentários. 4. Citotoxicidade. I. Mendonça, Thais Accorsi. II. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy. III. Título.

CDD – 617.6

Agtha Christie Moreira Silva

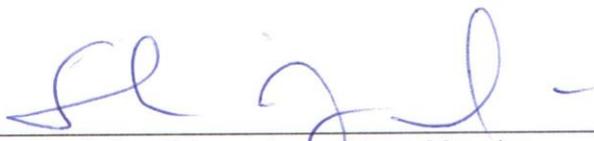
**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE DOIS CIMENTOS ENDODÔNTICOS À
BASE DE RESINA EPÓXI: CITOTOXICIDADE E DETECÇÃO DE
BIOMARCADORES**

Dissertação apresentada à Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy" UNIGRANRIO para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração*
Endodontia

Aprovada em 04 de junho de 2018

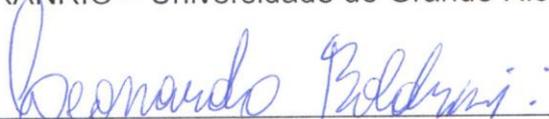
Banca Examinadora



Prof. Dr. Edson Jorge Lima Moreira
UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio



Prof. Dr. Henrique dos Santos Antunes
UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio



Prof. Dr. Leonardo da Cunha Boldrini Pereira
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível. ”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me possibilita novas conquistas e sempre me ampara a cada escolha.

À minha família por toda união e amor de sempre, em hipótese alguma eu seria capaz de ultrapassar todas as barreiras que a vida apresenta sem o apoio de cada um de vocês.

À toda equipe de Endodontia da Unigranrio, todos sempre foram solícitos a ajudar e auxiliar no crescimento e desenvolvimento profissional.

Aos funcionários da Unigranrio, em especial a secretária de Pós-Graduação Andreia Fagundes, por todo auxílio e comprometimento.

À minha orientadora Profa. Dra. Thais Accorsi Mendonça, a qual teve fundamental papel durante o meu mestrado, seja nas orientações que transcorriam ao longo dos módulos e principalmente nos momentos que acabavam por se distanciar do amplo científico por meio de conselhos que foram de extrema importância para mim.

Ao Laboratório Multidisciplinar em Pesquisa (LAMP) através da funcionária na Ana Beatriz Machado Lima.

Ao Laboratório de Bioengenharia Tecidual do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), em principal ao Prof. Dr. Paulo Emilio pelo auxílio.

Fica expresso aqui a minha imensa gratidão.

Obrigada!

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi detectar biomarcadores, bem como avaliar e comparar a citotoxicidade dos cimentos Sealer Plus (MK Life, Brasil) e AH Plus (Dentply, Alemanha). Para o ensaio citotóxico, osteoblastos humanos imortalizados da linhagem Saos-2 foram incubados com eluções dos materiais testados por um período de 24 horas, sendo a citotoxicidade determinada pela contagem de células viáveis utilizando-se o ensaio colorimétrico MTT. No grupo controle, células foram expostas ao meio convencional de cultura celular. Os dados foram testados em uma distribuição normal pelo teste de Kolmogorov–Smirnov, e as comparações entre grupos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste Kruskal - Wallis. O valor de P considerado significativo foi de < 0.05 . Para o ensaio de biomarcadores, foi utilizado o imunoEnsaio Luminex que permite a avaliação de diferentes biomarcadores em um único experimento. Os alvos foram delineados através do kit Bio-Plex Pró Human Cytokine 27-Plex Immunoassay, a placa selecionada detecta citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que estão envolvidas em processos inflamatórios. Os dados obtidos através da leitura da placa pelo sistema Bio-Plex® MAGPIX™ foram submetidos à análise estatística utilizando-se o software GraphPad Prism. Os dados foram expostos a comparações entre grupos através do teste T de student. Foram considerados os valores de $p < 0,05$; $p < 0,001$ e $p < 0,001$. Os resultados evidenciaram que não houve diferença estatisticamente significativa de citotoxicidade entre os cimentos Sealer Plus e AH Plus testados e grupo controle ($p > 0,05$). Os biomarcadores detectados de forma estatisticamente significativa entre os grupos foram IL-1ra, IL-8, GM-CSF e basic FGF. De acordo com os resultados obtidos, os analitos IL-1Ra e IL-8 apresentam maior dosagem em resposta ao cimento AH Plus, enquanto que o Sealer Plus evidenciou maiores dosagens de b-FGF e GM-CSF. Conclui-se que o Sealer Plus apresenta citocompatibilidade similar ao grupo controle, contudo sugere-se um maior potencial inflamatório do Sealer Plus quando comparado ao AH Plus, em relação ao analitos estudados.

Palavras-chave: Biomarcadores, Citotoxicidade, Osteoblastos, Citocinas, Quimiocinas, Imunoensaio.

ABSTRACT

The objective of the present study was to detect biomarkers, as well as to evaluate and compare the cytotoxicity of Sealer Plus (MK Life, Brazil) and AH Plus (Dentsply, Germany) cements. For the cytotoxic assay, the immortalized human osteoblasts of the Saos-2 lineage were incubated with the dosages of the tested materials for a period of 24 hours, one of the highlights being the use of colorimetric assays by the MTT method. In the control group, cells were exposed to the conventional cell culture medium. Data were tested in a normal distribution by the Kolmogorov-Smirnov test, and comparisons between groups were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by the Kruskal-Wallis test. The P value considered significant was <0.05 . For the biomarkers test, we used the Luminex immunoassay that allows the evaluation of different biomarkers in a single experiment. The targets were delineated through the Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex Immunoassay kit, the selected plate detects cytokines, chemokines and growth factors, which are involved in inflammatory processes. The data obtained by reading the plate by the Bio-Plex® MAGPIX™ system were subjected to statistical analysis using GraphPad Prism software. The data were exposed to comparisons between groups through the student T test. The values of $p < 0.05$; $p < 0.001$ and $p < 0.001$. The results showed that there was no statistically significant difference in cytotoxicity between the Sealer Plus and AH Plus tested cements and the control group ($p > 0.05$). The biomarkers detected statistically significant between the groups were IL-1ra, IL-8, GM-CSF and basic FGF. According to the results, IL-1Ra and IL-8 analytes present higher dosage in response to AH Plus cement, whereas Sealer Plus showed higher dosages of b-FGF and GM-CSF. It is concluded that Sealer Plus presents cytocompatibility similar to the control group, however, it is suggested a greater inflammatory potential of Sealer Plus when compared to AH Plus, in relation to the analytes studied.

Keywords: Biomarkers, Cytotoxicity, Osteoblasts, Cytokines, Chemokines, Immunoassay.

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

Figura 01	Representação esquemática do imuno ensaio.	18
Figura 02	Apresentação comercial do A) AH Plus e B) Sealer Plus.	21
Figura 03	A) Bio-Plex Pro™ Wash Station B) Bio-Plex® MAGPIX	25
Tabela 01	Composição dos materiais endodônticos utilizados no presente estudo	21
Tabela 02	Distribuição dos resultados de acordo com a diferença estatística entre os cimentos estudados.	27
Gráfico 01	Citotoxicidade do grupo controle e dos cimentos experimentais Sealer Plus e AH Plus	26
Gráfico 02	A) IL-1ra: diferença estatisticamente significativa (**p<0,01: seta azul); B) IL-8: diferença estatisticamente significativa (**p<0,01: seta azul).	28
Gráfico 03	A) GM-CSF: diferença estatisticamente significativa (*p<0,05: seta vermelha, ***p<0,001: seta preta); B) b-FGF: diferença estatisticamente significativa (*p<0,05: seta vermelha).	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS (INGLES \ PORTUGUES)

ADA	American Dental Association
bFGF	basic Fibroblast Growth Fator \ Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
G-CSF	colony stimulating fator \ Fator estimulador de colônias granulocitárias
IFN- γ	interferon-gamma \ Interferon- gama
IL-1 β	Interleukin-1b \ Interleucina-1 beta
IL-1ra	Interleukin-1 receptor antagonist \ Antagonista de receptor de interleucina 1
IL-2	Interleukin-2 \ Interleucina-2
IL-4	Interleukin- 4 \ Interleucina-4
IL-5	Interleukin-5 \ Interleucina-5
IL-6	Interleukin-6 \ Interleucina-6
IL-7	Interleukin-7 \ Interleucina-7
IL-8	Interleukin-8 \ Interleucina-8
IL-9	Interleukin-9 \ Interleucina-9
IL-10	Interleukin-10 \ Interleucina-10
IL-12p70	Interleukin-12p70 \ Interleucina-12p70
IL-13	Interleukin-13 \ Interleucina-13
IL-15	Interleukin-15 \ Interleucina-15
IL-17	Interleukin-17 \ Interleucina-17
IP-10	IFN-g inducible protein 10 \ Interferon gama induzido por proteína 10
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1 \ Proteína quimiotática para monócitos-1
MIP-1 α	macrophage inflammatory protein-1 α \ Proteína inflamatória de macrófagos-1 alfa
MIP-1 β	macrophage inflammatory protein-1 β \ Proteína inflamatória de macrófagos-1 beta
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
PDGF-BB	Platelet Derived Growth Factor- BB \ Fator de crescimento derivado de plaquetas
TNF- α	Tumor necrosis factor a \ Fator de necrose tumoral – alfa

VEGF vascular endothelial growth factor \ Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Citotoxicidade de cimentos endodônticos	15
2.2	Imuno Ensaio	17
3	OBJETIVOS	20
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Composição e manipulação dos materiais testados	21
4.2	Cultura celular	22
4.3	Preparo do estrato	22
4.4	Ensaio de citotoxicidade	23
4.5	Biomarcadores – Imuno Ensaio	23
5	RESULTADOS	26
5.1	Citotoxicidade	26
5.2	Luminex – Imuno Ensaio	26
6	DISCUSSÃO	29
7	CONCLUSÃO	33
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

O sucesso da Endodontia atual baseia-se em correto diagnóstico e plano de tratamento; conhecimento da anatomia e morfologia; debridamento; desinfecção completa e obturação, restauração coronária e a imagem tridimensional de reparação em casos de lesões perirradiculares (Hargreaves e Berman, 2017). Ng *et al.*, em 2008, avaliaram os fatores preponderantes na eficácia do tratamento endodôntico através de uma meta-análise, sendo os mesmos: ausência de lesão perirradicular, obturação uniforme do canal radicular, obturação 2,0 mm aquém do ápice e restauração coronária adequada.

A associação guta percha e cimento obturador apresenta-se ainda como a abordagem amplamente utilizada. São várias as características de um bom cimento endodôntico: selamento hermético do sistema de canais radiculares; estabilidade dimensional; fácil inserção e remoção do canal radicular; bom tempo de trabalho; efeito bactericida ou bacteriostático; ser biocompatível; radiopaco; bom escoamento; não manchar a estrutura dentária; adesividade às paredes do canal; impermeável; solúvel ou reabsorvível quando presente nos tecidos perirradiculares (Grossman, 1958; Lopes e Siqueira Jr., 2015). Não há ainda no mercado um material que atenda a todos estes princípios estabelecidos.

Contudo, o cimento à base de resina epóxica AH Plus (Dentsply\De Trey, Konstanz, Alemanha) apresenta-se como um padrão-ouro em pesquisas comparativa devido às excelentes propriedades físico-químicas (Sá Neto, 2012; Zhou *et al.*, 2013) e biológicas (Leonardo *et al.*, 2003; Senne *et al.*, 2009, Al-Hiyasat *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2017).

A empresa brasileira MK Life desenvolveu um novo cimento à base de resina epóxi, o Sealer Plus. De acordo com o fabricante, o mesmo apresenta uma viscosidade adequada para penetrar e selar o sistema de canais radiculares, com baixa contração no momento de presa o que evitaria espaços vazios dentro da massa obturadora.

Vertuan *et al.*, em 2018, realizaram um estudo comparativo entre os cimentos Sealer Plus e AH Plus. As seguintes propriedades foram estudadas: radiopacidade, escoamento, solubilidade e pH. Embora o Sealer Plus mostrou-se dentro das propriedades físico-químicas descritas pela ADA (American Dental Association)

houve diferenças de resultados entre os cimentos. O Sealer Plus se mostrou menos radiopaco do que o AH Plus apesar de apresentarem os mesmos agentes radiopacificadores. Os autores acreditam que a diferença na proporção dos radiopacificadores entre os cimentos explique o resultado inferior do Sealer Plus. Da mesma forma, o AH Plus mostrou-se superior com maior escoamento. Em relação a solubilidade e aumento de pH não houve diferenças significativas.

O estudo de propriedades biológicas para cimentos endodônticos apresenta-se como essencial devido ao contato deste biomaterial com os tecidos perirradiculares, seja através do foramen apical ou ainda as foraminas nos quais findam-se canais laterais, acessórios, dentre outros. O ensaio de citotoxicidade para cimentos endodônticos baseia-se em testes indiretos de eluição ou extratos, de acordo com a normativa ISO 10993-5. A citotoxicidade compõe um grupo de ensaios que revelam a biocompatibilidade geral de um material-teste, servindo como um passo inicial para testes clínicos e conseqüentemente uso terapêutico (Granjeiro & Soares, 2011).

Além da citotoxicidade comparativa entre os cimentos AH Plus e Sealer Plus, este trabalho ainda apresenta uma metodologia diferenciada no estudo de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento secretados por tais cimentos. A possibilidade de detecção de mediadores envolvidos nos processos inflamatórios em situações fisiológicas e patológicas permite compreender a comunicação celular. O recrutamento celular é de extrema importância no processo inflamatório para controle de infecção no tecido periapical (Pereira, 2012).

O objetivo deste trabalho foi um estudo comparativo entre dois cimentos endodônticos à base de resina epóxi, no que tange a citotoxicidade e detecção de biomarcadores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Citotoxicidade de cimentos endodônticos

A avaliação da citotoxicidade de cimentos endodônticos segue a normativa ISO 10993-5 (International Organization for Standardization: 10993 Biological Evaluation of Medical Device) e baseia-se em testes indiretos eluição ou extratos destes cimentos. Estes ensaios envolvem a pré-incubação do biomaterial em meio aquoso, e que tem o objetivo de simular a liberação de substâncias com possível efeito citotóxico nos fluidos biológicos aos quais o material estará exposto durante seu uso. Para a mensuração de células viáveis após o contato/ incubação entre as células e o extrato, utiliza-se um método colorimétrico, como por exemplo o MTT. O reagente MTT (brometo de difeniltetrazólio), amarelo, solubilizado em água, é metabolicamente reduzido nas células viáveis para um azul-violeta de formazano insolúvel. Em seguida, o formazano é solubilizado em álcool. Há uma correlação direta entre o número de células viáveis e a intensidade de cor determinada pela leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540nm (Granjeiro & Soares, 2011).

Os cimentos escolhidos nesta pesquisa são AH Plus (Dentsply, Alemanha) e Sealer Plus (MK Life, Brasil). Ressalta-se que já existiu no mercado um outro cimento com o mesmo nome de Sealer Plus, sendo este também da empresa Dentsply, e que difere da composição química do cimento aqui proposto a ser estudado.

A literatura científica é ampla quanto a dados do cimento endodôntico AH Plus. Em 1999, Leyhausen *et al.*, realizaram um estudo com vários ensaios *in vitro* a fim de avaliar efeitos genotóxicos e citotóxicos do AH Plus, em cultura de fibroblastos do ligamento periodontal humano. Os resultados demonstraram um cimento sem efeitos genotóxicos ou mutagênicos e mostrando-se citocompatível.

Desde então, o AH Plus vem sendo comparado a diferentes cimentos endodônticos, em ensaios de citotoxicidade, como um padrão-ouro. Também com cultura de fibroblastos (L-929), em 2007, Pinheiro comparou três diferentes cimentos à base de resina epóxi quanto a citotoxicidade: Sealer 26, AH Plus e Acroseal. Todos os cimentos apresentaram citotoxicidade, sendo que o AH Plus mostrou melhor comportamento biológico, demonstrando menor citotoxicidade.

A mudança de tipo celular utilizada no ensaio de citotoxicidade de cimentos endodônticos foi feita por Huang *et al.*, em 2002. Utilizando astrócitos cerebrais de ratos, os autores compararam o AH Plus com o cimento AH26 (Dentsply, Alemanha). O estudo *in vitro* mostrou que o cimento AH Plus é citotóxico dependendo de sua dose.

Pinna *et al.*, 2008 compararam a citotoxicidade do MetaSeal (Parkell Inc, Farmington, NY), AH Plus e Pulp Canal Sealer (SybronEndo, Orange, CA). O ensaio seguiu as normas ISO e apresentou 6 períodos experimentais de longa duração: 72 horas, 1, 2, 3, 4 e 5 semanas. Os cimentos Meta Seal e o AH Plus diminuíram a citotoxicidade durante os períodos testados, não apresentando citotoxicidade a partir da terceira semana.

Ehsani *et al.*, 2012 utilizaram duas linhagens celulares, MG-63 e Saos-2 para comparar a citotoxicidade dos cimentos 2Seal e AH Plus. Foram utilizados os ensaios de MTT e Trypan blue dye para testar viabilidade celular. A citotoxicidade foi observada para ambos os cimentos nas duas linhagens celulares. Na análise da Saos-2, não houve diferença estatística entre a toxicidade dos cimentos. Para a análise de MG-63, o extrato 2 Seal foi mais citotóxico em 24 horas e o AH Plus foi mais citotóxico em 72 horas.

Silva *et al.*, 2013 compararam a citotoxicidade dos cimentos MTA Fillapex e AH Plus pelo ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5 difenil tetrazolio para verificar a viabilidade das células Balb/c 3T3 em períodos de 1 a 4 semanas. O cimento MTA Fillapex demonstrou maior citotoxicidade quando comparado ao cimento AH Plus em todos os períodos testados. O cimento AH Plus apresentou leve citotoxicidade após 1 semana e tornou-se não citotóxico após 2 semanas, enquanto o MTA Fillapex demonstrou severa citotoxicidade nos períodos de teste.

Silva *et al.*, 2016 fizeram a contraposição de citotoxicidade do cimento MTA Fillapex com o cimento AH Plus utilizando células de osteoblastos humanos. Após 1 semana o cimento AH Plus não apresentava potencial citotóxico, já o MTA Fillapex permaneceu citotóxico mesmo após 4 semanas.

Marins *et al.*, 2017 avaliaram a citotoxicidade dos cimentos MTA Fillapex, Endoseal e AH Plus por meio de quatro diluições, sendo elas: 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8. Os espécimes foram expostos à cultura celular de fibroblastos humanos da linhagem

MRC-5 por 24 horas. Como resultado, na diluição 1:1 não houve diferença estatística entre os cimentos testados. O cimento AH Plus foi o que apresentou menor citotoxicidade na diluição 1:2 e o cimento MTA Fillapex apresentou maior potencial citotóxico nas diluições de 1:4 e 1:8.

Em 2017, Silva *et al.* avaliaram a citotoxicidade dos seguintes cimentos endodônticos: EndoSeal, EndoSequence BC Sealer e MTA Fillapex, tendo o AH Plus como cimento para referência. Os dados obtidos, os cimentos Seal, Endosequence BC Sealer e AH Plus apresentaram viabilidade celular semelhante ao grupo controle negativo, mostrando melhor citocompatibilidade quando comparados com o MTA Fillapex.

Troiano *et al.*, 2018 avaliaram a citotoxicidade de três cimentos endodônticos à base de resina epóxi, AH Plus, Sicura Seal e Top Seal. A citotoxicidade direta e indireta foi avaliada por ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio e ensaio de viabilidade / citotoxicidade em células semelhantes a osteoblastos MG63. Os testes de viabilidade celular demonstraram que todos os cimentos foram mais citotóxicos que o grupo controle. A citotoxicidade diminuiu durante o tempo, e após 7 dias os cimentos não eram citotóxicos quando comparados com o grupo controle.

2.2 Imuno Ensaio

O imunoEnsaio Luminex permite a avaliação de diferentes biomarcadores em um único experimento, baseado na ligação de microesferas magnéticas, e sua interação antígeno- anticorpo (Bio-Rad Laboratories, 2014). A Figura 01 representa o esquema detalhando esta interação, bem como toda a metodologia sequencial encontra-se melhor explicada no capítulo de material e métodos.

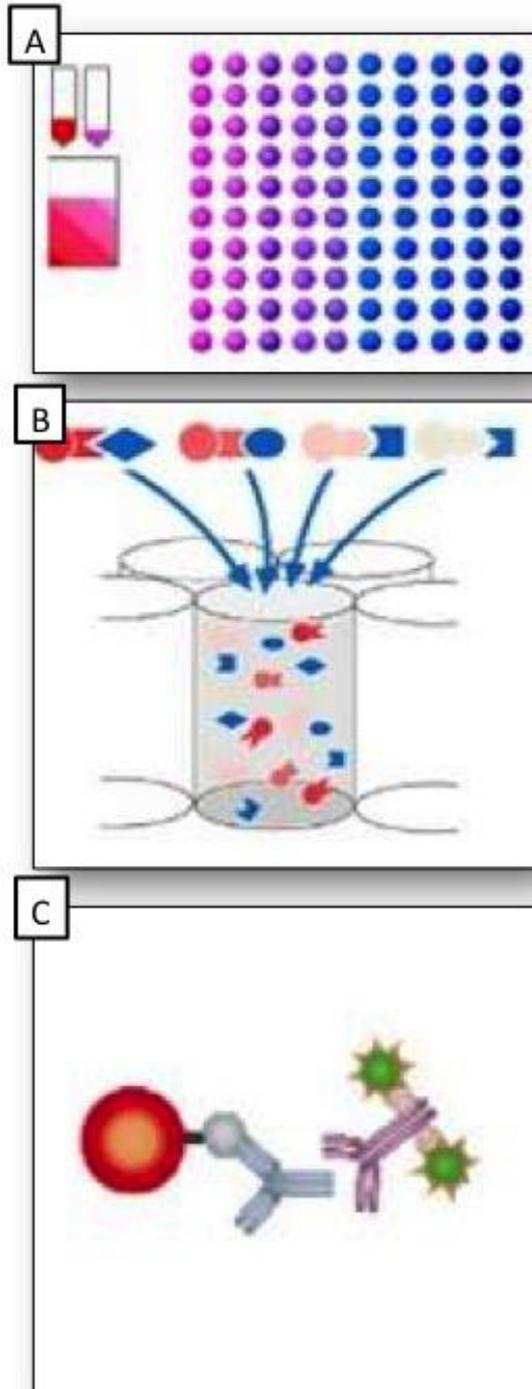


Figura 01: Representação esquemática do imunoensaio. Em A) observa-se a microplaca onde as colunas iniciais (rosa e roxo) são reservadas ao controle do ensaio e do experimento, obrigatórias em cada microplaca. O controle do ensaio é chamado de “blank” e apresenta-se com um meio (Buffer) já indicado no kit, enquanto que o controle das amostras é o meio condicionado convencional, sem exposição de células ao extrato do cimento endodôntico. As amostras estão representadas em azul. B) Observa-se um maior aumento um poço da microplaca, no qual são inseridas as microesferas magnética (beads) as quais contém anticorpos primários (de captura específicos, com o anticorpo secundário biotilado, sendo este chamado de anticorpo de detecção. Em C) A ligação da microesfera magnéticas-anticorpos primários-anticorpo secundário biotilado-estreptavidina ficoeritrina. Esta última molécula se liga a biotina do anticorpo secundário e age como um indicador fluorescente.

Esquema baseado em Ilustrações desenvolvidas por Luminex Corporation (<https://www.luminexcorp.com/>)

A placa Bio-Plex Pró Human Cytokine 27-Plex (Bio-Rad, EUA) selecionada para este estudo detecta citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que estão envolvidas em processos inflamatórios. As seguintes moléculas encontram-se especificadas nesta placa: bFGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α e VEGF (Bio-Rad Laboratories, 2014).

As citocinas são responsáveis por diversas ligações celulares, desempenhando importante papel em atividades biológicas como: proliferação, desenvolvimento, diferenciação, inflamação, regeneração e reparo (Lins *et al.*, 2010).

Quimiocinas são uma família de pequenas citocinas, com peso molecular variando de 7 a 15kDa. As quimiocinas e seus receptores são capazes de controlar a migração e a residência de células imunes. Algumas quimiocinas são consideradas pró-inflamatórias e podem ser induzidas durante a resposta imune no sítio de infecção, enquanto outras são consideradas homeostáticas e estão envolvidas no controle da migração celular durante o desenvolvimento ou a manutenção dos tecidos. Existem duas grandes subfamílias de quimiocinas baseadas na posição dos resíduos de cisteínas: CXC e CC. Como regra geral, membros da família de quimiocinas CXC são quimiotáticos de neutrófilos, e as quimiocinas CC são quimiotáticos de monócitos e subtipos de linfócitos, apesar de existirem algumas exceções (Palomino e Marti, 2015).

E fatores de crescimento são um conjunto de substâncias, a maioria de natureza proteica que juntamente com hormônios e neurotransmissores, desempenham uma importante função na comunicação intercelular. A função principal dos fatores de crescimento é o controle externo do ciclo celular. A função dos fatores de crescimento não é somente a de estimular a proliferação celular mediante a regulação do ciclo celular, iniciando a mitose, mas também a de manter a sobrevivência celular, estimular a migração celular, a diferenciação celular e também a apoptose. Em exemplo clássico é o EGF (fator de crescimento endotelial) estimula a diferenciação de vasos sanguíneos (Lins *et al.*, 2010; Abbas, 2011).

3. OBJETIVOS

- 1) Avaliar os efeitos de exposição dos cimentos endodônticos AH Plus (Dentsply, Alemanha) e Sealer Plus (MK Life, Brasil), sobre osteoblastos humanos imortalizados.
- 2) Detectar proporção de biomarcadores em resposta aos cimentos testados.
- 3) Avaliar a citotoxicidade entre os cimentos Sealer Plus (MK Life, Brasil) e AH Plus (Dentsply, Alemanha), comparando com o grupo controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Composição e manipulação dos materiais testados

Os materiais comerciais AH Plus e Sealer Plus (Figura 02) foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes. A Tabela 01 descreve composição dos materiais avaliados.



Figura 02: Apresentação comercial do A) AH Plus e B) Sealer Plus.

Tabela 01. Composição dos materiais endodônticos utilizados no presente estudo.

Material	Composição
AH PLUS (Dentsply, Konstanz, Alemanha)	<p>Pasta A: Resina Epóxi de Bisfenol-A; Resina Epóxi de Bisfenol-F; Tungstato de cálcio; Óxido de zircônio; Sílica; Óxido de ferro.</p> <p>Pasta B: Amina Adamantada; N,N"- Dibenzil-5-oxanonane-diamina-1-9; TCD-Diamina; Tungstato de cálcio; Óxido de zircônio; Sílica; Óleo de silicone.</p>

Sealer Plus
(MK Life, Brasil)

Pasta base:

Bisfenol A-co-epiclorohidrina;
Bisfenol F resina epóxi;
Óxido de zircônia;
Silicone e siloxanos;
Óxido de ferro;
Hidróxido de cálcio.

Pasta catalizadora:

Hexametilenotetramina;
Óxido de zircônio;
Silicone e siloxanos;
Hidróxido de cálcio
Tungstato de cálcio.

4.2. Cultura Celular

Linhagem de osteoblastos humanas (linhagem Saos-2) foi obtida através do Banco Brasileiro do Rio de Janeiro e cultivada em meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle medium/ Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS/ Gibco, Grand Island, NY, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 mg/mL de penicilina. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As células confluentes foram tripsinizadas com 0.25% de tripsina e 0,05% de EDTA (Gibco, Grand Island, NY, USA) por 5 minutos e posteriormente as alíquotas foram replaqueadas.

4.3. Preparo do Extrato

Sob condições assépticas e dentro da câmara, os corpos de prova foram preparados de acordo com as instruções do fabricante e inseridos em anéis de teflon medindo 5 mm de diâmetro e 2mm de altura, segundo preconizado pela norma ISO 10993-12. Após a inserção dos materiais nos anéis, os mesmos foram mantidos por 24 horas em estufa a 37°C para a presa dos materiais. Após 24 horas, os anéis de teflon foram removidos e cada espécime de material foi acomodado em poços de placas de 48 poços na qual foram inseridos 1,5 mL de meio DMEM suplementado em cada poço a fim de produzir um extrato deste cimento. O extrato foi obtido em estufa a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, o extrato de cada grupo foi removido e armazenado em temperatura de -20°C.

4.4. Ensaio de citotoxicidade

Para o ensaio, as células foram plaqueadas em uma concentração de 5×10^4 células por poço em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) para atingir a confluência desejada de aproximadamente 80%. Após o cultivo celular por 24 horas, ou seja, com as células aderidas, as mesmas foram expostas diretamente por 24 horas ao extrato não diluído, feito com os cimentos endodônticos AH Plus e Sealer Plus. O grupo controle não foi exposto ao extrato, sendo utilizado o meio DMEM convencional suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 mg/mL de penicilina.

Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e em cada poço celular foi adicionado 0,1 mL da solução de MTT (Sigma, St Louis, MO, EUA) preparada com a concentração de 0,5 mg/mL, e mantidos durante 2 horas a 37°C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan resultantes da redução do MTT foram dissolvidos em 0,1 mL de DMSO puro. As placas foram agitadas por 05 minutos e incubadas no escuro por 5 minutos para estabilização da cor. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro automático (Epoch; Biosystems, Curitiba, PR, Brasil) a um comprimento de onda de 540 nm. Os valores da viabilidade celular foram expressos em porcentagem total, sendo o grupo controle em separado.

Os experimentos foram realizados seguindo a metodologia triplicata da triplicata. Os dados foram tratados estatisticamente através do software R versão 3.4.4 (Free Software Foundation, EUA). Os dados foram testados em uma distribuição normal pelo teste de Kolmogorov–Smirnov, e as comparações entre grupos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste Kruskal - Wallis. O valor de P considerado significativo foi de < 0.05 .

4.5. Biomarcadores- Luminex (Imuno Ensaio)

O imunoensaio inicia-se com a inserção de controles do experimento (“branco”) e a curva padrão da amostra. Em seguida são adicionadas à placa as esferas magnéticas (beads) diluídas em tampão, as quais contém anticorpos de captura específicos. Os alvos foram delineados através do kit Bio-Plex Pró Human Cytokine 27-Plex Immunoassay (Bio-Rad, EUA). Podem ser detectados as seguintes citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento: FGF basic, Eotaxin, G-

CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α e VEGF.

Em seguida, foi realizada a lavagem da placa na Bio-Plex Pro™ Wash Station (Figura 03-A), e em seguida as amostras são adicionadas à placa, criando uma interligação entre esfera-anticorpo de captura-amostra. A incubação, seguindo o protocolo, é feita por 12 horas (over night). Após este período, foram realizadas duas lavagens na estação de lavagem com posterior aplicação de anticorpo secundário ou chamado de detecção (biotinilado). Após a agitação da microplaca por 01 hora, houve adição de solução de lavagem e incubação por 10 minutos. Segue-se para uma nova lavagem na Bio-Plex Pro™ Wash Station e finalização com adição de estreptavidina ficoeritrina, a qual se liga a biotina e age como um indicador fluorescente. Após uma nova lavagem da microplaca, foi realizada a adição da solução do kit para ressuspender as esferas magnéticas presentes no ensaio. Para a leitura, a microplaca é inserida no sistema Bio-Plex® MAGPIX™ (Figura 03-B).

Os dados obtidos através da leitura da placa pelo sistema Bio-Plex® MAGPIX™ foram submetidos a análise estatística utilizando-se o software GraphPad Prism. Os dados foram expostos a comparações entre grupos através do teste t de student. Foram considerados os valores de $p < 0,05$; $p < 0,001$ e $p < 0,001$.

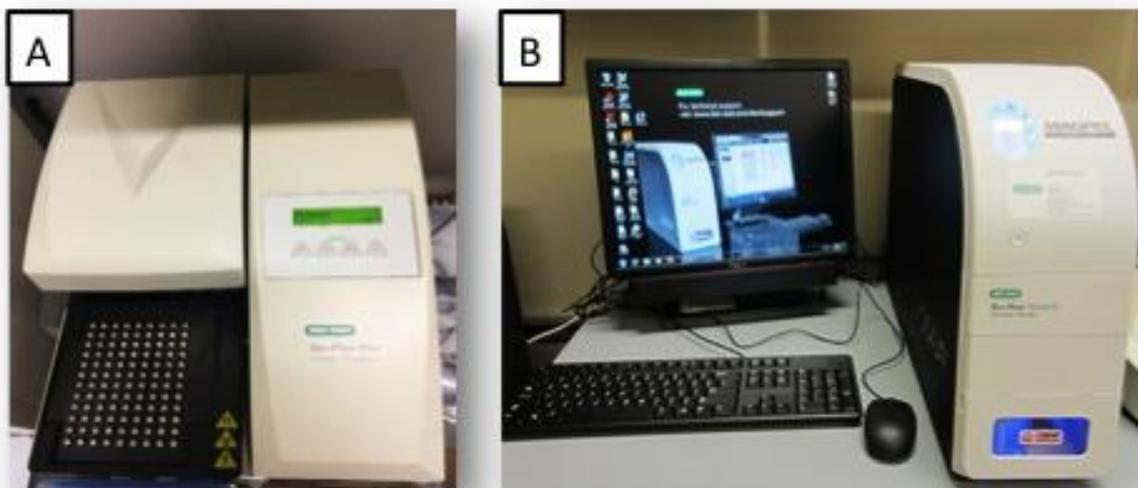


Figura 03: A) Bio-Plex Pro™ Wash Station B) Bio-Plex® MAGPIX™

5. RESULTADOS

5.1. Citotoxicidade

Os resultados do ensaio de citotoxicidade (colorimétrico-MTT) estão representados no Gráfico 01. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os materiais testados ($P>0.05$) e nem entre os materiais e o grupo controle ($P>0.05$).

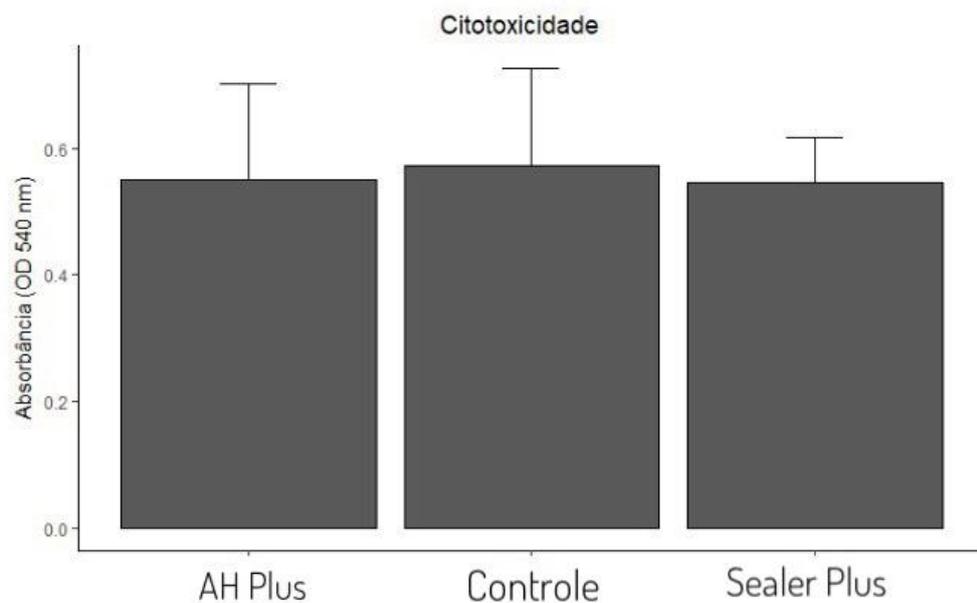


Gráfico 01: Citotoxicidade do grupo controle e dos cimentos experimentais Sealer Plus e AH Plus.

5.2. Luminex- Imuno Ensaio

Todos os analitos estudados estão representados na Tabela 02 e estão divididos em 1) não detectável; 2) não houve diferença entre os grupos e 3) houve diferença entre os grupos. Os resultados do imuno ensaio estão representados no Gráfico 02 e 03. Os biomarcadores detectados e com diferenças estatisticamente significantes são as interleucinas IL-1ra, IL-8, GM-CSF e FGF basic. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste t de Student, e o nível de significância está ligado aos desvios de comparação com os seguintes valores para p: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$.

Tabela 02: Distribuição dos resultados de acordo com a diferença estatística entre os cimentos estudados.

Alvos	Não detectável	Não houve diferença entre os grupos	Houve diferença entre os grupos
MIP-1 β		X	
IL-6		X	
IFN- γ	X		
IL-1ra			X
IL-5	X		
GM-CSF			X
TNF- α	X		
RANTES		X	
IL-2	X		
IL-1 β		X	
Eotaxin		X	
Basic FGF			X
VEGF		X	
PDGF-BB		X	
IP-10	X		
IL-13	X		
IL-4	X		
MCP-1	X		
IL-8			X
MIP-1 α		X	
IL-10		X	
G-CSF		X	
IL-15		X	
IL-7		X	
IL-12p70		X	
IL-17A		X	
IL-9	X		

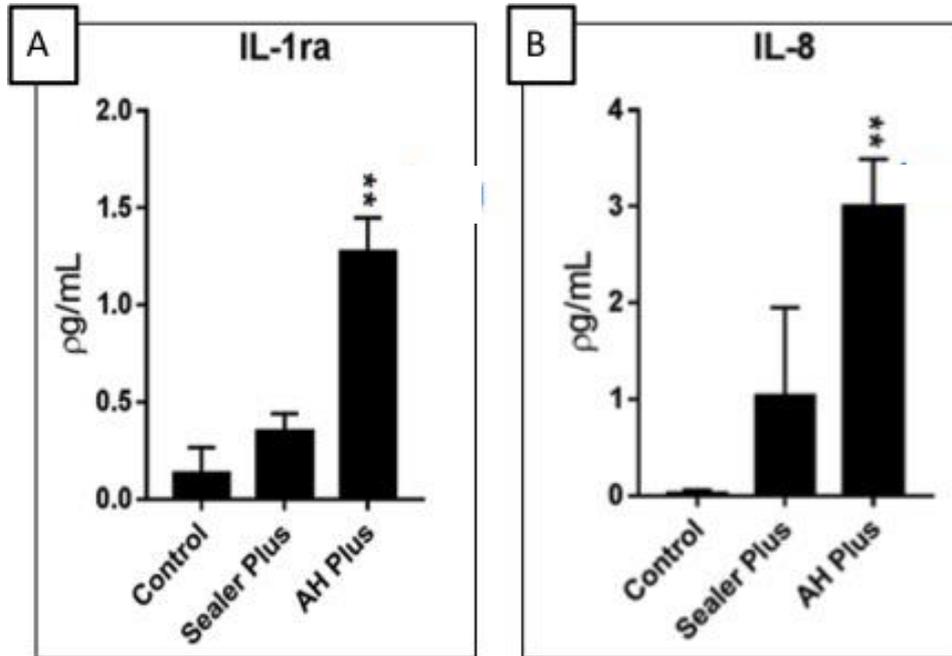


Gráfico 02: A) Citocina IL-1ra: diferença estatisticamente significativa (** $p < 0,01$); B) Quimiocina IL-8: diferença estatisticamente significativa (** $p < 0,01$).

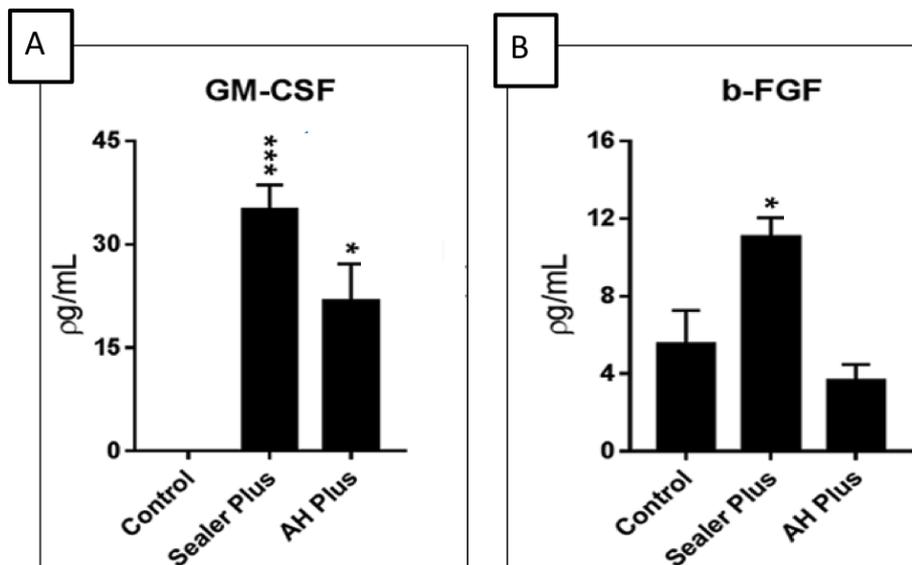


Gráfico 03: Fatores de crescimento A) GM-CSF: diferença estatisticamente significativa (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$); B) b-FGF: diferença estatisticamente significativa (* $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Sendo a adequada obturação um pilar para o sucesso endodôntico, o estudo e desenvolvimento de materiais obturadores apresenta-se como um tópico sempre enfático em diferentes pesquisas. A associação da guta percha e cimento obturador apresenta-se ainda como a escolha para uma obturação hermética. Exceto para o canal principal, o restante do sistema de canais radiculares somente pode ser preenchido com o cimento obturador, ressaltando assim a necessidade constante do estudo de propriedades físico-químicas e biológicas de diferentes formulações de cimentos endodônticos (Lopes e Siqueira Jr., 2015).

Cimentos endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol apresentam alta solubilidade e conseqüentemente falha no selamento de canais radiculares (Hargreaves e Berman, 2017). Na busca por melhoria destas propriedades, cimentos endodônticos à base de resina epóxi foram introduzidos na Endodontia por Shroeder em 1954, e desde então tem sido amplamente utilizado por apresentarem características como baixa solubilidade e boa capacidade de selamento apical (Sousa-Neto *et al.*, 2002; Carvalho-Jr *et al.*, 2003). Dos cimentos baseados em resina epóxi, a série AH foi a mais bem-sucedida sendo o cimento AH Plus o resultado do progresso (Ørstavik *et al.*, 2001).

Além da citotoxicidade comparativa entre os cimentos AH Plus e MK Life, este trabalho ainda apresenta uma metodologia diferenciada no estudo de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento secretados por tais cimentos. Através de um ensaio baseado em esferas magnéticas pode-se detectar tais biomarcadores em um único experimento. É importante o conhecimento da compatibilidade biológica dos cimentos obturadores, uma vez que, caso o mesmo apresente elevado potencial irritante aos tecidos periapicais, pode resultar em inflamação de maior porte comprometendo o sucesso do tratamento endodôntico (Nassri *et al.*, 2003).

Vários pesquisadores avaliaram a citotoxicidade de diferentes cimentos quando comparados ao AH Plus, sendo este sempre superior ou similar (Leonardo *et al.*, 2003; Senne *et al.*, 2009; Al-Hiyasat *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2017). Baseado no conhecimento de que o AH Plus acrescido de hidróxido de cálcio apresentou menor inflamação em subcutâneo de ratos (Oliveira *et al.*, 2010), a proposta do

Sealer Plus foi um cimento endodôntico composto de forma similar ao AH Plus acrescido de hidróxido de cálcio. O hidróxido de cálcio tem um importante efeito no tecido, promovendo um pH alcalino, efeito antibacteriano e acelera o processo de reparo (Duarte *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010). Esta similaridade pode explicar nossos resultados sem diferenças estatisticamente significante de citotoxicidade entre o AH Plus e Sealer Plus.

Divergindo de nossos resultados, Cintra *et al.*, em 2017, avaliaram a citotoxicidade do então novo cimento Sealer Plus quando comparados aos diferentes cimentos, dentre eles o AH Plus. Os cimentos foram avaliados em diferentes tempos experimentais (6, 24, 48 e 72 horas), bem como o uso de extrato puro (1/1) e 2 diluições seriadas (1/2 e 1/4). A comparação com nossos resultados somente é feita através do extrato puro. No estudo de Cintra *et al.*, o extrato puro de Sealer Plus apresentou mais células viáveis em 06 e 24 horas, contudo após 24 horas os resultados mostraram-se similares ao AH Plus. Os autores reforçam que o hidróxido de cálcio presente no Sealer Plus seria responsável por esta diferença na citotoxicidade inicial (6 e 24 horas), contudo a viabilidade celular mostrou-se similar após as 24 horas.

Os biomarcadores escolhidos neste estudo compreendem citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Dentre os biomarcadores com diferenças estatisticamente significantes entre os cimentos, temos a IL-1ra, IL-8, GM-CSF e b-FGF. O cimento AH Plus apresentou maior concentração de IL-1ra e IL-8, enquanto que o Sealer Plus mostrou maior detecção de GM-CSF e b-FGF.

A interleucina 1 (IL-1) é uma interleucina pró-inflamatória prototípica. Existem duas formas de IL-1: IL-1 alfa e IL-1 beta com atividades biológicas quase indistinguíveis (Abbas *et al.*, 2011). IL-1 β pode ser secretada por macrófagos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais durante a lesão celular, infecção e inflamação (Zhang e Jianxiong, 2007).

Descrito inicialmente em 1991, por Arend, a IL-1Ra (antagonista de receptor de interleucina 1) é um antagonista natural da IL-1, com mesma estrutura que IL-1, produzido por fagócitos mononucleares. É biologicamente inativo, agindo como inibidor competitivo e impedindo a ligação de IL-1 ao receptor de sinalização (Abbas *et al.*, 2011; Teixeira, 2015). Em relação à dosagem de IL-1Ra, molécula anti-inflamatória que inibe seletivamente os efeitos de IL-1 pela competição com o

receptor de IL-1 na superfície celular. Nossos resultados apresentam uma maior dosagem de IL-1Ra para o cimento AH Plus, indicando o início de uma reação anti-inflamatória maior para este cimento quando comparada ao Sealer Plus.

A interleucina 8 (IL-8) é um quimiocina da família CXC e apresenta-se como quimiotáticos de neutrófilos A IL-8 também já foi chamada de proteína ativadora de neutrófilos-1 (NAP-1), já que estimula a liberação de grânulos neutrófilos. Assim como vários outros quimiotáticos, a IL-8 induz à reorganização do citoesqueleto, alterações nos níveis de Ca^{2+} intracelular, ativação de integrinas, exocitose de proteínas granulares. Altos níveis de IL-8 também são observados após choque séptico ou administração sistêmica de endotoxinas (Palomino e Marti, 2015). Nossos resultados revelaram uma maior dosagem de IL-8 também para o AH Plus quando comparado ao Sealer Plus. Nossa hipótese baseia-se em uma maior expressão de IL-8 e IL-1Ra para o AH Plus.

A IL-8, VEGF e b-FGF são estimulantes da angiogênese e estimulam a proliferação das células endoteliais e migração das mesmas. A proliferação e migração endotelial também pode ser ativada por fator angiogênico indireto através dos macrófagos. Os macrófagos liberam b-FGF e VEGF coordenando a formação e remodelação tecidual durante a cicatrização (Gonçalves, 2006).

Os fatores de crescimento b-FGF, VEGF e a citocina IL-8 participam do processo de angiogênese, estimulando a proliferação das células endoteliais e migração das mesmas (Gonçalves, 2006). O aumento de permeabilidade vascular e o processo de angiogênese é a principal resposta inicial do processo inflamatório. O exsudato e infiltrado inflamatório necessita de uma maior permeabilidade vascular para a leucodiapedese e também de uma angiogênese para aumento da microcirculação vascular. Em nossos resultados, o cimento Sealer Plus apresenta maior dosagem de b-FGF.

O fator GM-CSF é uma citocina secretada por células T ativadas, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos de estroma. GM-CSF atua sobre a medula óssea aumentando a produção de neutrófilos e monócitos (Abbas *et al.*, 2011). A relação de neutrófilos e monócitos (macrófagos no sítio tecidual) é diretamente ligada ao infiltrado inflamatório, ou seja, ao potencial inflamatório. Em nossos resultados, o cimento Sealer Plus apresentou maior dosagem de GM-CSF quando comparado ao AH Plus.

A comparação de resultados com a literatura apresenta-se altamente escassa, visto que é inédita uma pesquisa com diferentes analitos em resposta ao estímulo de cimentos endodônticos.

Os dados associados que o Sealer Plus apresenta uma menor dosagem de IL-1Ra (molécula anti-inflamatória) e maiores dosagens de b-FGF e GM-CSF, pode-se sugerir que o cimento Sealer Plus apresenta um maior potencial inflamatório quando comparado ao AH Plus, em relação ao analitos estudados.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que

- 4) Não houve diferença entre a citotoxicidade do Sealer Plus, AH Plus e grupo controle
- 5) Os analitos IL-1Ra e IL-8 apresentam maior dosagem em resposta ao cimento AH Plus, enquanto que o Sealer Plus evidenciou maiores dosagens de b-FGF e GM-CSF.
- 6) O Sealer Plus apresenta citocompatibilidade similar ao grupo controle, contudo sugere-se um maior potencial inflamatório do Sealer Plus quando comparado ao AH Plus, em relação ao analitos estudados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1 Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7ª Edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- 2 Al-Hiyasat AS, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *Int Endod J*. 43(2) 148-53, 2010.
- 3 Arend WP. Interleukin 1 Receptor Antagonist. A new member of the Interleukin I family. *J Clin Invest*. 88: 1445-51, 1991.
- 4 Bio-Rad Laboratories. Bio-Plex Pro human cytokine. Chemokine, and Growth Factor Assays Technical Bulletin. 2014; Vol. 5828.
- 5 Carvalho-Jr, Guimaraes LFL, Correr-Sobrinho L, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Evaluation of solubility, disintegration, and dimensional alterations of a glass ionomer root canal sealer. *Braz Dent J*. 14 (2): 114-8, 2003.
- 6 Cintra LTA, Benetti F, De Azevedo Queiroz ÍO, Ferreira LI, Massunari L, Bueno CRE, De Oliveira SHP, Gomes-Filho JE. Evaluation of the cytotoxicity and biocompatibility of new resin epoxy-based endodontic sealer containing calcium hydroxide. *J Endod*. 43(12): 2088-92, 2017.
- 7 Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Bernardes RA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, Moraes IG. Influence of calcium hydroxide association on the physical properties of AH Plus. *J Endod*. 36(6):1048-51, 2010.
- 8 Ehsani M, Zabihi E, Gharouee H. A Comparison between Cytotoxicity Induced by Two Resin Based Sealers (2Seal and AH Plus) in Saos-2 and MG-63 Cell Lines. *Int J Mol Cell Med Autumn*.1(4):197-202, 2012.
- 9 Gonçalves, SB. Efeito do VEGF na angiogênese pulpar e na apoptose. Tese (Doutorado)-Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo. 2006.
- 10 Granjeiro JM & Soares GDA. *Biomateriais em Odontologia: Princípios, Métodos investigativos e Aplicações*. 1ª Edição. São Paulo, VM Cultural Editora Ltda, 2011.
- 11 Grossman, Li. An improved root canal cement. *J Am Dent Assoc*. 56(3): 381-85, 1958.
- 12 Hargreaves KM & Berman LH. *Cohen Caminhos da Polpa*. 11ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

- 13 Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomat.* 23(1):77-83, 2002.
- 14 Leonardo MR, Salgado AAM, Silva LAB, Tanomaru Filho M. Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Pesqui Odontol Bras.* 17 (1): 69-74, 2003.
- 15 Leyhausen G, Heil J, Reifferscheid G, Waldmann P, Geurtsen W. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH plus. *J Endod.* 25(2): 109-13, 1999.
- 16 Lins RDAU, Lucena KCR, Ferreira RCQ, Silveira EJD, Pinto LP, Gomes RCB. As citocinas e o periodonto: o papel dos fatores de crescimento na saúde periodontal. *IJD*,. 9(1). 2010.
- 17 Lopes Jr H., Siqueira JF. *Endodontia: Biologia e Técnica.* 4ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- 18 Marins FC, Ronconi CT, Saavedra FM, Lima ABM, Zaia AA, Moreira E JL, Silva EJNL. Avaliação da citotoxicidade de dois cimentos à base de MTA: um estudo in vitro. *Rev. Bras. Odontol.* 74(1): 27-30, 2017.
- 19 Nassri MRG; Lia RCC, Bombana AC. Análise da resposta tecidual de dois cimentos endodônticos. *J Appl Oral Sci.* 11(1):9-14, 2003.
- 20 Ng YI, Mann V, Rahbaran S et al. Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature. 2: Influence of clinical factors. *Int Endod J* 41:6-31, 2008
- 21 Oliveira RI, Oliveira-Filho RS, Gomes HG, Franco MF, Enokihara MM, Duarte MAH. Influence of calcium hydroxide addition to AH Plus sealer on its biocompatibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 109(1): e50-4, 2010.
- 22 Ørstavik D, Nordahl I, Tibballs JE. Dimensional change following setting of root canal sealer materials. *Dent Mater.* 2001 Nov;17(6):512-9.
- 23 Palomino DCT & Marti LC. *Quimiocinas e Imunidade.* Einstein. 13(3):469-73, 2015.
- 24 Pereira, LB. Avaliação do perfil de citocinas no tecido subcutâneo de camundongos na presença de cimento endodôntico. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

- Ribeirão Preto, 2012.
- 25 Pinheiro, RA. Citotoxicidade de três cimentos de uso endodôntico em células L 929. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade do Grande Rio Prof. José de Souza Herdy", Duque de Caxias.
- 26 Pinna L, Brackett MG, Lockwood PE, Huffman BP, Mai S, Cotti E, Dettori C, Pashley DH, Tay FR. In vitro cytotoxicity evaluation of a self-adhesive, methacrylate resin-based root canal sealer. *J Endod.* 34(9): 1085-8, 2008.
- 27 Sá Neto, WC. Avaliação da força de adesão de três cimentos endodônticos pelo método do push-out. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Fortaleza, 2012.
- 28 Senne MI, Lemos N, Fidel SR, Fidel RAS. Avaliação da citotoxicidade dos três cimentos endodônticos empregados na obturação do sistema de canais radiculares. *RSBO*, 6 (1): 71-6, 2009.
- 29 Silva EJ, Zaia AA, Peters OA. Cytocompatibility of calcium silicate-based sealers in a three-dimensional cell culture model. *Clin Oral Investig.* 21(5): 1531-6, 2017.
- 30 Silva EJNL, Accorsi-Mendonça T, Pedrosa AC, Granjeiro JM, Zaia AA. Long term cytotoxicity , pH and dissolution rate of AH Plus and MTA Fillapex. *Braz Dent J.* 27(4):419-23, 2016.
- 31 Silva EJNL, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based Endodontic Sealer MTA Fillapex. *J Endod*, 39(2). 2013.
- 32 Sousa-Neto MD, Passarinho-Neto JG, Carvalho-Junior Jr, Carvalho-Junior R, Cruz-Filho AM, Pécora JD, Saquy PC. Evaluation of the effect of EDTA, EGTA and CDTA on dentin adhesiveness and microleakage with different root canal sealers. *Braz Dent J.* 13(2): 123-8, 2002.
- 33 Teixeira, FFC. Monitoramento clínico do processo inflamatório periapical antes e após o uso de diferentes medicações intracanal através dos níveis de biomarcadores inflamatórios. Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2015.

- 34 Troiano G, Perrone D, Dioguardi M, Buonavoglia A, Ardito F, Lo Muzio L. In vitro evaluation of the cytotoxic activity of three epoxy resin-based endodontic sealers. *Dent Mater J.* 28. 2018.
- 35 Vertuan GC, Duarte MAH, Moraes IG, Piazza B, Vasconcelos BC, Alcalde MP, Vivan RR. Evaluation of physicochemical properties of a new root canal sealer. *J Endod.* 44(3):501-5, 2018.
- 36 Zhang JM & Jianxiong AN. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin*, 45(2): 27-37, 2007.
- 36 Zhou HM, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng YF, Haapasalo M. Physical properties of 5 root canal sealers. *J Endod.* 39(10):1281-6, 2013.