



UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

NADYNE SAAB MESSIAS

EFEITO DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS NA CITOTOXICIDADE E  
MODULAÇÃO INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS ESTIMULADOS POR  
LIPOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS

RIBEIRÃO PRETO

2021

Nadyne Saab Messias

EFEITO DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS NA CITOTOXICIDADE E  
MODULAÇÃO INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS ESTIMULADOS POR  
LIPOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, área de concentração Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Walter Raucci Neto

Ribeirão Preto

2021

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico da  
Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Messias, Nadyne Saab - 1997

Efeito de cimentos endodônticos na citotoxicidade e modulação inflamatória de macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos bacterianos.

Nadyne Saab Messias. - Ribeirão Preto, 2021.

71 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Walter Raucci Neto.

Dissertação (mestrado) – Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,  
Odontologia, área de concentração: Endodontia. Ribeirão Preto, 2021.



c



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisas em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, em colaboração com o Laboratório de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – PROSUP, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Dedico este trabalho

Aos meus pais **Marco Antônio Messias** e **Margaret Saab Messias**. Não existem palavras ou “dedicatórias” suficientes para expressar o quanto sou grata pelo sacrifício dos senhores que me proporcionaram e proporcionam a realização dos meus sonhos. Eu sou uma pessoa feliz, graças aos senhores. Meu mais puro: Amo vocês!

As minhas irmãs **Yasmin Saab Messias** e **Lucimar Cristina Clara Mazarão**. Queiram ou não, vocês me influenciaram com seus conselhos e saibam que foram conselhos que mudaram minha vida para melhor. Sou eternamente agradecida pelo apoio e amor que recebo de vocês, vocês me completam. Eu amo vocês!

Aos meus avôs e avós (in memoriam) que foram e continuam sendo meus exemplos de vida.

A toda minha família pelo incentivo do cumprimento dessa etapa.

Aos meus **amigos, Victoria Gabriela Louzada, Bruna Ciaco, Maria Clara Tonon, Marcus Lucio Moschelli F.**, obrigado por me ouvirem, aconselharem e apoiarem em todos os momentos, mas principalmente, pela compreensão e carinho durante toda caminhada.

Aos meus irmãos de alma, **Ana Vichória Guimarães e Leonardo Subar**. Eu amo vocês.

Ao meu amor e melhor amigo **Vinicius Rocha Ingizza**, por me ajudar a construir minha melhor versão todos os dias. Eu te amo.

A todos professores e professoras que passaram pelo meu caminho na educação.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Walter Raucci Neto**. Augusto Cury disse uma vez que professores brilhantes ensinam para uma profissão e professores fascinantes ensinam para a vida. O senhor, em minha mais respeitosa opinião, é um professor fascinante. Obrigada por toda paciência, correções, disponibilidade e confiança. Foi uma honra poder ser sua orientada.

Meus respeitosos agradecimentos pela contribuição da banca do exame de qualificação e pela participação dos membros da banca examinadora da defesa.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de Ribeirão Preto, na pessoa da sua Magnífica Reitora **Profa. Elmara Lucia de Oliveira Bonini**, personalidade constante e pioneira na educação nacional.

À coordenadora do curso de Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Danielle Cristine Furtado Messias**.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa**, agradeço muito por tê-la como nossa coordenadora, por participar da minha formação como mestre, pelos valiosos ensinamentos que nos motiva e nos faz seguir seu exemplo de ótima profissional.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de Ribeirão Preto: **Prof. Dr. André Pitondo, Prof. Dr. Carlos Eduardo Saraiva Miranda, Profa. Dra. Danielle Cristine Furtado Messias, Prof. Dr. Edson Alfredo, Profa. Dra. Érica Alves Gomes, Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso Lombardi, Prof. Dr. Fuad Jacob Abi Rached Junior, Profa. Dra. Graziela Bianchi Leoni, Profa. Dra. Izabela Cristina Maurício Moris Rivera, Profa. Dra. Larissa Moreira Spinola de Castro Raucci, Profa. Dra. Marcelle Danelon, Prof. Dr. Walter Raucci Neto e Profa. Dra. Yara Teresinha Corrêa Silva Sousa**, pela dedicação, atenção, pelos conhecimentos repassados e colaboração na minha formação.

Ao **Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira**, por possibilitar o desenvolvimento do meu trabalho nos Laboratórios de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FORP-USP).

À minha orientadora de iniciação científica **Profa. Dra. Larissa Moreira Spinola de Castro Raucci**. Além de ser uma professora fascinante, a senhora é um exemplo de vida para mim, uma inspiração que sempre carregarei comigo. Sou eternamente agradecida por ter me dado força, motivação e, principalmente, acolhimento quando eu mais precisei. Foi uma honra ter tido a oportunidade de aprender e trabalhar com a senhora.

Aos colaboradores que tornaram possível a realização deste estudo, em especial, agradeço aos alunos de pós-graduação **Rayana Longo Bigueti Trevisan e Antônio Secco Martorano**, ao técnico **Roger Rodrigo Fernandes** e a todos os colegas do Laboratório de Cultura de Células e de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

À minha amiga **Victoria Gabriela Louzada**, por estar sempre ao meu lado desde a graduação e permanecendo nesses anos de Pós-Graduação. Agradeço por toda ajuda, paciência, generosidade e principalmente companheirismo durante mais esse passo da nossa vida acadêmica.

**Aos funcionários da Universidade de Ribeirão Preto**, por todos os bons momentos que estivemos juntos, pela atenção e carinho que tiveram por mim durante esses anos de convívio, desde a graduação.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROSUP)** pelo auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste projeto.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.



## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos cimentos AH Plus, Sealer 26 e Sealer Plus BC sobre a citotoxicidade e a modulação inflamatória em culturas de macrófagos expostos ou não ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Os cimentos foram manipulados e, após presa inicial, condicionados com meio de cultura sem soro por 24 h (1 mL/cm<sup>2</sup>). Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram expostos aos extratos dos cimentos na proporção de 1:16 em meio de cultura contendo ou não LPS. Avaliou-se a morfologia celular em 24 h por epifluorescência, a viabilidade celular em 24 h pelo ensaio Live/Dead, atividade mitocondrial em 24 e 48 h pelo ensaio colorimétrico MTT (Mitochondrial Tetrazolium Test), o estresse oxidativo em 24 h por reação de Griess e a expressão gênica de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em 3 dias por reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os dados de MTT, estresse oxidativo e TNF- $\alpha$  foram analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) a dois fatores, seguido pelo pós-teste Student Newman Keuls (SNK). Os dados de IL-1 $\beta$ , foram analisados por ANOVA a um fator, seguido por SNK, e, utilizado o teste t, para comparação intra-grupos. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Na ausência de LPS, apenas AH Plus e o Sealer 26 apresentaram redução da densidade celular enquanto que, na presença de LPS, o Sealer 26 permaneceu com a menor densidade em comparação aos demais grupos. Na atividade mitocondrial, em 24 e 48 h, o cimento Sealer Plus BC apresentou valores médios significativamente maiores do que o Sealer 26 e o AH Plus ( $p < 0,05$ ), tanto na presença como na ausência de LPS. Na produção de nitrito (NO), o Sealer Plus BC resultou nos maiores valores de estresse oxidativo diferente dos demais cimentos ( $p < 0,05$ ). O Sealer 26 exibiu os menores valores de estresse oxidativo e de expressão de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , independente da presença de LPS ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que todos os cimentos interferiram na resposta dos macrófagos ao LPS, sendo que o contato com os cimentos à base de resina epóxi podem prejudicar a atividade celular *in vitro*, enquanto que o cimento biocerâmico parece favorecer as funções inflamatórias destas células.

**Palavras chave:** Citotoxicidade. Inflamação. Macrófagos. Lipopolissacarídeos. Biomateriais.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of AH Plus, Sealer 26 and Sealer Plus BC on cytotoxicity and inflammatory modulation in cultures of macrophages exposed or not to bacterial lipopolysaccharide (LPS). The sealers were manipulated and, after initial setting, conditioned with serum-free culture medium for 24 h (1 mL/cm<sup>2</sup>). Macrophages of the RAW 264.7 strain were exposed to sealers extracts at a ratio of 1:16 in culture medium containing or not LPS. Cell morphology was evaluated in 24 h by epifluorescence, cell viability in 24 h by Live/Dead assay, mitochondrial activity in 24 and 48 h by colorimetric MTT assay (Mitochondrial Tetrazolium Test), oxidative stress in 24 h by reaction of Griess and interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) gene expression in 3 days by real-time polymerase chain reaction. MTT, oxidative stress and TNF- $\alpha$  data were analyzed by the two-way Analysis of Variance (ANOVA) test, followed by the Student Newman Keuls (SNK) post-test. IL-1 $\beta$  data were analyzed by one-way ANOVA, followed by SNK, and the t test for intra-group comparison. The level of significance was set at 5%. In the absence of LPS, only AH Plus and Sealer 26 showed a reduction in cell density while, in the presence of LPS, Sealer 26 remained with the lowest density compared to the other groups. In terms of mitochondrial activity, at 24 and 48 h, Sealer Plus BC showed significantly higher mean values than Sealer 26 and AH Plus ( $p < 0.05$ ), both in the presence and absence of LPS. In the production of nitrite (NO), Sealer Plus BC resulted in the highest values of oxidative stress different from the other sealers ( $p < 0.05$ ). Sealer 26 exhibited the lowest values of oxidative stress and expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , regardless of the presence of LPS ( $p < 0.05$ ). It was concluded that all sealers interfered in the response of macrophages to LPS, and contact epoxy-based sealers can impair cell activity *in vitro*, while bioceramic sealer seems to favor the inflammatory functions of these cells.

**Keywords:** Cytotoxicity. Macrophages. Lipopolysaccharide. Biomaterials.

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>19</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.1.1 Objetivos específicos.....	19
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	20
3.2 OBTENÇÃO DAS CULTURAS.....	20
3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DOS CIMENTOS E EXPOSIÇÃO DAS CULTURAS .....	22
3.4 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CELULARES AOS EXTRATOS DOS CIMENTOS.....	23
3.4.1 Morfologia celular.....	23
3.4.2 Viabilidade celular.....	24
3.4.3 Atividade Mitocondrial.....	25
3.4.4 Estresse oxidativo.....	26
3.4.5 Expressão Gênica.....	27
3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	29
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 MORFOLOGIA CELULAR.....	30
4.2 VIABILIDADE CELULAR.....	32
4.3 ATIVIDADE MITOCONDRIAL.....	34
4.4 ESTRESSE OXIDATIVO.....	37
4.5 EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS .....	39
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>

**6 CONCLUSÕES.....50**

**REFERÊNCIAS**

## 1. INTRODUÇÃO

As patologias periapicais são doenças de prevalência mundial (TIBÚRCIO-MACHADO et al., 2021) que podem decorrer de fatores mecânicos, como traumas por sobreinstrumentação, traumatismo dentário e sobreobturação; agressão química, como o extravasamento de soluções irrigadoras ou cimentos endodônticos; e biológica, por canais radiculares infectados por microorganismos em decorrência de uma necrose pulpar (SIQUEIRA et al., 2014; BRAZ-SILVA et al., 2019, BOEDDINGHAUS & WHYTE, 2020; FOUAD et al., 2020). As distintas formas de respostas teciduais, que podem ser de caráter agudo ou crônico, estão relacionadas diretamente com a intensidade e duração da agressão aos tecidos ali presentes, e também à resposta imune do paciente. Como a resposta inflamatória às agressões mecânicas e químicas são auto limitantes, a maioria das patologias periapicais persistentes estão relacionadas a infecções endodônticas bacterianas (LOPES & SIQUEIRA JR, 2020; MACHADO et al., 2020; CAVALLA et al., 2021).

Quando a agressão pelas bactérias for de alta intensidade, ocorre a resposta inflamatória aguda no ligamento periodontal, denominada periodontite apical aguda. Seu quadro clínico é caracterizado por dor contínua ou pulsátil, sensibilidade à percussão e, às vezes, à palpação, devido ao aumento da permeabilidade vascular e formação de edema, causando compressão das fibras nervosas e produção de dor, além da liberação das prostaglandinas, histamina e bradicinina que intensificam a sintomatologia (SIQUEIRA et al., 2014). Radiograficamente, observa-se o espessamento do ligamento periodontal, consequência da formação do edema que leva à extrusão do elemento dental. Como neste caso a resposta tecidual é rápida, não é possível observar rarefação óssea apical, porém, quando observada, trata-se da agudização de um processo crônico (SIPAVIČIŪTĖ & MANELIENĖ, 2014; BERTOSSI et al., 2017; MACHADO et al., 2020).

Paralelo a isso, quando a resposta inflamatória controla os efeitos da agressão bacteriana, o processo se cronifica, ou seja, a reunião de células imunocompetentes estabelece o que é chamado de periodontite apical crônica (BRAZ-SILVA et al., 2019). Clinicamente, o paciente apresenta-se assintomático, com ausência de sensibilidade aos testes de vitalidade e, geralmente associado à necrose pulpar, canal sem preenchimento e contaminado ou com tratamento endodôntico sem restauração definitiva. Sobre os achados radiográficos, é possível observar o espessamento do ligamento periodontal e, em casos de granuloma e cisto, há rarefação óssea periapical ou lateralmente, em casos de ramificações laterais (ABBOTT, 2004; RECHENBERG et al., 2021).

Considerando as características histopatológicas das periapicopatias, a resposta imunológica contra as bactérias provenientes do sistema de canais radiculares é dividida em imunidade inata, que é a primeira linha de defesa, e imunidade adaptativa, que é uma resposta mais sofisticada e eficaz em termos de reconhecimento de antígenos bacterianos, combate à infecção e prevenção da reinfecção (BRAZ-SILVA et al., 2019; LOPES & SIQUEIRA JR, 2020). A resposta inespecífica, relacionada aos processos precoces da inflamação, é representada por barreiras que dificultam ou impedem a penetração de corpos estranhos, a fagocitose e fatores humorais de resistência inespecífica. Um fator importante da imunidade inata é a inflamação, que é representada por uma série de reações vasculares e celulares. Das reações celulares, ocorre a transmigração de neutrófilos, com marginação leucocitária e saída destes dos vasos para os tecidos, e a transmigração de linfócitos e de macrófagos (KAUR & SECORD, 2019). Os macrófagos, compõe 6% das células envolvidas na resposta imune, e, sua transmigração e multiplicação no local da inflamação, depende de fatores quimiotáticos representados por componentes solúveis dos microrganismos e fatores derivados de leucócitos lesados (BOEDDINGHAUS & WHYTE, 2020; COTTI et al., 2021). Os monócitos são considerados células efetoras fundamentais na patogênese da periodontite apical, uma vez que a quimiocina CCL-2 ou proteína quimiotática do monócito-1, é a principal responsável pelo recrutamento de células inflamatórias (BRAZ-SILVA et al., 2019). Neste sentido, observa-se que a evolução da periodontite apical é acompanhada pelo aumento da infiltração de monócitos, e estes, dão origem aos macrófagos que possuem o papel de liberação de citocinas pró inflamatórias, participando também da limpeza da lesão, pois eliminam bactérias residuais e células inflamatórias apoptóticas (WANG et al., 2020; COTTI et al., 2021).

Mesmo que a infecção não seja eliminada pelos mecanismos da imunidade inata, esta pode ainda contribuir para a ativação da resposta imune adaptativa subsequente, geralmente relacionada aos processos inflamatórios crônicos. Nestes casos, ocorre a ativação e a diferenciação de células específicas contra os antígenos associados aos agentes patogênicos e o desenvolvimento de células de memória que podem impedir a reinfecção com as mesmas bactérias (LOPES & SIQUEIRA JR, 2020; FOUAD et al., 2020). Dessa forma, a resposta imune compreende um mecanismo biológico complexo e regulado de defesa do organismo e que tem por finalidade o restabelecimento do equilíbrio fisiológico. Esta pode ser caracterizada por uma sequência de eventos que se inicia com a produção de mediadores solúveis do sistema complemento, quimiocinas, citocinas, incluindo os radicais livres, as prostaglandinas, aminas vasoativas e outras, que são produtos de células residentes

no local acometido como macrófagos, linfócitos, fibroblastos, mastócitos e entre outros. Paralelo a isso, a cascata inflamatória é iniciada por macrófagos que sintetizam prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias como Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Interleucina-1 (IL-1, IL- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1Ra), Interleucina-6 (IL6), Interleucina-12 (IL-12), Interleucina-18 (IL-18), Interleucina-23 (IL-23) e Interleucina-27 (IL-27) (BRAZ-SILVA et al., 2019; COTTI et al., 2021). As prostaglandinas causam vasodilatação, enquanto as citocinas pró-inflamatórias recrutam células polimorfonucleares (PMNs) para o tecido lesado, como também provocam as reações sistêmicas (FOUAD et al., 2020; COTTI et al., 2021).

Essa cascata de eventos bioquímicos é desencadeada muitas vezes em resposta à presença de produtos do metabolismo microbiano, ou ainda, por componentes da parede celular de bactérias, como o lipopolissacarídeo (LPS) (HESSLE et al., 2005; PAULA-SILVA et al., 2020). De fato, bactérias Gram-negativas, que representam os microrganismos mais prevalentes em infecções endodônticas primárias, podem liberar o LPS de sua parede celular durante sua multiplicação ou após a morte do microrganismo (MACHADO et al., 2020). O LPS se liga a receptores da membrana celular de monócitos, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), IL-5 e IL-8, que atuam como potentes estimuladores da reabsorção óssea, e prostaglandinas, que também influencia a ativação de osteoclastos. (HESSLE et al., 2005; MACHADO et al., 2020; PAULA-SILVA et al., 2020). A endotoxina também pode contribuir para o aumento da dispersão de substâncias neurotransmissoras vasoativas nas terminações nervosas nos tecidos do periápice, causando dor e desconforto ao indivíduo. (BRAZ-SILVA et al., 2019; BOEDDINGHAUS & WHYTE, 2020; MACHADO et al., 2020).

Portanto, quando a lesão perirradicular é consequência da infecção do sistema de canais radiculares, é necessário conduzir medidas terapêuticas para eliminar o foco da infecção, através da remoção dos restos pulpare e dentina infectada, a subsequente obturação do canal radicular, e, quando da presença de bactérias Gram negativas, eliminar ou neutralizar o LPS, garantindo que os tecidos periapicais possam conduzir o processo de reparo (SIQUEIRA JR et al., 2014). De fato, na busca de um prognóstico de sucesso, é necessário ter conhecimento sobre o processo de reparação perirradicular pós tratamento endodôntico. Este envolve, respectivamente, a hemostasia, a inflamação, a proliferação e remodelação do tecido, após a infecção endodôntica ter sido controlada (BRAZ-SILVA et al., 2019). Assim, a inflamação dos tecidos começa a diminuir, ou seja, a quantidade da liberação de mediadores inflamatórios, metaloproteinase, mediadores de reabsorção

óssea e fatores de crescimento, causado pelas células imunes, é significativamente reduzido. Além disso, as citocinas sofrem uma transição da natureza pró-inflamatória para um perfil anti-inflamatório, como as IL-4, IL-10 e Fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ) (BRASILVA et al., 2019). Sabe-se que essas lesões são reparadas a partir da periferia para o centro e, com isso, na periferia da lesão, a partir de fatores de crescimento e citocinas como TGF- $\beta$ , proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), células osteoprogenitoras iniciam a neoformação óssea. A última estrutura a ser reparada é o ligamento periodontal, onde há a proliferação e diferenciação de células produtoras de matriz mineralizada, a partir de fatores de crescimento que foram liberados em consequência da prévia reabsorção radicular, como também há o rearranjo de fibras colágenas (LOPES & SIQUEIRA JR, 2020).

Relacionando-se com o tratamento endodôntico não cirúrgico, os cimentos endodônticos, criados para uso biológico, podem tornar-se relativamente inertes e, conseqüentemente, incapazes de manter a inflamação por si próprios quando atingem sua presa final. Entretanto, quando extravasados durante a obturação, dependendo de suas propriedades físico-químicas, eles podem ter três destinos: se solúveis, podem sofrer fagocitose ou podem se dissolver e ser eliminados; se insolúveis, podem ser encapsulados por um tecido conjuntivo fibroso. Portanto, a biocompatibilidade depende da sua composição, do tempo de presa e da solubilidade destes materiais (LOPES & SIQUEIRA JR, 2020).

De fato, na literatura científica, observa-se um número significativo de estudos para avaliar a citotoxicidade e resposta biológica dos cimentos endodônticos e apresentar evidências para sua aplicação clínica (QUEIROZ et al., 2005; ALBUQUERQUE et al., 2006; BRISO et al., 2016; TADA et al., 2010; CAVALCANTI et al., 2011; AN et al., 2012; SANGWAN et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2017; LEE et al., 2019; BEDRAN et al., 2020). Neste sentido, observa-se que os cimentos que contêm hidróxido de cálcio, como o Sealer 26 (Dentsply-Sirona) podem aumentar o pH local causando uma necrose superficial nos tecidos envolvidos, e, após a inflamação ser resolvida, existe a migração de células-tronco pulpares, seguida pela formação de matriz osteóide e deposição de um tecido semelhante à dentina. O  $\text{Ca}^{2+}$  liberado por estes cimentos participa na formação do carbonato de cálcio, causando eventos celulares que resultam no estímulo da expressão de genes relacionados à diferenciação odontoblásticas e ao processo de biomineralização (CINTRA et al., 2013). Ainda, observou-se que o  $\text{Ca}^{2+}$  pode neutralizar o LPS presente em canais radiculares devido ao mecanismo de rompimento das ligações do tipo éster da união de ácidos graxos e hidroxila (BEDRAN et al.,



2020). Dentre os cimentos resinosos, o cimento AH Plus (Dentsply-Sirona) é considerado o padrão ouro para obturação, pois apresenta excelentes resultados quanto ao selamento do sistema de canais radiculares (ALMEIDA et al., 2020). Entretanto, a citotoxicidade do AH Plus, relacionada à liberação de formaldeído e degradação de aminas, consequência do seu longo tempo de presa até a completa polimerização (TEIXEIRA et al., 2017), poderia limitar para o reparo inicial dos tecidos em contato com este material.

Na última década, os cimentos biocerâmicos demonstraram-se promissores para a obturação de canais radiculares, considerando sua biocompatibilidade (CANDEIRO et al., 2016), formação de um selamento hermético pela deposição de uma rede de nano-compósito de hidrato de silicato de cálcio misturado com hidroxiapatita (RAGHAVENDRA et al., 2017), alta molhabilidade sobre a dentina (JAFARI & JAFARI, 2017), capacidade osteocondutora (LÓPEZ-GARCÍA et al., 2020) e não apresentar resposta inflamatória significativa em casos de extravasamento (AL-HADDAD & AZIZ, 2016). Ainda, em pesquisa recente realizada com os cimentos EndoSequence BC sealer (Brasseler) e MTA fillapex (Angelus) com a presença do LPS em culturas de osteoblastos, foi observada redução dos níveis de mediadores inflamatórios induzidos pelo LPS, como também aumento do potencial osteogênico (LEE et al., 2019). Dentre os novos materiais disponíveis, o Sealer Plus BC (MK Life Produtos Médicos e Odontológicos), é um cimento biocerâmico de fabricação nacional, que tem sido avaliado quanto à suas propriedades físico-químicas (MENDES et al., 2018; TORRES et al., 2020) e citotoxicidade (BENETTI et al., 2019; ALVES-SILVA et al., 2020). Entretanto, pelo nosso conhecimento, não existem dados até o momento sobre a resposta imunomodulatória deste material e de nenhum outro cimento biocerâmico em macrófagos expostos ao LPS.

Considerando que a pesquisa de biocompatibilidade de materiais endodônticos recebe grande atenção na Odontologia atual e pregressa, visto que seus compostos exibem potencial para danificar os tecidos circundantes e afetar o processo de renovação tecidual, estudos *in vitro* são indispensáveis para avaliar a citotoxicidade e expressão de citocinas pró inflamatórias, para agregar dados e proporcionar um melhor entendimento das reações observadas *in vivo*. Ainda, apesar dos estudos realizados até o presente momento avaliarem a citotoxicidade e a resposta inflamatória dos referidos cimentos em fibroblastos e odontoblastos, ainda não existem dados sobre o efeito imunomodulatório destes materiais em macrófagos expostos ao LPS bacteriano. Devido a importância do LPS na formação e persistência das patologias periapicais, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de cimentos com composição e propriedades físico-químicas distintas sobre a

morfologia, viabilidade, estresse oxidativo e a expressão de citocinas pró inflamatórias em culturas de macrófagos expostos ao LPS.

## 2. PROPOSIÇÃO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo avaliar e comparar os efeitos de diferentes cimentos endodônticos na citotoxicidade e expressão de marcadores inflamatórios de culturas de macrófagos expostos ou não ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).

#### 2.1.1 Objetivos específicos

Avaliar, utilizando culturas da linhagem RAW 264.7 estimuladas ou não por LPS, o efeito de extratos de cimentos à base de resina epóxi (AH Plus), com resina epóxi e hidróxido de cálcio (Sealer 26) e biocerâmico (Sealer Plus BC) sobre:

- A morfologia e viabilidade celular por epifluorescência;
- A atividade mitocondrial por ensaio colorimétrico MTT (mitochondrial tetrazolium test);
- O estresse oxidativo por ensaio de Griess;
- A expressão gênica de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) por reação em cadeia da polimerase em tempo real;

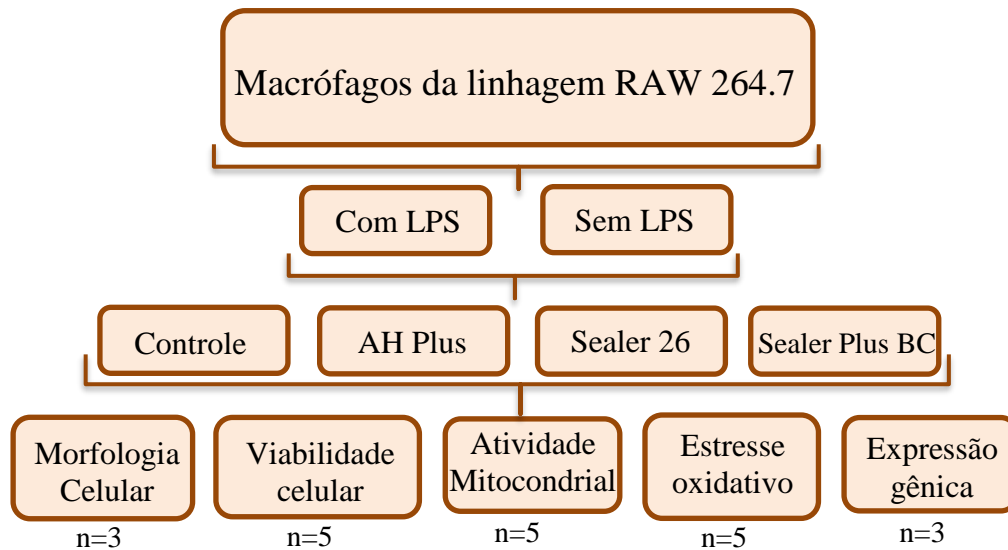
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os fatores em estudo foram os cimentos endodônticos em três níveis (AH Plus, Sealer 26 e Sealer Plus BC) e o LPS em dois níveis (presença ou ausência). As variáveis de resposta quantitativas foram: atividade mitocondrial, estresse oxidativo e expressão de marcadores inflamatórios (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ). As variáveis de resposta qualitativa foram a morfologia celular e viabilidade celular.

O cálculo amostral evidenciou que, para as análises de atividade mitocondrial e estresse oxidativo, poderiam ser utilizadas 5 amostras por grupo para obter 0,95 de poder do teste, considerando 5% de erro tipo  $\alpha$ . Já para as análises de expressão gênica, poderiam ser utilizadas 3 amostras por grupo para obter 0,81 de poder do teste, considerando 5% de erro tipo  $\alpha$ .

**Figura 1.** Representação esquemática do delineamento experimental. Células macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram expostas ao extrato dos cimentos AH Plus, Sealer 26 e Sealer Plus BC para a avaliação de diversos parâmetros do processo de osteogênese *in vitro*.

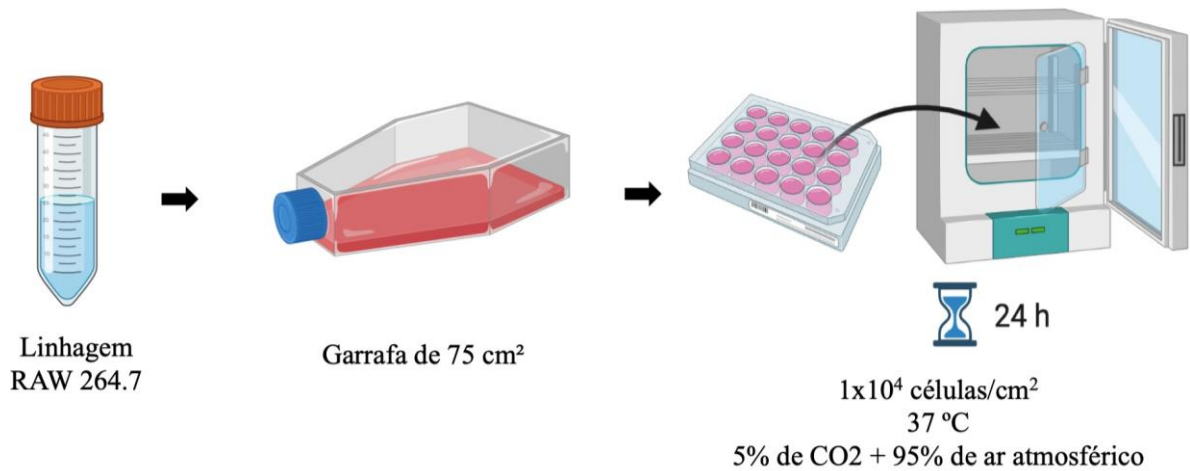


Fonte: Autor

### 3.2 OBTENÇÃO DAS CULTURAS

A linhagem celular escolhida para o estudo foi a RAW 264.7 (macrófagos) adquirida comercialmente pela American Type Culture Collection (ATCC – TIB 71). Para o presente estudo, as células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>3</sup> (Corning, Nova York, EUA) com 10 mL de meio de cultura DMEM (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), 100 UI/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Durante todo o período de cultura, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico e os meios foram trocados a cada 2 dias. Após a subconfluência, as células foram desalojadas do substrato utilizando um raspador de células, aspiradas e contadas em microscópio com hemocitômetro (Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, na densidade de 1x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>, deixadas aderir por 24 h e expostas aos extratos dos cimentos na presença ou não do LPS (Sigma–Aldrich Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA) a 1 µg/mL por períodos de até 3 dias. Especificamente para a análise da morfologia, as células foram plaqueadas sobre lamínulas de Thermanox (Nunc Inc., Naperville, IL, EUA) e cultivadas em placas de 24 poços. Durante todo o período de cultivo, as células foram mantidas na temperatura de 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico.

**Figura 2.** Representação esquemática da obtenção das culturas.

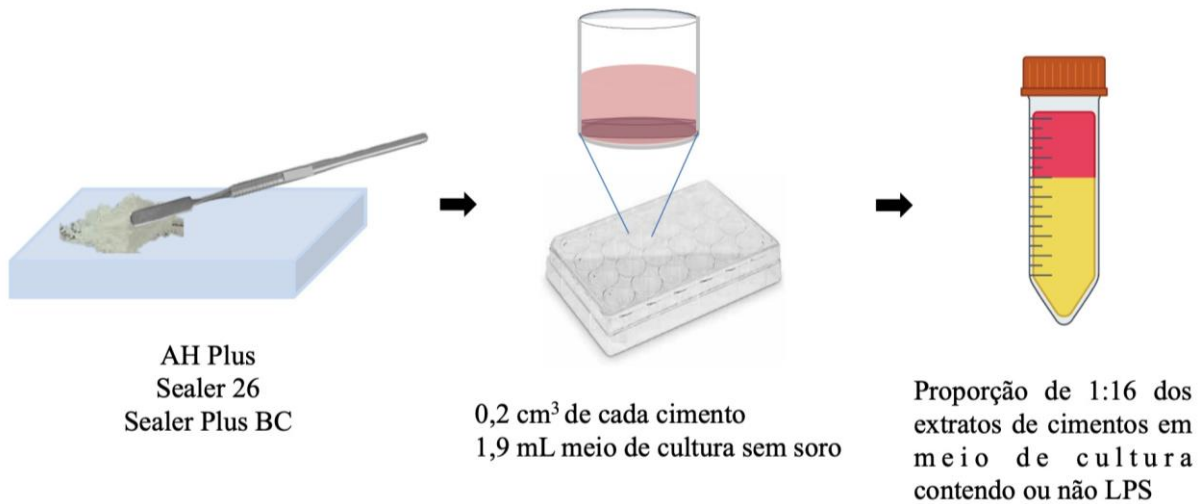


Fonte: [www.biorender.com](http://www.biorender.com)

### 3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DOS CIMENTOS E EXPOSIÇÃO DAS CULTURAS

No presente estudo, foram utilizados os seguintes cimentos endodônticos: AH Plus (Dentsply, Konstanz, Alemanha), Sealer 26 (Dentsply, Konstanz, Alemanha) e Sealer Plus BC (Produtos Médicos e Odontológicos, Porto Alegre, Brasil). Para a obtenção dos extratos, todos os cimentos foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante em capela de fluxo laminar, sob condições estéreis. Foi utilizada uma seringa de insulina esterilizada para inserir 0,2 cm<sup>3</sup> de cada cimento e preencher o fundo dos poços de placas de 96 poços (adaptado de PEDANO et al., 2018) e, após a presa inicial, os cimentos foram condicionados por 24 h com 1,9 mL do meio de cultura sem soro (1 mL/cm<sup>2</sup>). Para a exposição das culturas celulares, macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram expostos aos extratos dos cimentos na proporção de 1:16 em meio de cultura contendo ou não LPS. A proporção dos extratos de cimentos foi determinada em estudo piloto de atividade mitocondrial e estresse oxidativo, no qual foi observado citotoxicidade significativa para maiores diluições, o que inviabilizaria as análises de expressão gênica. As composições dos cimentos selecionados para o presente estudo estão dispostas na tabela 1. Culturas não expostas aos cimentos foram utilizadas como controle.

**Figura 3.** Representação esquemática da obtenção dos extratos dos cimentos e exposição das culturas celulares.



Fonte: [www.biorender.com](http://www.biorender.com)

**Tabela 1.** Composição dos cimentos endodônticos.

<i>Cimentos</i>	<i>Composição</i>	<i>Lote</i>
AH Plus	Pasta A: Resina epóxi de bisfenol-a; resina epóxi de bisfenol-f; tungstato de cálcio; óxido de zircônio; sílica e óxido de ferro. Pasta B: Amina adamantada; N, N'' -dibenzil-5-oxanonane-diamina-1,9; TCD -diamina; tungstato de cálcio; óxido de zircônio; sílica e óleo desilicone.	L:350598K
Sealer 26	Pó: Trióxido de bismuto; hidróxido de cálcio; urotropina e dióxido de titânio. Resina: epóxi.	L:338639J
Sealer Plus BC	Pasta: Óxido de zircônio, silicato tri-cálcico, silicato di-cálcico, hidróxido de cálcio, propilenoglicol.	L:WR770100

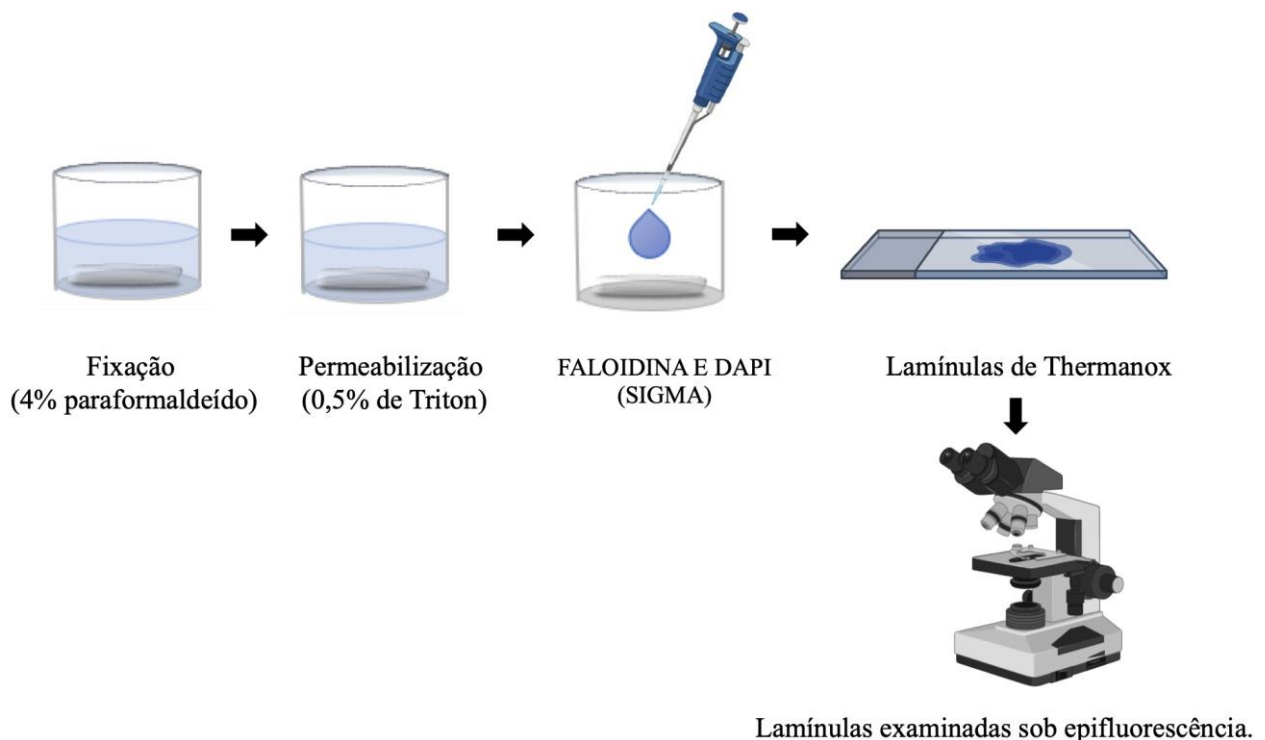
Fonte: bula fornecida pelos respectivos fabricantes.

### 3.4 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CELULARES AOS EXTRATOS DOS CIMENTOS

#### 3.4.1 MORFOLOGIA CELULAR

Após 24 h de exposição ao extrato dos cimentos, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído em 0.1 M de solução tampão fosfato de sódio (PB - pH 7.2) durante 10 minutos em temperatura ambiente (TA), lavadas em PB e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 minutos em TA. As células foram então incubadas com a faloidina conjugada com AlexaFluor 488 (fluorescência verde) (1:200, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, EUA) para marcação do citoesqueleto de actina durante 60 minutos. As culturas foram lavadas com água deionizada e os núcleos celulares, corados com 300 nM de 4',6-diamidino-2-fenilindole, dicloridrato (DAPI, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) durante 5 minutos. A montagem das lamínulas de Thermanox foi realizada com meio de montagem (AntifadeProlong, Molecular Probes) e as células foram examinadas sob epifluorescência usando um microscópio de luz AxioImager M2 Zeiss (Carl ZeissInc.,Oberkochen, Alemanha), equipado com uma câmera digital AxioCam MRM (Carl ZeissInc.,Oberkochen, Alemanha).

**Figura 4.** Representação esquemática da análise de morfologia celular.

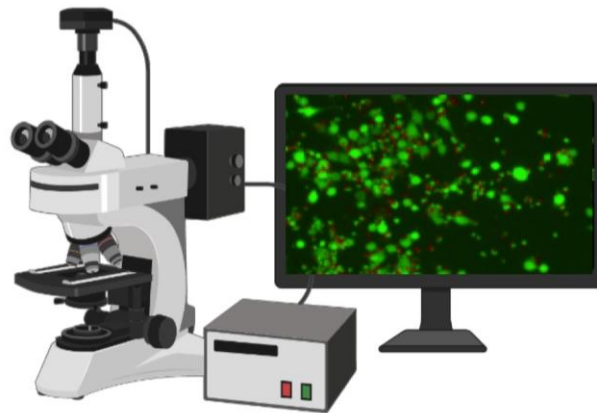




### 3.4.2 VIABILIDADE CELULAR

Após 24 h de exposição aos extratos, a viabilidade celular foi avaliada qualitativamente pelo kit comercial para determinação de viabilidade/citotoxicidade LIVE/DEAD® (Viability/Cytotoxicity, for mammalian cells, Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As células viáveis foram marcadas com fluorescência verde (488 nm), pela reação da calceína ( $C_{30}H_{26}N_2O_{13}$ ) com esterases intracelulares, e as células mortas, marcadas por fluorescência vermelha (561 nm), devido à ligação do homodímero-1 de etídio (EthD-1) a ácidos nucleicos. As imagens foram obtidas em microscópio invertido trilocular, por fluorescência direta (Led B-g-u-uv Trinocular, Digilab, Piracicaba, SP, BR) com câmera digital Nikon acoplada.

**Figura 5.** Representação esquemática da análise de viabilidade celular pelo kit LIVE/DEAD®.



Microscópio invertido trilocular  
Câmera digital Nikon acoplada.

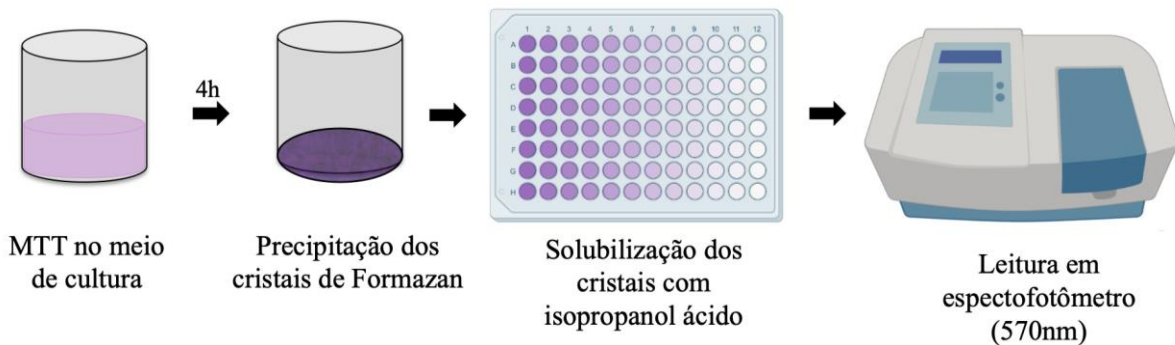
Células viáveis: fluorescência verde  
Células mortas: fluorescência vermelha

Fonte: [www.biorender.com](http://www.biorender.com)

### 3.4.3 ATIVIDADE MITOCONDRIAL

Ao final de 24 e 48 h de exposição aos extratos, a atividade mitocondrial foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma Aldrid, San Luis, Missouri, EUA), um sal que é reduzido por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis. Alíquotas de MTT a 5mg/mL em PBS foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas primárias com esta solução a 10% em meio de cultura, por 4 h a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Após esse período, foi adicionado uma solução de isopropanol ácido (isopropanol e HCl) em cada poço sob agitação moderada por 5 min, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 150 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570, nm, Epoch 2, BioTekInstruments Inc., Winooski, VT, EUA).

**Figura 6.** Representação esquemática da Atividade Mitocondrial pelo ensaio colorimétrico MTT.

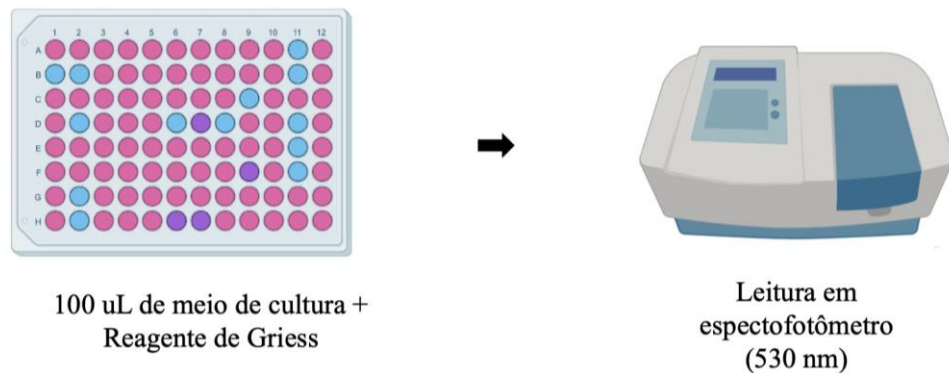


Fonte: [www.biorender.com](http://www.biorender.com)

### 3.4.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Decorridas 24 h de exposição aos extratos, o estresse oxidativo foi avaliado por meio da produção de óxido nítrico (NO), utilizando o método descrito por Griess (1879). Para esse ensaio, as células foram expostas aos extratos dos cimentos diluídos em meio de cultura livre de soro fetal bovino. Após o período de exposição, 100 uL do meio de cultivo das células de cada grupo foram transferidos para uma nova placa de 96 poços, misturados à igual volume do Reagente de Griess (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) e incubados por 10 minutos à Temperatura Ambiente. Após este período, a concentração de NO foi determinada por medida colorimétrica em espectrofotômetro (530 nm; Epoch 2, BioTekInstruments Inc., Winooski, VT, EUA), tendo como referência uma curva padrão de NO (500 a 0,5  $\mu\text{g/mL}$   $\text{NaNO}_2$ , em meio de cultura). Como controle da reação, foram utilizados poços contendo o meio de cultura com os extratos, na ausência de células.

**Figura 7.** Representação esquemática da análise da produção de NO, através do ensaio de Griess.



Fonte: [www.biorender.com](http://www.biorender.com)

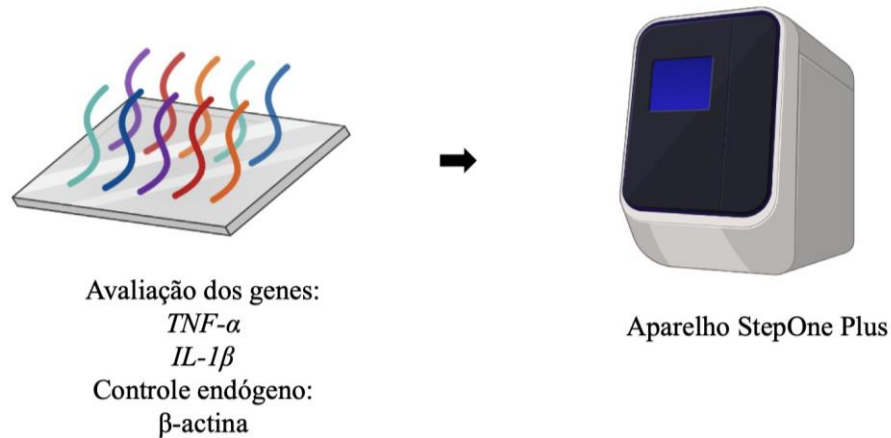
### 3.4.5 EXPRESSÃO GÊNICA

Após 3 dias de exposição, o meio de cultura foi removido dos poços e foi adicionado o reagente Trizol LS (Invitrogen) à TA, por 5 min, sob agitação por pipetagem. A extração do RNA total foi realizada através do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) em espectrofotômetro (GE Healthcare, Milwaukee, WI, EUA). A fita de cDNA foi confeccionada a partir de 1 µg de RNA total. Este procedimento foi feito no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Para a reação de Real-time PCR, foram utilizados o reagente GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), e o aparelho StepOne Plus (ThermoFisher, Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). As reações foram realizadas em triplicata com volume final de 10 uL, contendo 12,5 ng de cDNA. As reações de amplificação consistiram em 2 min a 95°C e quarenta ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60 °C. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (ciclethreshold, ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Foram avaliadas a expressões dos seguintes genes: *Fator de necrose tumoral alfa (TNF-α)* e *Interleucina-1β (IL-1β)*. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene constitutivo β-actina (ACT). As sequências dos *primers* selecionados para este estudo estão dispostas na tabela 2.

**Tabela 2.** Sequência dos *primers* utilizados para as reações de PCR em tempo real

<b>IL-1β</b>	<i>foward</i>	GCT ACC TGT GTC TTT CCC GT
<b>IL-1β</b>	<i>reverse</i>	CAT CTC GGA GCC TGT AGT GC
<b>TNF-α</b>	<i>foward</i>	AGG CCT TGT GTT GTG TTT CCA
<b>TNF-α</b>	<i>reverse</i>	ATG GGG GAC AGC TTC CTT CTT
<b>ACT</b>	<i>foward</i>	CTC TGG CTC CTA GCA CCA TGA AGA
<b>ACT</b>	<i>reverse</i>	GTA AAA CGC AGC TCA GTA ACA GTC CG

**Figura 8.** Representação esquemática da análise da expressão gênica de mediadores pró-inflamatórios, por meio de PCR em Tempo Real (qPCR).



Fonte: [www.biorender.com](http://www.biorender.com)

### 3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

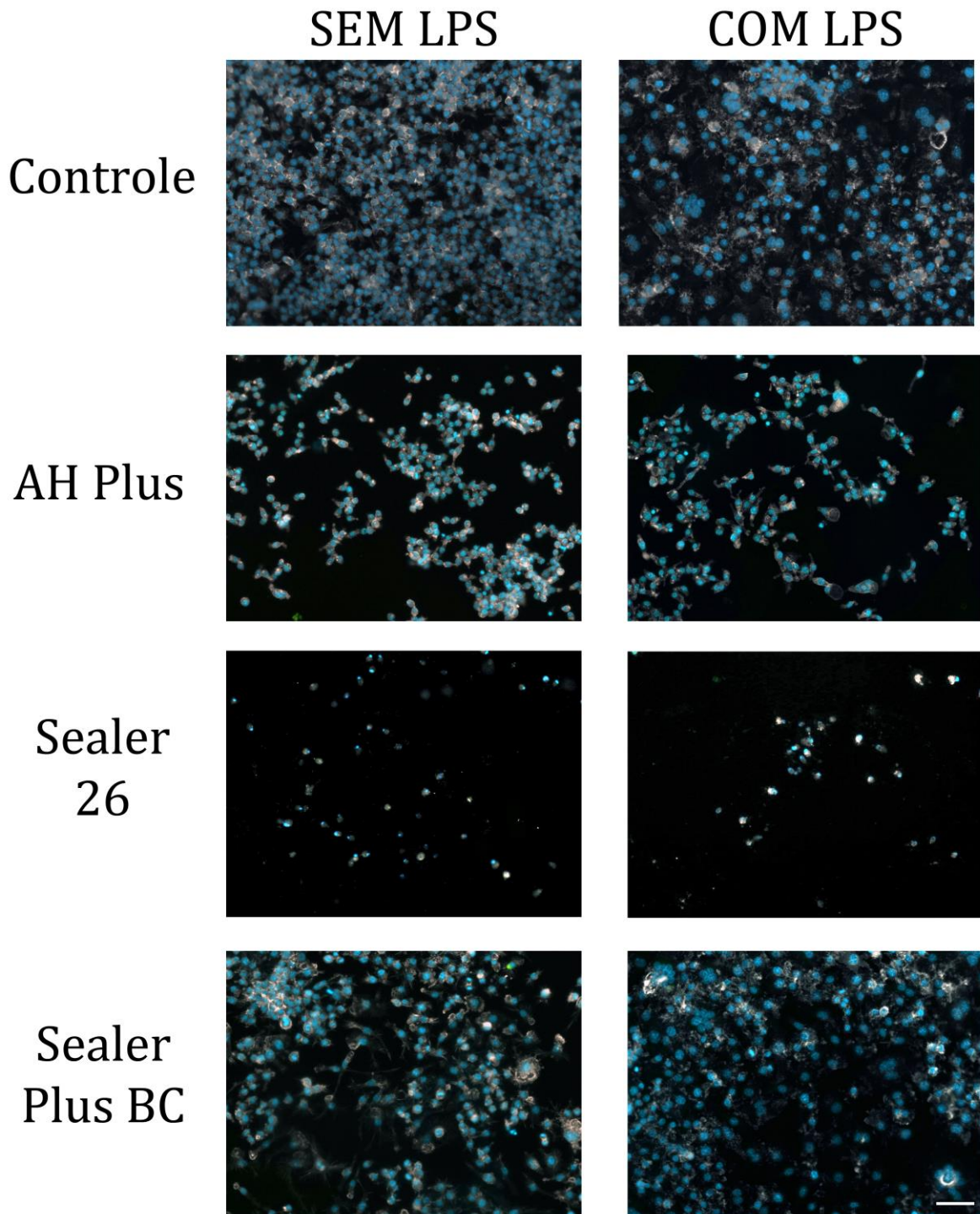
Os dados quantitativos obtidos foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk para aderência à curva normal e Levene para homogeneidade de variâncias. Quando necessária, a transformação dos dados foi realizada por redução logarítmica. Os dados de MTT, estresse oxidativo e expressão de  $TNF-\alpha$  foram analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) a dois fatores, seguido pelo pós-teste Student Newman Keuls. Para os dados da expressão de  $IL-1\beta$ , foram utilizados o teste de Análise de Variância (ANOVA) a um fator e pós-teste Student Newman Keuls, para a comparação entre os grupos da mesma condição de exposição ao LPS. Para a comparação da exposição do LPS intra-grupo, para os dados de  $IL-1\beta$ , foi aplicado o teste t. O nível de significância foi estabelecido em 5%. A análise estatística foi realizada com auxílio do software SigmaStat 3.5 (Systat Software; San Jose, Califórnia, EUA). As imagens obtidas para morfologia celular e viabilidade celular foram analisadas qualitativamente.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 MORFOLOGIA CELULAR.

Em culturas de macrófagos, nota-se que, tanto na presença quanto na ausência do LPS, que a exposição aos extratos de cimento AH Plus promoveu redução da densidade celular e menor espraiamento em comparação ao Controle. O grupo exposto ao Sealer 26 apresentou, adicionalmente, redução significativa do volume celular e a presença de núcleos picnóticos. Observou-se maior densidade celular nos grupos Controle e Sealer Plus BC tanto na presença quanto ausência de LPS (Figura 9).

**Figura 9.** Aspectos morfológicos de culturas de macrófagos da linhagem RAW 264-7 cultivados por 24 h com os extratos dos cimentos, expostos ou não ao LPS. Fluorescência azul indica núcleos celulares, em branco pálido, o citoesqueleto de actina. Magnificação = 200x.



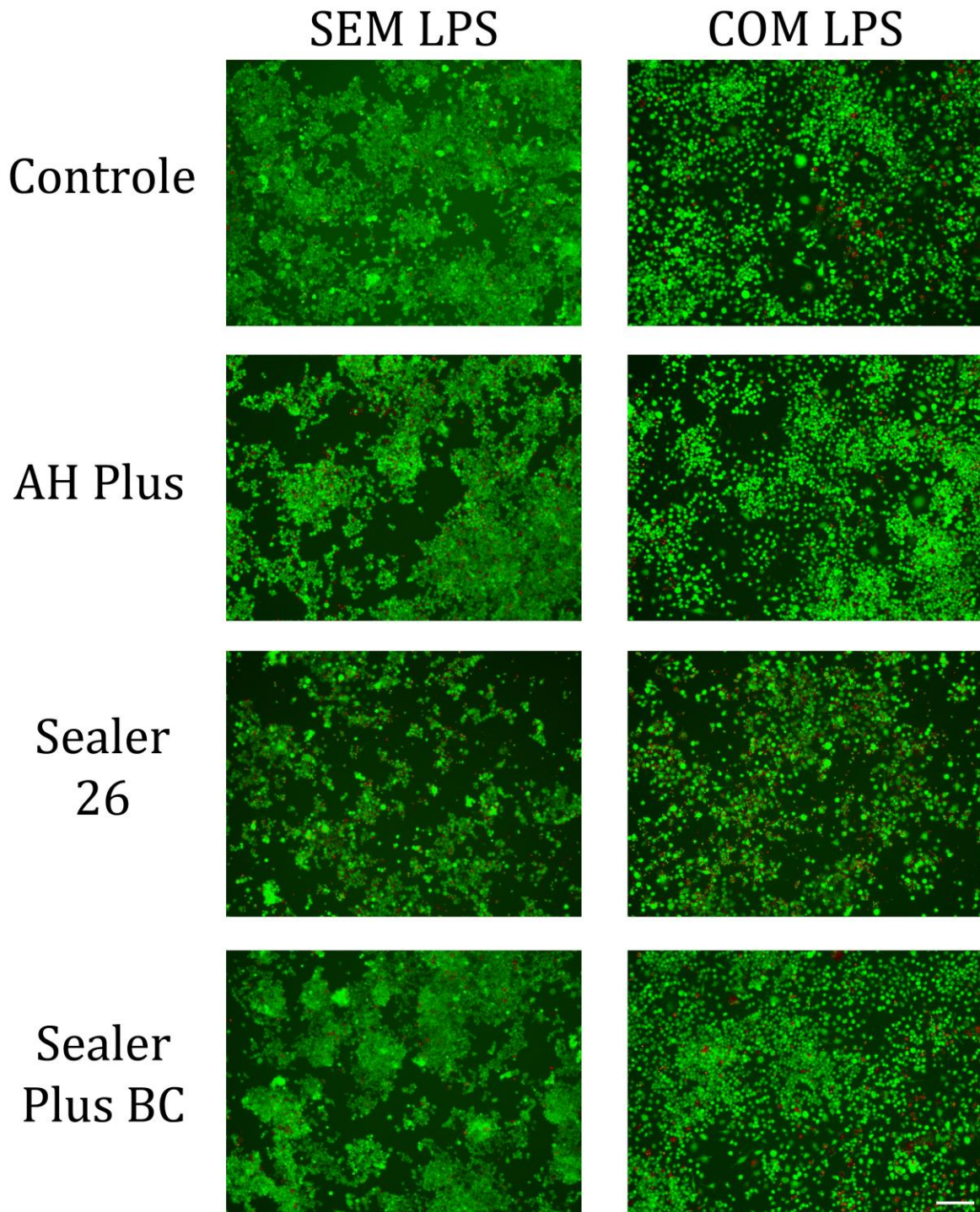
#### 4.2 VIABILIDADE CELULAR.

A partir das imagens obtidas por epifluorescência de culturas não expostas ao LPS e marcadas com o kit live/dead, observa-se predominância de células viáveis nas culturas de todos os cimentos e do Controle, com redução na densidade nos grupos expostos ao AH Plus e Sealer 26 (Figura 10).

Para as culturas expostas ao LPS, observa-se predominância de células viáveis com pequenas porções visíveis de células mortas e redução leve na densidade no grupo exposto ao Sealer 26. Na comparação entre grupos, verificou-se maior densidade celular nas culturas Sealer Plus BC, com ligeira queda no grupo Sealer 26 (Figura 10).



**Figura 10.** Aspectos microscópicos de culturas de macrófagos da linhagem RAW 264-7 cultivados por 24 h com os extratos dos cimentos, expostos ou não ao LPS, após marcação pelo kit Live/Dead. Em verde, células viáveis e, em vermelho, as células mortas. Magnificação = 100x.



### 4.3 ATIVIDADE MITOCONDRIAL.

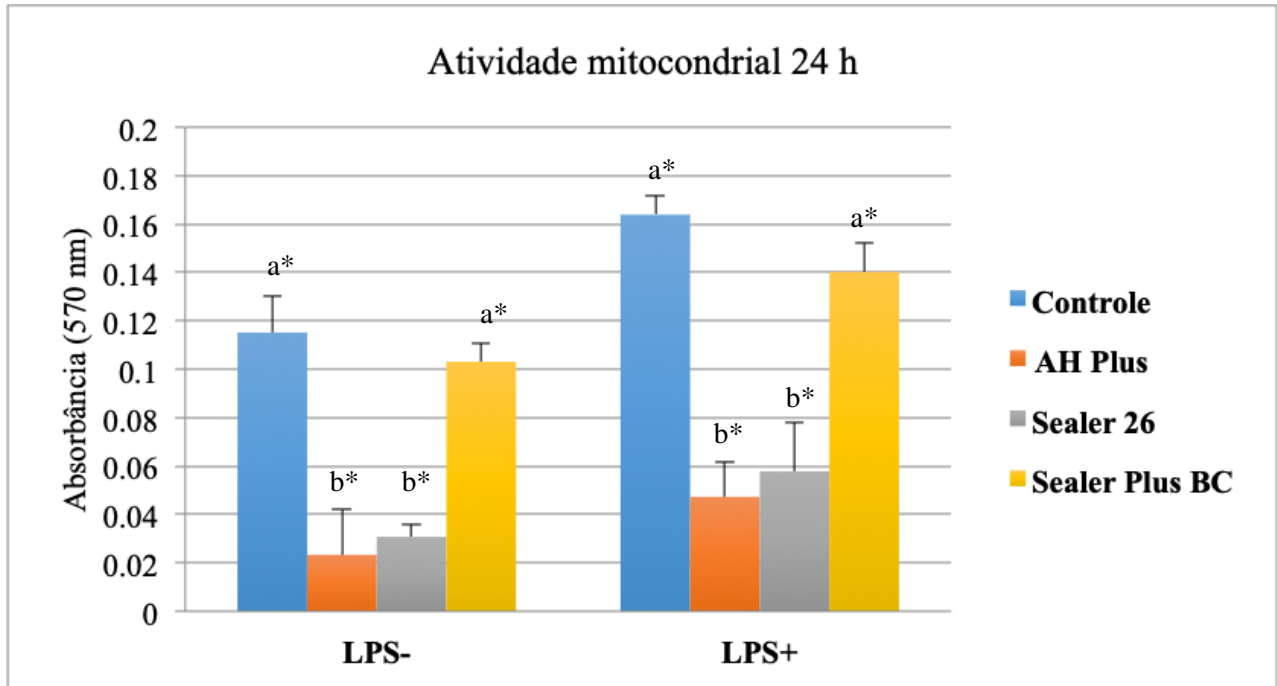
A Análise de Variância demonstrou diferença estatisticamente significativa no valor da atividade mitocondrial após 24 h, tanto entre os cimentos, quanto na presença de LPS ( $p < 0,001$ ). Não foi observada interação entre os fatores ( $p = 0,945$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resultados de ANOVA para atividade mitocondrial 24 h na comparação de cimentos, na presença de LPS e interação entre os fatores

Fonte de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F	P
Cimento	0,277	3	0,0923	146,438	<0,001
LPS	0,0378	1	0,0378	59,914	<0,001
Cimento x LPS	0,000236	3	0,0000786	0,125	0,945
Resíduo	0,0202	32	0,00063		
Total	0,335	39	0,00859		

Após 24 h de exposição, nas comparações entre os grupos, foram observadas semelhanças entre as médias dos cimentos AH Plus e Sealer 26 ( $p > 0,05$ ) e entre o Controle e Sealer Plus BC ( $p > 0,05$ ), tanto na presença como na ausência de LPS. Ainda, independente da exposição ao LPS, foi observado que a atividade mitocondrial do AH Plus e Sealer 26 foram significativamente menores do que Controle e Sealer Plus BC ( $p < 0,001$ ). Foi observada diferença estatística na presença ou ausência do LPS para todos os grupos ( $p < 0,001$ ), sendo observado maiores valores médios na presença da endotoxina (Figura 11).

**Figura 11.** Atividade Mitocondrial em culturas de macrófagos da linhagem RAW 264-7 expostos por 24 h aos extratos de cimentos na presença ou não de LPS. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os cimentos na mesma condição de exposição ao LPS, enquanto que, o asterisco indica diferença estatística do mesmo cimento na presença ou ausência de LPS ( $p < 0,001$ ).



Fonte: Autor.

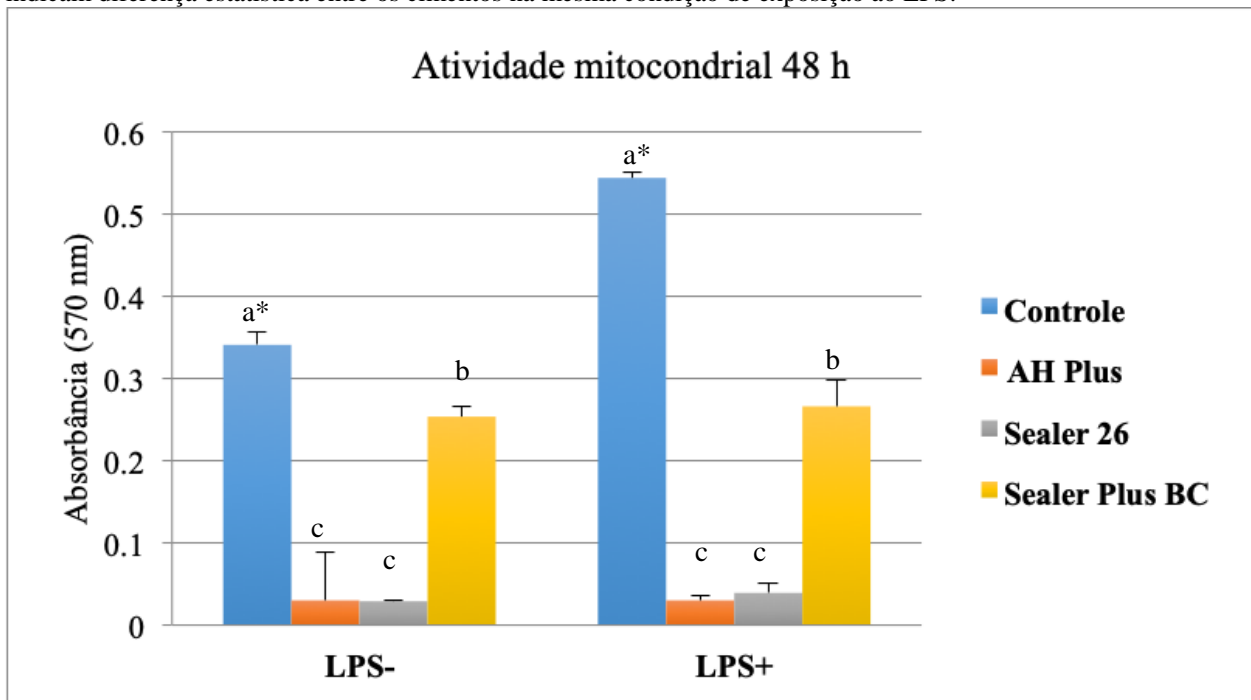
A Análise de Variância demonstrou diferença estatisticamente significativa no valor da atividade mitocondrial após 48 h, tanto na comparação entre cimentos ( $p < 0,001$ ), quanto na presença de LPS ( $p < 0,001$ ). Foi observada interação entre os fatores, ou seja, os efeitos dos cimentos sobre este parâmetro variaram em função da presença do LPS ( $p < 0,001$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultados de ANOVA para atividade mitocondrial 48 h na comparação de cimentos, na presença de LPS e interação entre os fatores

Fonte de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F	P
Cimento	1,768	3	0,589	1061,327	<0,001
LPS	0,0227	1	0,0227	40,823	<0,001
Cimento x LPS	0,0378	3	0,0126	22,695	<0,001
Resíduo	0,0178	32	0,000555		
Total	1,846	39	0,0473		

Após 48 h, os valores médios de atividade mitocondrial para os cimentos AH Plus e Sealer 26, foram semelhantes entre si, tanto na presença ( $p = 0,871$ ), como na ausência do LPS ( $p = 0,128$ ), e, inferiores aos do Controle e Sealer Plus BC ( $p < 0,001$ ), nas mesmas condições de exposição à endotoxina. Ainda, independente do LPS, o Controle apresentou valores médios superiores ao Sealer Plus BC ( $p < 0,001$ ). Quando comparados os valores médios na presença ou ausência do LPS, não foram observadas diferenças entre os cimentos ( $p > 0,05$ ), apenas para o Controle ( $p < 0,001$ ) (Figura 12).

**Figura 12.** Atividade Mitocondrial em culturas de macrófagos da linhagem RAW 264-7 expostos por 48 h aos extratos de cimentos na presença ou não de LPS. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os cimentos na mesma condição de exposição ao LPS.



Fonte: Autor.

#### 4.4 ESTRESSE OXIDATIVO.

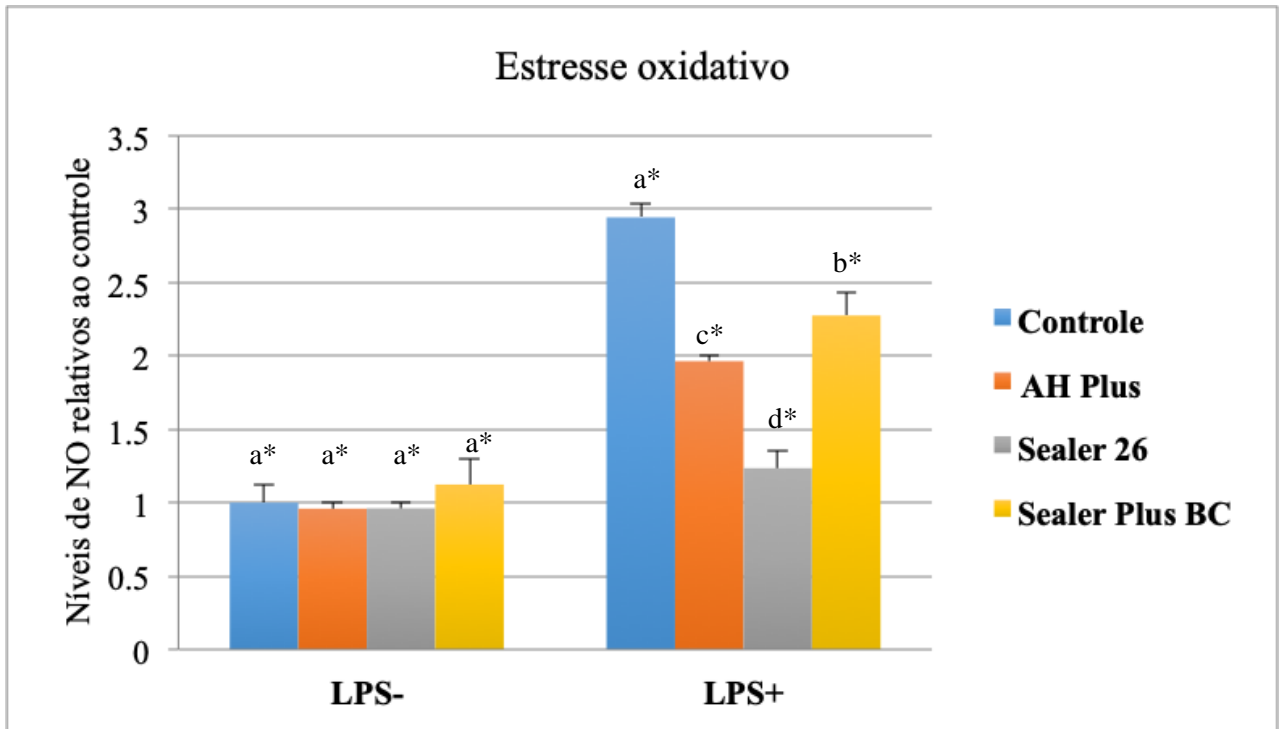
A Análise de Variância demonstrou diferença estatisticamente significativa no valor de produção de NO em 24 h, tanto entre os cimentos, quanto na presença de LPS ( $p < 0,001$ ). Foi observada interação entre os fatores, ou seja, os efeitos dos cimentos sobre este parâmetro variaram em função da presença do LPS ( $p < 0,001$ ) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Resultados de ANOVA para o estresse oxidativo em 24 h na comparação de cimentos, na presença de LPS e interação entre os fatores.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F	P
Cimento	4,118	3	1,373	109,749	<0,001
LPS	11,961	1	11,961	956,28	<0,001
Cimento x LPS	3,519	3	1,173	93,782	<0,001
Resíduo	0,4	32	0,0125		
Total	19,999	39	0,513		

Na ausência de LPS, os valores médios na produção de NO foram semelhantes entre todos os cimentos e o Controle ( $p > 0,05$ ). Na presença do LPS, houve interferência no estresse oxidativo com diferença nos valores médios entre todos os grupos ( $p < 0,05$ ), sendo os maiores valores obtidos pelo Controle, seguido do Sealer Plus BC, AH Plus e Sealer 26, que apresentou os menores valores de NO. Para todos os extratos de cimentos avaliados, foram observados valores significativamente maiores de NO nas culturas expostas ao LPS ( $p < 0,05$ ) (Figura 13).

**Figura 13.** Concentração de NO relacionado ao estresse oxidativo em culturas de macrófagos da linhagem RAW 264-7 expostos aos extratos de cimentos na presença ou não de LPS. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os cimentos na mesma condição de exposição ao LPS, enquanto que, o asterisco indica diferença estatística do mesmo cimento na presença ou ausência de LPS ( $p < 0,001$ ).



Fonte: Autor.

#### 4.5 EXPRESSÃO GÊNICA.

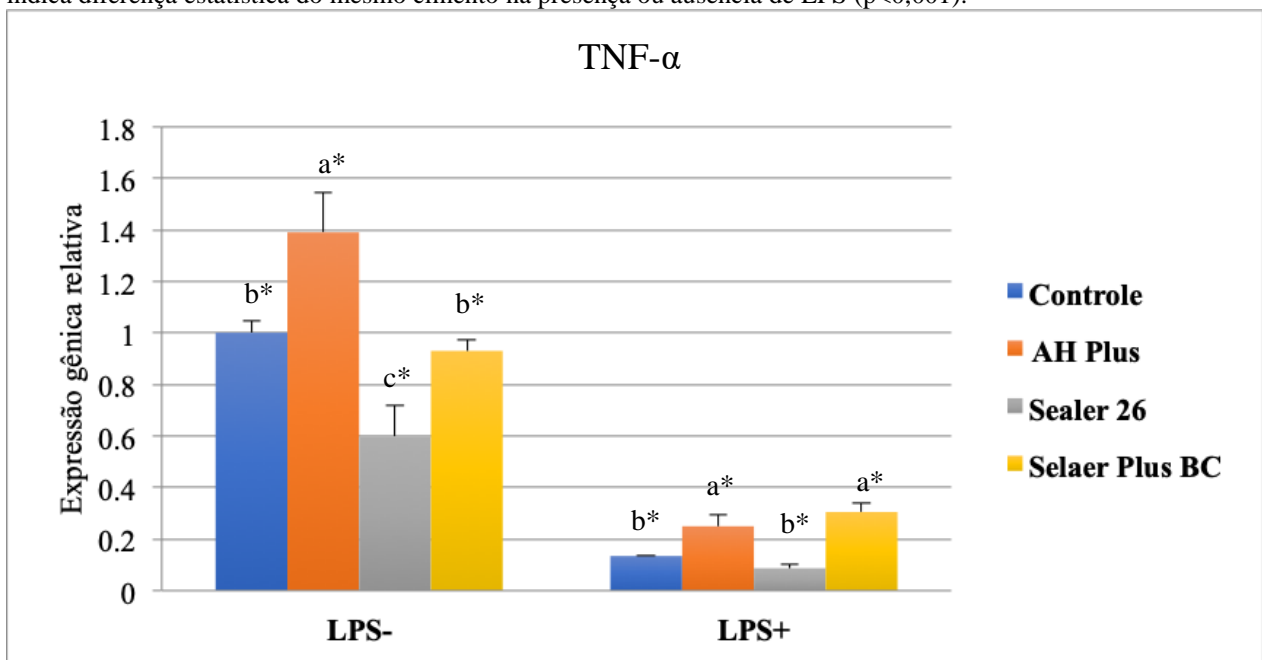
A Análise de Variância demonstrou diferença estatisticamente significativa no valor da expressão do TNF- $\alpha$ , tanto entre os cimentos, quanto na presença de LPS ( $p < 0,001$ ). Foi observada interação entre os fatores, ou seja, os efeitos dos cimentos sobre este parâmetro variaram em função da presença do LPS ( $p < 0,001$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resultados de ANOVA para a expressão do TNF- $\alpha$  na comparação de cimentos, na presença de LPS e interação entre os fatores.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F	P
Cimento	0,305	3	0,102	54,586	<0,001
LPS	1,82	1	1,82	977,017	<0,001
Cimento x LPS	0,072	3	0,024	12,878	<0,001
Resíduo	0,0298	16	0,00186		
Total	2,227	23	0,0968		

Na ausência do LPS, os maiores valores de expressão de TNF- $\alpha$  foram observados para AH Plus ( $p < 0,001$ ), seguidos pelo Controle e Sealer Plus BC, que foram semelhantes entre si ( $p = 0,328$ ) e pelo Sealer 26, que apresentou os menores valores de expressão gênica ( $p < 0,001$ ). Na presença de LPS, os menores valores médios na expressão do TNF- $\alpha$  foram observados para o Sealer 26 e controle ( $p < 0,05$ ) em comparação à AH Plus e Sealer Plus BC, que por sua vez, foram semelhantes entre si ( $p = 0,15$ ). Foi observada interferência na expressão de TNF- $\alpha$  com a presença do LPS para todos os grupos ( $p < 0,05$ ), nos quais foram obtidos valores significativamente menores nas culturas expostas à endotoxina (Figura 14).

**Figura 14.** Expressão relativa de TNF- $\alpha$  em culturas de macrófagos da linhagem RAW 264-7 expostos aos extratos de cimentos na presença ou não de LPS. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os cimentos na mesma condição de exposição ao LPS, enquanto que, o asterisco indica diferença estatística do mesmo cimento na presença ou ausência de LPS ( $p < 0,001$ ).



Fonte: Autor.



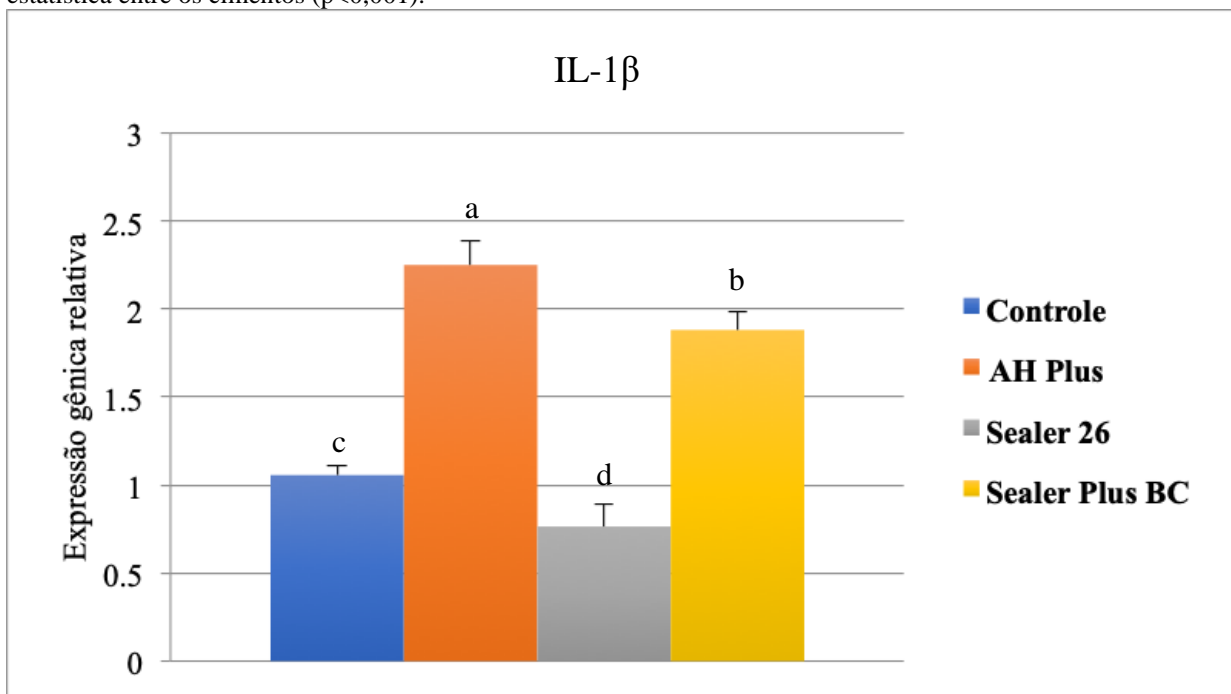
A Análise de Variância demonstrou diferença estatisticamente significativa no valor da expressão do IL-1 $\beta$  tanto entre os cimentos não expostos (Tabela 7) como aos expostos ao (Tabela 8) ao LPS ( $p < 0,001$ ). O teste t evidenciou diferença na expressão gênica para todos os grupos quando comparados pela exposição ao LPS ( $p < 0,001$ ), sendo observado aumento significativo nas culturas expostas à endotoxina.

**Tabela 7.** Resultados de ANOVA para a expressão da IL-1 $\beta$  na comparação entre os cimentos na ausência de LPS.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F	P
Cimento	78539157,92	3	26179719,31	3132,83	<0,001
Resíduo	66852,578	8	8356,572		
Total	78606010,5	11			

Na ausência do LPS, os maiores valores de expressão de IL-1 $\beta$  foram observados para AH Plus ( $p < 0,001$ ), seguidos pelo Sealer Plus BC, Controle e Sealer 26, que apresentou os menores valores de expressão gênica ( $p < 0,001$ ).

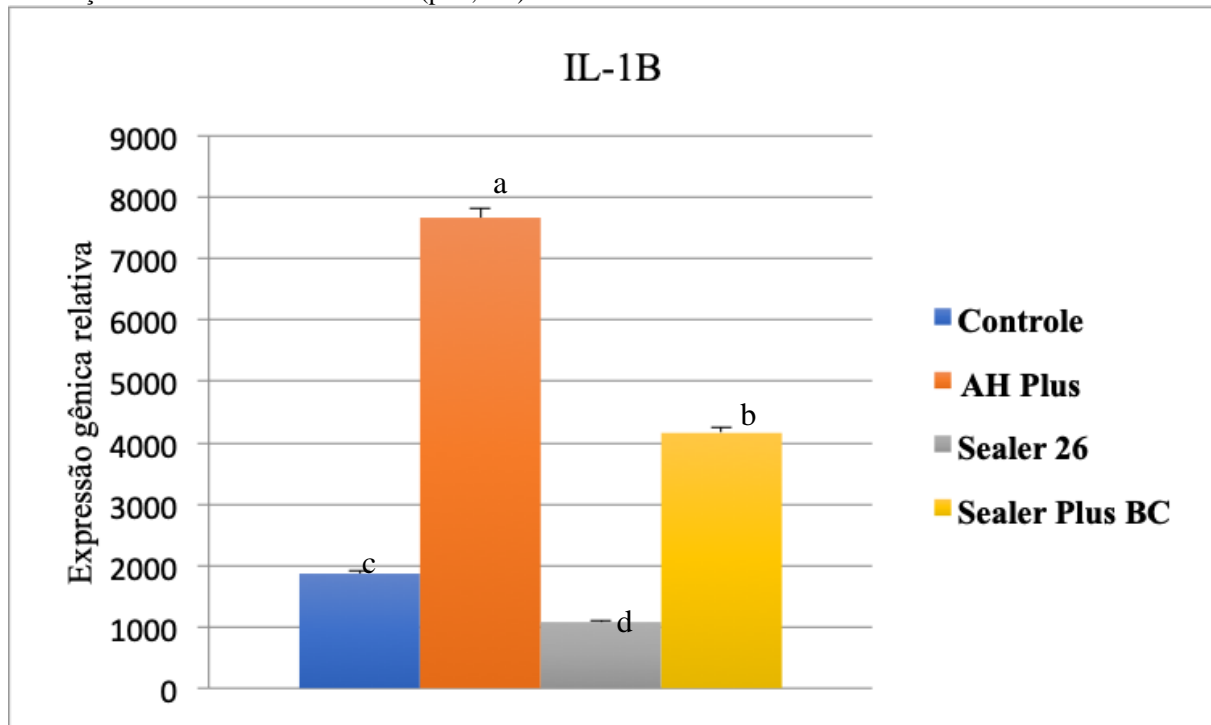
**Figura 15.** Expressão relativa de IL-1 $\beta$  em culturas de macrófagos da linhagem RAW 264-7 expostos aos extratos de cimentos sem LPS. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os cimentos ( $p < 0,001$ ).



**Tabela 8.** Resultados de ANOVA para a expressão da IL-1 $\beta$  na comparação entre os cimentos na presença de LPS.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	GL	Quadrado médio	F	P
Cimento	4,337	3	1,446	117,896	<0,001
Resíduo	0,0981	8	0,0123		
Total	4,435	11			

Na presença de LPS, os maiores valores de expressão de IL-1 $\beta$  foram observados para AH Plus ( $p < 0,001$ ), seguidos pelo Sealer Plus BC, Controle e pelo Sealer 26, que apresentou os menores valores de expressão gênica ( $p < 0,001$ ). (Figura 16).

**Figura 16.** Expressão relativa de IL-1 $\beta$  em culturas de macrófagos da linhagem RAW 264-7 expostos aos extratos de cimentos na presença de LPS. Valores apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística entre os cimentos ( $p < 0,001$ ).

## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se a biocompatibilidade e a modulação inflamatória, *in vitro*, do cimento biocerâmico Sealer Plus BC em comparação à cimentos à base de hidróxido de cálcio (Sealer 26) e resina epóxi (AH Plus) sobre culturas de macrófagos expostos ou não ao LPS. De modo geral, tanto na presença quanto na ausência ao LPS, observou-se maior adesão e espraçamento celular, viabilidade, atividade mitocondrial e estresse oxidativo para culturas expostas ao cimento biocerâmico em relação aos cimentos AH Plus e Sealer 26. Os maiores índices de expressão dos marcadores pró-inflamatórios avaliados foram observados para o cimento AH Plus, enquanto que o cimento Sealer 26 exibiu os menores níveis, independente da presença de LPS.

Para a avaliação da biocompatibilidade e resposta imunomodulatória dos cimentos, optou-se por macrófagos da linhagem celular RAW 264.7. Estas células, quando circulantes no sangue, circulam como monócitos e, quando presente nos tecidos, se diferenciam em macrófagos. Estes participam do mecanismo de defesa, mediado pela apresentação de antígenos aos linfócitos T, fagocitando corpos estranhos e liberando citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias ao cessar do estímulo citotóxico (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). Sabe-se que a degradação dos cimentos endodônticos acarreta na liberação de produtos ou partículas químicas que alteram a função dos macrófagos, podendo ativar ou suprimir sua função (NAIR et al., 1990). Portanto, conhecer o efeito dos cimentos na função destas células é uma consideração relevante para a previsibilidade do prognóstico endodôntico (BRACKETT et al., 2009). Com isso, no presente estudo, os cimentos analisados foram escolhidos baseados nas suas composições, ou seja, nos distintos efeitos que estes podem provocar na biocompatibilidade e na modulação inflamatória, na presença ou na ausência de LPS.

Dentre os cimentos resinosos disponíveis para uso endodôntico, o cimento AH Plus foi selecionado pois é o material considerado como padrão ouro na obturação do sistema de canais radiculares, devido ao seu alto escoamento e baixa solubilidade após a presa final (TORRES et al., 2020). Entretanto, sua toxicidade está atribuída à liberação de formaldeído e degradação de amins que servem para acelerar o processo de polimerização deste cimento a base de resina epóxi (LEE et al., 2019; TEIXEIRA et al., 2017). O cimento Sealer 26, também é um cimento à base de resina epóxi, porém foi escolhido por apresentar o hidróxido de cálcio em sua composição, uma vez que se observa que esse componente pode interferir no processo inflamatório (QUEIROZ et al., 2005;

SOUZA et al., 2019; TANOMARU-FILHO et al., 2009). Por fim, o cimento Sealer Plus BC foi selecionado por ser um cimento biocerâmico que apresenta em sua composição o hidróxido de cálcio, silicato di-cálcico e tri-cálcico e é isento de resina, portanto, quando em contato com fluídos dos tecidos, leva a formação de compostos com propriedades biológicas e potencial de biomineralização (BENETTI et al., 2019). Ainda, considerando todos os cimentos avaliados, existe uma escassez de dados sobre os efeitos destes materiais em macrófagos expostos ao LPS bacteriano, sendo, portanto, pertinente este tipo de avaliação.

Para a verificação inicial da biocompatibilidade *in vitro*, optou-se pela avaliação morfológica por epifluorescência, seguida pela avaliação da viabilidade/citotoxicidade pelo kit comercial LIVE/DEAD<sup>®</sup>. Estudos anteriores comprovam e corroboram a estabilidade, especificidade e sensibilidade destas avaliações (GIORDANO et al., 2011; TAWAKOLI et al., 2013; BARAS et al., 2019; DOS SANTOS COSTAS et al., 2020; KARGARPOUR et al., 2020), sendo estas aprimoradas através da aplicação de sondas fluorogênicas, cuja conversão em moléculas fluorescentes está relacionada com a manutenção e/ou perda da integridade celular (PFEFFER & FLIESLER, 2017). Os dois fluoróforos utilizados no presente estudo apresentam-se não citotóxicos, são estáveis e não se degradam rapidamente (PFEFFER & FLIESLER, 2017). Além disso, para a avaliação da atividade metabólica mitocondrial celular, optou-se pelo ensaio colorimétrico MTT, sendo este um sal (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] de cor amarela que sofre degradação e redução pelas proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis, formando como produto dessa reação a precipitação de cristais de formazan de coloração púrpura (MOSMANN, 1983).

Outro parâmetro amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de cimentos endodônticos é o estresse oxidativo provocado pelo contato destes materiais com células dos tecidos periapicais (KRIFKA et al., 2013; PIRES et al., 2016; MODENA et al., 2018; GAYATHRI et al., 2019; SATO-SUZUKI et al., 2020; PANG et al., 2020). O método de Griess foi utilizado no presente estudo para verificar a existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em decorrência da geração excessiva de radicais livres, como o NO, ou em detrimento da velocidade de remoção destes. Esse processo acarreta a oxidação de biomoléculas e, como consequência, têm-se a perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o potencial dano oxidativo contra células e tecidos (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004). De fato, o NO é considerado como um dos mediadores de inflamação

tecidual (MONCADA et al., 1991; MOILANEN & VAPAATALO, 1995), como o terceiro isômero (iNOS) identificado nas células do sistema imunológico, intervindo não somente nas atividades pró-inflamatórias, mas também na regulação do crescimento e diferenciação celular (TEIXEIRA et al., 2005). Além disso, o NO está envolvido no processo de reabsorção óssea periapical, uma vez que já foi relatado que células, como macrófagos, neutrófilos e fibroblastos, produzem NO em cistos periapicais (TAKEICHI et al., 1999), ou seja, pode ser entendido que este radical livre possui uma significativa associação com a destruição de tecido mineralizado mediado por um processo inflamatório crônico (QUEIROZ et al., 2005).

Ainda, almejando-se um cimento endodôntico que, ao ser colocado em contato com tecidos biológicos, favoreça o reparo tecidual e a resolução do processo inflamatório, avaliou-se a expressão de marcadores inflamatórios. Sabe-se que, de acordo com a composição dos materiais odontológicos, o seu contato direto ou por difusão iônica com os tecidos periapicais pode estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  (BARKORDAR et al., 1999; PERRIER et al., 2002), as quais estão relacionadas com o desenvolvimento, manutenção e reparação de lesões periapicais (DE OLIVEIRA MENDES et al., 2003; SOUZA et al., 2019; TAVARES et al., 2012).

Em relação aos resultados obtidos, verificou-se, independentemente da presença de LPS, maior densidade celular nas culturas expostas ao Controle e Sealer Plus BC, enquanto que, para AH Plus e Sealer 26, observou-se menor densidade, espraiamento e viabilidade celular. De fato, a literatura evidencia que a natureza da interação inicial entre células e biomateriais pode influenciar a adesão e função celular, sendo um bom preditivo de sua biocompatibilidade (AL-HADDAD & CHE AB AZIZ, 2016). Não existem dados na literatura sobre a morfologia de macrófagos em contato com o cimento Sealer Plus BC. Entretanto, foi observado, previamente em culturas de fibroblastos, maior viabilidade de baixas diluições do Sealer Plus BC em comparação ao AH Plus (BENETTI et al., 2019) e aderência celular abundante à superfície do cimento (LÓPEZ-GARCÍA et al., 2020). Os maiores valores de células viáveis em contato com o Sealer Plus BC podem estar relacionados com a liberação de Ca<sup>2+</sup> no meio, favorecendo a migração e adesão celular (AN et al., 2012; CANDEIRO et al., 2016; DA SILVA et al., 2017; BENETTI et al., 2019). Neste sentido, considerando os resultados de viabilidade e morfologia de macrófagos deste estudo, pode-se esperar uma resposta favorável do cimento Sealer Plus BC quando do seu contato com tecido

inflamatório, uma vez que a aderência e disseminação dos macrófagos é a primeira etapa do processo fagocítico que favorece a resposta do sistema imunológico (BRAGA et al., 2015).

Os resultados de viabilidade e morfologia dos macrófagos expostos aos extratos de AH Plus podem ser justificados pelo longo tempo de presa deste cimento, que pode levar a liberação de formaldeído e aminas que apresentam significativo potencial citotóxico inicial (BENETTI et al., 2019; SILVA et al., 2020). Para o Sealer 26, adicionalmente à liberação do éter diglicídico de bisfenol-A e formaldeído da hexametilenotetramina durante seu processo de endurecimento (HUANG et al., 2002), a liberação contínua de  $\text{Ca}^{2+}$  pode levar a uma sobrecarga deste íon no meio intracelular e à morte celular por processos de necrose e indução de apoptose (SOUZA et al., 2019), justificando assim a drástica redução da densidade e espriamento celular.

Corroborando com os dados prévios de morfologia e viabilidade celular, considerando as normas da ISO e diluição apresentada, na avaliação quantitativa do MTT, em ambos os períodos analisados, e, independentemente da presença de LPS, os macrófagos expostos ao Controle e aos extratos do cimento Sealer Plus BC apresentaram valores significativamente maiores de atividade mitocondrial do que os grupos Sealer 26 e AH Plus.

Entretanto, a presença de LPS, promoveu aumento da atividade mitocondrial para todos os grupos em 24 h. De fato, embora o LPS possa inibir a proliferação de macrófagos *in vitro* (BASTOS et al., 2019), não existem evidências de efeito citotóxico da endotoxina. Assim, a maior atividade mitocondrial dos macrófagos observada para estes cimentos, quando do contato com LPS, poderia estar relacionada à polarização e ativação das funções celulares induzidas pela endotoxina (SHAPOURI-MOUGHADDAM et al., 2018), que iriam atuar no processo de fagocitose e neutralização dos componentes tóxicos liberados pelos cimentos.

Na avaliação do estresse oxidativo, foi observado aumento na produção de NO para todas as culturas expostas à endotoxina. Estes resultados foram esperados, uma vez que estudos anteriores evidenciam que o LPS pode aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio, e está diretamente relacionado à produção de citocinas pró-inflamatórias (SHAPOURI-MOUGHADDAM et al., 2018). Ainda, foi observado que, o cimento Sealer 26 apresentou a menor concentração de NO em comparação aos demais cimentos e ao Controle. Além das diferenças observadas na densidade celular desses grupos, a intensa liberação de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  nas primeiras 24 h, observada pelo Sealer 26 (TANOMARU-FILHO et al., 2009), pode ter sido responsável pela hidrólise do LPS (GUO et al., 2014), o que poderia justificar os resultados obtidos. A diferença de

resultados do estresse oxidativo, na presença de LPS, entre o Sealer 26 e Sealer Plus BC pode estar relacionada com a menor liberação iônica e formação de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  do cimento biocerâmico. De fato, em estudos anteriores, foi observado que o Sealer 26 pode liberar 0,730 mg/mL de  $\text{Ca}^{2+}$  nas suas primeiras 24 h (TANOMARU-FILHO, et al. 2009) enquanto que o Sealer Plus BC libera apenas 0,379 mg/mL de  $\text{Ca}^{2+}$  no mesmo período (MENDES, et al., 2018).

Citocinas são moléculas proteicas que podem ser sintetizadas pelas células após a estimulação de produtos da degradação dos materiais endodônticos ou pela agressão bacteriana (PATEL et al., 2016; SHAPOURI-MOUGHADDAM et al., 2018). No presente estudo, foram avaliadas as expressões dos genes  $\text{TNF-}\alpha$ , que apresenta atividade inflamatória e autoimune (DE OLIVEIRA MENDES et al., 2003; HABA et al., 2016; DOS SANTOS COSTA et al., 2020), e a  $\text{IL-1}\beta$ , que estimula a proliferação de linfócitos, neutrófilos e macrófagos, aumentando as atividades quimiotáticas e fagocitárias (MACKAY et al., 1993; TARTAGLIA et al., 1993; ROSSOL et al., 2011; SHAPOURI-MOUGHADDAM et al., 2018). Dos resultados obtidos, na ausência de LPS, os maiores valores de expressão do  $\text{TNF-}\alpha$  foram observados para o AH Plus e, os menores valores observados para o Sealer 26. A maior produção de  $\text{TNF-}\alpha$ , observada para o cimento AH Plus, corrobora com os resultados de morfologia, viabilidade e atividade mitocondrial do presente estudo, uma vez que a degradação da membrana plasmática provocada pela morte celular pode ter estimulado a expressão da citocina nas células remanescentes (HABA et al., 2016). Já para o cimento Sealer 26, a menor expressão do  $\text{TNF-}\alpha$  pode estar relacionado à sua alta liberação de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (TANOMARU-FILHO et al., 2009; MARÍN-BAUZA et al., 2012), que poderia ter diminuído a ativação do complexo proteico  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , que desempenha função como fator de transcrição, e assim neutralizado a sinalização dos macrófagos para a expressão da citocina (GUO et al., 2014).

Na presença de LPS, independente do cimento avaliado, os valores médios na expressão de  $\text{TNF-}\alpha$  foram significativamente menores em comparação às culturas não expostas à endotoxina. Estes resultados podem estar relacionados aos altos valores de NO observados para todas as culturas expostas ao LPS. De fato, a produção de  $\text{TNF-}\alpha$  está relacionada à fluidificação da membrana plasmática dos macrófagos, entretanto, sob estresse oxidativo, observa-se um enrijecimento de sua membrana e inibição da expressão desta citocina (HABA et al., 2016), o que neste estudo foi confirmado também pelos resultados do grupo Controle. Portanto, pelas condições

observadas na expressão de TNF- $\alpha$  sob efeito do LPS, as funções dos macrófagos podem ser comprometidas para a resolução do processo inflamatório, independente do cimento utilizado.

Na expressão da IL-1 $\beta$ , tanto na presença quanto na ausência de LPS, os maiores valores de expressão do gene foram observados para o AH Plus, seguido pelo Sealer Plus BC e Sealer 26, que apresentou os menores valores de expressão gênica. A menor expressão de IL-1 $\beta$ , observada para os macrófagos expostos ao Sealer 26 sob efeito do LPS, pode estar relacionada à alta liberação de OH<sup>-</sup>, promovendo a hidrólise da endotoxina, minimizando a expressão da citocina (GUO et al., 2014). Os valores intermediários de expressão de IL-1 $\beta$  para Sealer Plus BC poderiam ser justificados pela menor liberação de Ca(OH)<sub>2</sub>, quando comparado ao cimento Sealer 26 (TANOMARU-FILHO et al., 2009; MENDES, et al., 2018). De modo geral, as culturas expostas ao LPS apresentaram maior expressão de IL-1 $\beta$  em comparação às culturas não expostas à endotoxina. Corroborando com estes resultados, estudos anteriores evidenciaram que o LPS pode aumentar o potencial na expressão de citocinas pró-inflamatórias de diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos (ZHU et al., 2015; SHAPOURI-MOUGHADDAM et al., 2018).

A avaliação dos materiais odontológicos através da cultura celular *in vitro* apresenta algumas limitações como: necessidade de diluição progressiva do material devido à renovação do meio de cultura; curtos períodos avaliativos, para evitar a deterioração da cultura celular; e avaliação após o primeiro período de presa, o que representa uma redução da solubilidade e consequente menor liberação dos componentes do material. Entretanto, se faz necessário ressaltar a importância de cada etapa avaliativa, sendo que as metodologias *in vitro* permitem obtenção de resultados em diferentes períodos de desenvolvimento celular, são métodos de alta reprodutibilidade e, a resposta de uma linhagem celular isolada é pertinente para a compreensão das reações observadas nos tecidos biológicos (AZAR et al., 2000; QUEIROZ et al., 2005).

Considerando os resultados e limitações do presente estudo, existe um potencial citotóxico sobre macrófagos dos cimentos à base de resina epóxi, i.e. Sealer 26 e AH Plus, diferente do que foi observado para o cimento biocerâmico Sealer Plus BC. Por outro lado, demonstrou-se que cimentos que liberam Ca(OH)<sub>2</sub>, Sealer 26 e Sealer Plus BC, modulam negativamente a expressão de marcadores inflamatórios em relação ao AH Plus, principalmente na presença do LPS. Conjuntamente, esses achados sugerem que o cimento biocerâmico exibe características que o tornam favorável ao processo de reparo quando do contato com tecidos que apresentem LPS.



## 6. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos e as limitações do presente estudo, pode-se concluir que:

- Independente da presença de LPS, o cimento Sealer Plus BC permiti a adesão, espraiamento e viabilidade de macrófagos, enquanto que AH Plus e Sealer 26 promovem redução nesses parâmetros.
- O Sealer Plus BC favorece a atividade mitocondrial de macrófagos, independente da presença de LPS, enquanto que AH Plus e Sealer 26 promovem redução nesses parâmetros.
- O cimento Sealer 26 apresenta uma tendência para inibir o aumento do estresse oxidativo de macrófagos sob efeito do LPS em relação aos demais cimentos avaliados.
- O cimento AH Plus induz maior expressão gênica de marcadores inflamatórios em relação aos demais cimentos com hidróxido de cálcio em sua composição, favorecendo a expressão gênica do TNF- $\alpha$  na ausência do LPS e promovendo a expressão da IL-1 $\beta$ , independentemente do LPS. O cimento Sealer 26 promove o menor potencial inflamatório, com menores valores de expressão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em macrófagos, independente do LPS.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, Paul V. Classification, diagnosis and clinical manifestations of apical periodontites.

**Endodontic Topics**, v. 8, n. 1, p. 36-54, 2004.

ALBUQUERQUE, D. S., GOMINHO, L. F., SANTOS, R. A. Histologic evaluation of pulpotomy performed with ethyl-cyanoacrylate and calcium hydroxide. **Brazilian Oral**

**Research**, v. 20, n. 3, p. 226-30, 2006.

AL-HADDAD, A., CHE AB AZIZ, Z. A. Bioceramic-based root canal sealers: a

review. **International Journal of Biomaterials**, v. 2016, 2016.

ALVES- SILVA, E. C., TANOMARU-FILHO, M., DA SILVA, G. F., DELFINO, M. M., CERRI, P. S., & GUERREIRO-TANOMARU, J. M. Biocompatibility and Bioactive Potential of

New Calcium Silicate-based Endodontic Sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. **Journal of Endodontics**, v. 46, n. 10, p. 1470-1477, 2020.

ALMEIDA, M. M., RODRIGUES, C. T., MATOS, A. A., CARVALHO, K. K. T., SILVA, E. J.

N. L., DUARTE, M. A. H., ... & BERNARDINELLI, N. Analysis of the physicochemical properties, cytotoxicity and volumetric changes of AH Plus, MTA Fillapex and TotalFill BC Sealer. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 12, n. 11, p. e1058, 2020.

AN, S., GAO, Y., LING, J., WEI, X., XIAO, Y. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: Implications for pulp capping materials. **Journal of Materials Science Materials in Medicine**, v. 23, p. 789–795, 2012.

AZAR, N. G., HEIDARI, M., BAHRAM, Z. S., SHOKRI, F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 8, p. 462-465, 2000.

BARAS, B. H., SUN, J., MELO, M. A. S., TAY, F. R., OATES, T. W., ZHANG, K., ... & XU, H. H. Novel root canal sealer with dimethylaminohexadecyl methacrylate, nano-silver and nano-calcium phosphate to kill bacteria inside root dentin and increase dentin hardness. **Dental Materials**, v. 35, n. 10, p. 1479-1489, 2019.

BARKHORDAR, R. A., HAYOSHI, C., HURSSAIN, M. Z. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. **Endodontics & Dental Traumatology**, v. 15, p. 26-27, 1999.

BARBOSA, V. M., PITONDO-SILVA, A., OLIVEIRA-SILVA, M., MARTORANO, A. S., RIZZI-MAIA, C. D. C., SILVA-SOUSA, Y. T. C., ... & RAUCCI NETO, W. Antibacterial Activity of a New Ready-To-Use Calcium Silicate-Based Sealer. **Brazilian Dental Journal**, v. 31, n. 6, p. 611-616, 2020.

BASTOS, L. A., SILVA, F. L., THOMÉ, J. P. Q., ARNEZ, M. F. M., FACCIOLI, L. H., PAULA-SILVA, F. W. G. Effects of Papain-Based Gel Used For Caries Removal on Macrophages and Dental Pulp Cells. **Brazilian Dental Journal**, v. 30, n. 5, p. 484-490, 2019.

BENETTI, F., DE AZEVEDO QUEIROZ, Í. O., OLIVEIRA, P. H. C. D., CONTI, L. C., AZUMA, M. M., OLIVEIRA, S. H. P. D., & CINTRA, L. T. A. Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. **Brazilian Oral Research**, v. 33, p. e042, 2019.

BEDRAN, N. R., NADELMAN, P., MAGNO, M. B., DE ALMEIDA NEVES, A., FERREIRA, D. M, PINTOR, A. V. B., PRIMO, L. G. Does calcium hydroxide reduce endotoxins in infected root canals? Systematic review and meta-analysis. **Journal of Endodontics**, v.S0099-2399, n.20, p. 30582-30583, 2020.

BERTOSSI, D., BARONE, A., IURLARO, A., MARCONCINI, S., DE SANTIS, D., FINOTTI, M., & PROCACCI, P. Odontogenic orofacial infections. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 28, n. 1, p.197-202, 2017.

BOEDDINGHAUS, R.; WHYTE, A. The many faces of periapical inflammation. **Clinical Radiology**, v. 75, n. 9, p. 675-687, 2020.

BRACKETT, M. G., MARSHALL, A., LOCKWOOD, P. E., LEWIS, J. B., MESSER, R. L., BOUILLAGUET, S., & WATAHA, J. C. Inflammatory suppression by endodontic sealers after aging 12 weeks in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 91, n. 2, p.839-844, 2009.

BRACKETT, M. G., LEWIS, J. B., MESSER, R. L., LEI, L., LOCKWOOD, P. E., & WATAHA, J. C. Dysregulation of monocytic cytokine secretion by endodontic sealers. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 97, n. 1, p. 49-57, 2011.

BRACKETT, M. G., LEWIS, J. B., KIOUS, A. R., MESSER, R. L., LOCKWOOD, P. E., BRACKETT, W. W., & WATAHA, J. C. Cytotoxicity of endodontic sealers after one year of aging in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 7, p. 1729-1735, 2012.

BRAGA, J. M., OLIVEIRA, R. R., DE CASTRO MARTINS, R., VIEIRA, L. Q., SOBRINHO, A. P. Assessment of the cytotoxicity of a mineral trioxide aggregate-based sealer with respect to macrophage activity. **Dental Traumatology**, v. 31, n. 5, p. 390-395, 2015.

BRISO, A. L., RAHAL, V., MESTRENER, S. R., DEZAN JUNIOR E. Biological response of pulps submitted to different capping materials. **Brazilian Oral Research**, n. 20, v. 3, p. 219-25, 2016.

BRAZ-SILVA, P. H., BERGAMINI, M. L., MARDEGAN, A. P., DE ROSA, C. S., HASSEUS, B., JONASSON, P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 77, n. 3, p. 173-180, 2019.

CANDEIRO, G. T. M., MOURA-NETTO, C., D'ALMEIDA-COUTO, R. S., AZAMBUJA-JÚNIOR, N., MARQUES, M. M., CAI, S., & GAVINI, G. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. **International endodontic journal**, v. 49, n. 9, p. 858-864, 2016.

CAVALCANTI, B. N., RODE, S. M., FRANÇA, C. M., MARQUES, M. M. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 $\beta$  and IL-8 by migrating human neutrophils. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 1, p. 13-18, 2011.

CAVALLA, F., LETRA, A., SILVA, R. M., GARLET, G. P. Determinants of Periodontal/Periapical Lesion Stability and Progression. **Journal of Dental Research**, v. 100, n. 1, p. 29-36, 2021.

CINTRA, L. T. A., RIBEIRO, T. A. A., GOMES-FILHO, J. E., BERNABÉ, F. E., WATANABE, S., FACUNDO, A. C. S., SAMUEL, R. O., DEZAN-JUNIOR, E. Biocompatibility and biomineralization assessment of a new root canal and root-end filling material. **Dental Traumatology**, v. 29, p.145-150, 2013.

CHAVEZ DE PAZ, L. E., DAHLÉN, G., MOLANDER, A., MÖLLER, Å., & BERGENHOLTZ, G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **International Endodontics Journal**, v. 36, n. 7, p. 500-508, 2003.

COTTI, E., IDEO, F., PEDRAZZINI, A., BARDINI, G., MUSU, D., KANTARCI, A. Pro-resolving Mediators in Endodontics: A Systematic Review. **Journal of Endodontics**, v. 47, n. 5, p. 711-720, 2021.

DA SILVA, E. J. N. L., ZAIA, A. A., & PETERS, O. A. Cytocompatibility of calcium silicate-based sealers in a three-dimensional cell culture model. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 5, p. 1531-1536, 2017.

DELFINO, M. M., GUERREIRO-TANOMARU, J. M., TANOMARU-FILHO, M., SASSO-CERRI, E., & CERRI, P. S. Immunoinflammatory response and bioactive potential of GuttaFlow bioseal and MTA Fillapex in the rat subcutaneous tissue. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.

DE OLIVEIRA MENDES, S. T., SOBRINHO, A. P. R., DE CARVALHO, A. T., DE SOUZA CÔRTEZ, M. I., & VIEIRA, L. Q. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 2, p. 95-99, 2003.

DOS SANTOS COSTA, F. M., FERNANDES, M. H., & DE MEDEIROS, S. R. B. Genotoxicity of root canal sealers: a literature review. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 10, p. 3347-3362, 2020.

FALFÁN, V. R. Factor de necrosis tumoral: actividad biológica en neumopatías intersticiales. **Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias**, v. 15, n.1, p. 48–53, 2002.

FERREIRA, N. D. S., GOLLO, E. K. F., BOSCATO, N., ARIAS, A., & SILVA, E. J. N. L. D. Postoperative pain after root canal filling with different endodontic sealers: a randomized clinical trial. **Brazilian Oral Research**, v. 34, 2020.

FOUAD, A. F., KHAN, A. A., SILVA, R. M., KANG, M. K. Genetic and Epigenetic Characterization of Pulpal and Periapical Inflammation. **Frontiers in Physiology**, v. 4; n. 11, p. 21, 2020.

GAYATHRI, S., ELIZABETH, K., SADASIVAN, A., ARUNIMA, P. R., & KUMAR, J. Effect of Initial Periodontal Therapy on Serum Nitric Oxide Levels in Chronic Periodontitis Patients with or without Type 2 Diabetes Mellitus. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 20, n. 2, p. 197-203, 2019.

GIORDANO, G., HONG, S., FAUSTMAN, E. M., & COSTA, L. G. Measurements of cell death in neuronal and glial cells. **In Vitro Neurotoxicology**, v. 758, p. 171-178, 2011.

GOMES, B. P., PINHEIRO, E. T., GADÊ-NETO, C. R., SOUSA, E. L., FERRAZ, C. C., ZAIA, A. A., ... & SOUZA-FILHO, F. J. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 2, p. 71-76, 2004.

GUO, J., YANG, D., OKAMURA, H., TERAMACHI, J., OCHIAI, K., QIU, L., HANEJI, T. Calcium hydroxide suppresses Porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide-induced bone destruction. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 5, p. 508-513, 2014.

HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

DE LA HABA, C., MORROS, A., MARTÍNEZ, P., PALACIO, J. R. LPS-Induced Macrophage Activation and Plasma Membrane Fluidity Changes are Inhibited Under Oxidative Stress. **The Journal of Membrane Biology**, v. 249, n. 6, p. 789-800, 2016.



HESSLE, C. C., ANDERSSON, B., WOLD, A. E. Gram-positive and Gram-negative bacteria elicit different patterns of pro-inflammatory cytokines in human monocytes. **Cytokine**, v. 30, n. 6, p. 311-318, 2005.

JAFARI, F., & JAFARI, S. Composition and physicochemical properties of calcium silicate based sealers: A review article. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 9, n. 10, p. e1249, 2017.

KARGARPOUR, Z., NASIRZADE, J., STRAUSS, F. J., DI SUMMA, F., HASANNIA, S., MÜLLER, H. D., & GRUBER, R. Platelet-rich fibrin suppresses in vitro osteoclastogenesis. **Journal of Periodontology**, v. 91, n. 3, p. 413-421, 2020.

KAUR, B. P., & SECORD, E. Innate Immunity. **Pediatric Clinics of North America**, v. 66, n. 5, p. 905-911, 2019.

KRIFKA, G., SPAGNUOLO, G., SCHMALZ, SCHWEIKL, H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. **Biomaterials**, v. 34, n. 19, p. 4555–4563, 2013.

LEE, B. N., HONG, J. U., KIM, M. S.M., JANG, J. H., CHANG, S. H., HWANG, C. Y., HWANG, N. I., OH, M. W. Anti-inflammatory and Osteogenic Effects of Calcium Silicate–based Root Canal Sealers. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 1, p. 73-78, 2019.

LÓPEZ-GARCÍA, S., MYONG-HYUN, B., LOZANO, A., GARCÍA-BERNAL, D., FORNER, L., LLENA, C., ... & RODRÍGUEZ-LOZANO, F. J. Cytocompatibility, bioactivity potential, and

ion release of three premixed calcium silicate-based sealers. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n.5, p. 1749-1759, 2020.

LOPES, H. P., JR. SIQUEIRA, J. F. Endodontia – Biologia e Técnica- 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2020.

MACKAY, F., LOESTER, H., STUEBER, D., GEHR, G., LES-SLAUR, W. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 5, p. 1277-1286, 1993.

MACHADO, F. P., KHOURY, R. D., TOIA, C. C., FLORES OROZCO, E. I., DE OLIVEIRA, F. E., DE OLIVEIRA, L. D., DA ROSA CARDOSO, F. G., VALERA, M. C. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 9, p. 3169-3179, 2020.

MARÍN-BAUZA, G. A., SILVA-SOUSA, Y. T. C., CUNHA, S. A. D., RACHED-JUNIOR, F. J. A., BONETTI-FILHO, I., SOUSA-NETO, M. D., & MIRANDA, C. E. S. Physicochemical properties of endodontic sealers of different bases. **Journal of Applied Oral Science**, v. 20, n. 4, p. 455-461, 2012.

MENDES, A. T., SILVA, P. B. D., SÓ, B. B., HASHIZUME, L. N., VIVAN, R. R., ROSA, R. A. D., ... & SÓ, M. V. R. Evaluation of physicochemical properties of new calcium silicate-based sealer. **Brazilian Dental Journal**, v. 29, n. 6, p. 536-540, 2018.

MODENA, K. C. D. S., CALVO, A. M., SIPERT, C. R., DIONÍSIO, T. J., NAVARRO, M. F. D. L., ATTA, M. T., & SANTOS, C. F. Dental pulp fibroblasts response after stimulation with hema and adhesive system. **Brazilian Dental Journal**, v. 29, n. 5, p. 419-426, 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MONCADA, S., PALMER, R. M., HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MOILANEN, E., VAPAATALO, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. **Annals of Internal Medicine**, v. 27, p. 359-367, 1995.

MUTOH, N., TANI-ISHII, N. A biocompatible model for evaluation of the responses of rat periapical tissue to a new zinc oxide-eugenol sealer. **Dental Materials Journal**, v. 30, n. 2, p. 176-182, 2011.

NAIR, P. R., SJÖGREN, U., KREY, G., & SUNDQVIST, G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. **Journal of Endodontics**, v. 16, n. 12, p. 589-595, 1990.

PANG, Q., WU, Q., HU, X., ZHANG, J., & JIANG, Q. Tooth loss, cognitive impairment and chronic cerebral ischemia. **Journal of Dental Sciences**, v.15, n. 1, p. 84-91, 2020.

PATEL, S., MAHESHWARI, A., CHANDRA, A. Biomarkers for wound healing and their evaluation. **Journal of Wound Care**, v. 25, n. 1, p. 46-55, 2016.

PAULA-SILVA, F. W. G., RIBEIRO-SANTOS, F. R., PETEAN, I. B. F., MANFRIN ARNEZ, M. F., ALMEIDA-JUNIOR, L. A., CARVALHO, F. K., SILVA LABD, FACCIOLI, L. H. Root canal contamination or exposure to lipopolysaccharide differentially modulate prostaglandin E 2 and leukotriene B 4 signaling in apical periodontitis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 28, p. e20190699, 2020.

PEDANO, M.S., LI, X., LI, S., SUN, Z., COKIC, S.M., PUTZEYS, E., YOSHIHARA, K., YOSHIDA, Y., CHEN, Z., VAN LANDUYT, K., VAN MEERBEEK, B. Freshly-mixed and setting calcium-silicate cements stimulate human dental pulp cells. **Dental Materials**, v. 34, n. 5, p. 797-808, 2018.

PERRIER, S., KHERRATA, B., DESCHAUMES, C., UGHETTO, S., KEMENY, J. L., BAUDET-POMMEL, M., SAUVEZIE, B. IL-1ra and IL-1 production in human oral mucosal epithelial cells in culture: differential modulation by TGF-beta 1 and IL-4. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 127, p. 53-59, 2002.

PIRES, C. W., BOTTON, G., CADONÁ, F. C. Induction of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. **International Endodontics Journal**, v. 49, n. 8, p. 737–745, 2016.

PFEFFER, B. A., & FLIESLER, S. J. Streamlined duplex live-dead microplate assay for cultured cells. **Experimental Eye Research**, v. 161, p. 17-29, 2017.

QUEIROZ, C. E. D. S., SOARES, J. A., LEONARDO, R. D. T., CARLOS, I. Z., & DINELLI, W. Evaluation of cytotoxicity of two endodontic cements in a macrophage culture. **Journal of Applied Oral Science**, v. 13, n. 3, p. 237-242, 2005.

RAGHAVENDRA, S. S., JADHAV, G. R., GATHANI, K. M., & KOTADIA, P. Bioceramics in endodontics—a review. **Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry**, v. 51, n. 3, p. S128, 2017.

RECHENBERG, D. K., MUNIR, A., ZEHNDER, M. Correlation between the clinically diagnosed inflammatory process and periapical index scores in severely painful endodontically involved teeth. **International Endodontics Journal**, v. 54, n. 2, p. 172-180, 2021.

ROSSOL, M., HEINE, H., MEUSCH, U., QUANDT, D., KLEIN, C., SWEET, M. J., HAUSCHILDT, S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical Reviews in Immunology**, v. 31, n. 5, p. 379-446, 2011.

SANGWAN, P., SANGWAN, A., DUHAN, J., ROHILLA, A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. **International Endodontic Journal**, n. 46, v. 1, p. 3-19, 2013.

SATO-SUZUKI, Y., WASHIO, J., WICAKSONO, D. P., SATO, T., FUKUMOTO, S., & TAKAHASHI, N. Nitrite-producing oral microbiome in adults and children. **Scientific Reports**, v.10, n. 1, p.1-12, 2020.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A., MOHAMMADIAN, S., VAZINI, H., TAGHADOSI, M., ESMAEILI, S. A., MARDANI, F., ... & SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018.

SIPAVIČIŪTĖ, E., MANELIENĖ, R. Pain and flare-up after endodontic treatment procedures. **Stomatologija**, v. 16, n. 1, p. 25-30, 2014.

SILVA, E. J., HECKSHER, F., VIEIRA, V. T., VIVAN, R. R., DUARTE, M. A., BRASIL, S. C., ANTUNES, H. S. Cytotoxicity, antibacterial and physicochemical properties of a new epoxy resin-based endodontic sealer containing calcium hydroxide. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 12, n. 6, p. e533-e539, 2020.

SIQUEIRA, J. F. JR., RÔÇAS, I. N., RICUCCI, D., HÜLSMANN, M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. **Brazilian Dental Journal**, v. 216, n.6, p.305-312, 2014.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A., MOHAMMADIAN, S., VAZINI, H., TAGHADOSI, M., ESMAEILI, S. A., MARDANI, F., SEIFI, B., MOHAMMADI, A., AFSHARI, J. T., SAHEBKAR, A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018.

SCHWARZE, T., FIEDLER, I., LEYHAUSEN, G., GEURTSSEN, W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 11, p. 784-78, 2002.

SCHAFFER, E., ZANDBIGLARI, T. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. **International Endodontics Journal**, v. 36, n. 10, p. 660-669, 2003.

SOUZA, G. L., ROSATTO, C. M. P., SILVA, M. J. B., SILVA, M. V., ROCHA RODRIGUES, D. B., & MOURA, C. C. G. Evaluation of apoptosis/necrosis and cytokine release provoked by three root canal sealers in human polymorphonuclears and monocytes. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 5, p. 629-638, 2019.

TANOMARU-FILHO, M., FALEIROS, F. B. C., SAÇAKI, J. N., DUARTE, M. A. H., & GUERREIRO-TANOMARU, J. M. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 10, p.1418-1421, 2009.

TARTAGLIA, L. A., AYRES, T. M., WONG, G. H., GOEDDEL, D. V. A novel domain within the 55 kd TNF recep-tor signals cell death. **Cell**, v. 74, p. 845-853, 1993.

TAVARES, C. O., BÖTTCHER, D. E., ASSMANN, E., KOPPER, P. M. P., DE FIGUEIREDO, J. A. P., GRECCA, F. S., & SCARPARO, R. K. Tissue reactions to a new mineral trioxide aggregate-containing endodontic sealer. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 5, p.653-657, 2013.

TADA H, NEMOTO E, KANAYA S, HAMAJI N, SATO H, SHIMAUCHI H. Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, p. 1093–1097, 2010.

TARTAGLIA, L. A., AYRES, T. M., WONG, G. H., GOEDEL, D. V. A novel domain within the 55 kd TNF recep-tor signals cell death. **Cell**, v. 74, n. 5, p. 845-853, 1993.

TAKEICHI, O., HAYASHI, M., TSURUMACHI, T., TOMITA, T., OGIHARA, H., OGIRO, B. Inducible nitric oxide synthase activity by interferon-gamma-producing cells in human radicular cysts. **International Endodontics Journal**, v. 32, n. 2, p. 124-130, 1999.

TAWAKOLI, P. N., AL-AHMAD, A., HOTH-HANNIG, W., HANNIG, M., & HANNIG, C. J. C. O. I. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 3, p. 841-850, 2013.

TEIXEIRA, L., BASSO, F. G., HEBLING, J., COSTA, C. A. D. S., MORI, G. G., SILVA-SOUSA, Y. T. C., & OLIVEIRA, C. F. D. Cytotoxicity evaluation of root canal sealers using an in vitro experimental model with roots. **Brazilian Dental Journal**, v. 28, n. 2, p. 165-171, 2017.



TEIXEIRA, M., CERQUEIRA, F., BARBOSA, C. M., NASCIMENTO, M. S., PINTO, M. Improvement of the inhibitory effect of xanthenes on NO production by encapsulation in PLGA nanocapsules. **Journal of Drug Targeting**, v. 13, n. 2, p. 129-135, 2005.

TIBÚRCIO-MACHADO, C. S., MICHELON, C., ZANATTA, F. B., GOMES, M. S., MARIN, J. A., BIER, C. A. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **International Endodontics Journal**, v. 54, n. 5, p.712-735, 2021.

TORRES, F. F. E., ZORDAN-BRONZEL, C. L., GUERREIRO-TANOMARU, J. M., CHÁVEZ-ANDRADE, G. M., PINTO, J. C., & TANOMARU-FILHO, M. Effect of immersion in distilled water or phosphate-buffered saline on the solubility, volumetric change and presence of voids within new calcium silicate-based root canal sealers. **International Endodontic Journal**, v. 53, n. 3, p. 385-391, 2020.

TRONSTAD, L. Clinical Endodontics – a textbook. New York: Thieme Medical Publisherd, p. 158-166, 1991.

ZHOU, H. M., DU, T. F., SHEN, Y., WANG, Z. J., ZHENG, Y. F., HAAPASALO, M. In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 1, p. 56-61, 2015.

ZHU, L., ZHAO, Q., YANG, T., DING, W., ZHAO, Y. Cellular metabolism and macrophage functional polarization. **Internation Reviews of Immunology**, v. 34, n. 1, p. 82-100, 2015.

WANG, H. W., LAI, E. H. H., YANG, C. N., LIN, S. K., HONG, C. Y, YANG, H., CHANG, J. Z. C., KOK, S. H. Intracanal metformin promotes healing of apical periodontitis via suppressing inducible nitric oxide synthase expression and monocyte recruitment. **Journal of Endodontics**, v. 46, n. 1, p. 65-73, 2020.