

**UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**COMPARAÇÃO DO GRAU DE CITOTOXICIDADE DE SETE
CIMENTOS ENDODÔNTICOS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO E
RESINA EPÓXI IN VITRO COM CÉLULAS SAOS 2**

SARA LEAL PONZIO

2022

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

COMPARAÇÃO DO GRAU DE CITOTOXICIDADE DE SETE
CIMENTOS ENDODÔNTICOS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO
E RESINA EPÓXI IN VITRO COM CÉLULAS SAOS2

SARA LEAL PONZIO

Dissertação apresentada ao Programa
de
Pós-Graduação em Odontologia, da
Universidade do Grande Rio
(UNIGRANRIO), como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Odontologia. Área de
Concentração: Endodontia.

Orientadores:

Prof. Dr José Freitas Siqueira Júnior Prof^a

Dr^a. Sara Gemini Piperni

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO / AFYA –BIBLIOTECA BARRA DA TIJUCA

P819c Ponzio, Sara Leal.
 Comparação do grau de citotoxicidade de sete cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio e resina epóxi in vitro com células saos 2 / Sara Leal Ponzio. – Rio de Janeiro, 2022.
 44 f. : il. ; 30 cm.

 Dissertação (mestrado em Odontologia) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Escola de Ciências da Saúde, 2022.
 Professor orientador: Prof. Dr José Freitas Siqueira Júnior.
 Professor orientador: Profa Dra . Sara Gemini Piperni.
 Referências: f. 40-44.

 1. Odontologia. 2. Endodontia. 3. Cimentos endodônticos. 4. Citotoxicidade. 5. Biocompatibilidade. I. Siqueira Júnior, José Freitas. II. Piperni, Sara Gemini. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. IV. Título.

CDD – 617.6


COMPARAÇÃO DO GRAU DE CITOTOXICIDADE DE SETE
CIMENTOS ENDODÔNTICOS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO E
RESINA EPÓXI IN VITRO COM CÉLULAS SAOS2

SARA LEAL PONZIO


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Área de Concentração: Endodontia).

Aprovada em 16 de Novembro de 2022

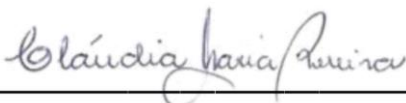
Banca examinadora




Prof(a). Dr(a). José Freitas Siqueira Júnior
Universidade do Grande Rio



Prof(a). Dr(a). Sara Gemini Piperni
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof(a). Dr(a). Claudia Maria Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro



Prof(a). Dr(a). Danielle Dutra Voigt
Universidade do Grande Rio

RESUMO

Os cimentos endodônticos são materiais com a função de promover a cimentação dos cones de guta-percha e de auxiliar na obturação do canal radicular preparado, preenchendo espaços não ocupados pelos cones, incluindo canais laterais/acessórios, recessos e irregularidades. Além da sua capacidade de selamento, os cimentos endodônticos devem possuir outras características, dentre elas a biocompatibilidade. Uma vez que esses materiais são levados ao interior do canal radicular e entram em contato com os tecidos perirradiculares, é importante que não sejam citotóxicos, ou que pelo menos não interfiram negativamente com a reparação tecidual. Cimentos que possuem agentes citotóxicos em sua composição podem levar a reações inflamatórias, danos nos tecidos perirradiculares e retardo no processo de reparação. Portanto, a escolha de um cimento endodôntico biocompatível e biologicamente ativo tem o potencial de contribuir para o sucesso a longo prazo do tratamento. Com o objetivo avaliar o grau de citotoxicidade e determinar quais cimentos endodônticos apresentam maior biocompatibilidade visando contribuir para a literatura, este estudo in vitro, com células SaOs-2, avaliou o grau de citotoxicidade de sete cimentos endodônticos, Bio C Sealer, Bio C ION+, Total Fill, MTA Fillapex, AH Plus, Sealer Plus e Sealer 26, em estado *fresh* e após a reação de presa em dois tempos de liberação de partículas. Os resultados indicaram uma correlação concentração dependente com o grau de citotoxicidade dos materiais, além da maior citotoxicidade em sua forma *fresh*, confirmando a hipótese de que os materiais são mais agressivos aos tecidos no momento de sua inserção no canal radicular, antes de tomar presa.

Palavras-chave: citotoxicidade, cimentos endodônticos, biocompatibilidade.

ABSTRACT

Root canal sealers are materials with the function of promoting the cementation of gutta-percha cones and assisting in the obturation of the prepared root canal, filling spaces not occupied by the cones, including lateral/accessory canals, recesses and irregularities. In addition to its sealing ability, sealers must have other characteristics, including biocompatibility. Since these materials are carried into the root canal and come into contact with the periradicular tissues, it is important that they are not cytotoxic, or at least do not interfere negatively with tissue repair. Sealers that have cytotoxic agents in their composition can lead to inflammatory reactions, damage to periradicular tissues and delay in the repair process. Therefore, the choice of a biocompatible and biologically active root canal sealer has the potential to contribute to the long-term success of endodontic treatment. In order to evaluate the degree of cytotoxicity and determine which endodontic sealers have greater biocompatibility in order to contribute to the literature, this study in vitro, with SaOS-2 cells, evaluated the degree of cytotoxicity of seven sealers, Bio C Sealer, Bio C ION+, Total Fill, MTA Fillapex, AH Plus, Sealer Plus and Sealer 26, in fresh state and after the setting reaction in two times of particle release. The results indicated a concentrationdependent correlation with the degree of cytotoxicity of the materials, in addition to the greater cytotoxicity in their fresh form, confirming the hypothesis that the materials are more toxic to the tissues at the time of their insertion into the root canal, before setting.

Keywords: cytotoxicity, endodontic cements, biocompatibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema da configuração das placas de cultura.....	19
Figura 2.	Gráfico do Bio C Sealer.....	21
Figura 3.	Gráfico do Bio C Sealer Ion +	22
Figura 4.	Gráfico do Sealer Plus.....	23
Figura 5.	Gráfico do Total Fill.....	24
Figura 6.	Gráfico do AH Plus.....	25
Figura 7.	Gráfico do MTA Fillapex.....	27
Figura 8.	Gráfico do Sealer 26.....	28
Figura 9.	Representação em gráfico da tabela 2.....	29
Figura 10.	Representação em gráfico da tabela 3.....	30
Figura 11.	Representação em gráfico da tabela 4.....	31
Figura 12.	Representação em gráfico da tabela 5.....	32
Figura 13.	Meios condicionados armazenados em <i>eppendorfs</i>	34
Figura 14.	Microscopia.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diluição seriada padrão ISO.....	18
Tabela 2. Dados estatísticos na condição fresh 1 dia de exposição.....	29
Tabela 3. Dados estatísticos na condição fresh 7 dias de exposição.....	30
Tabela 4. Dados estatísticos na condição 7 dias 1 dia de exposição.....	31
Tabela 5. Dados estatísticos na condição 7 dias 7 dias de exposição.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 MATERIAIS OBTURADORES AVALIADOS NO PRESENTE ESTUDO	4
1.2 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS MATERIAIS OBTURADORES	10
1.3 ESTUDOS COMPARATIVOS	11
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 JUSTIFICATIVA.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 PREPARO DOS MATERIAIS.....	15
3.2 PREPARO DO MEIO CONDICIONADO	16
3.3 CITOTOXICIDADE	17
4. RESULTADOS	20
5. DISCUSSÃO.....	35
6. CONCLUSÃO.....	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Os cimentos endodônticos são utilizados como uma fina camada, de uma mistura com consistência normalmente pegajosa, que tem como função cimentar o material obturador principal sólido (cone de guta-percha) e permitir que o mesmo deslize para o interior do canal radicular. Eles podem preencher canais laterais e acessórios, recessos e istmos ao longo do canal radicular, onde o material de obturação sólido não pode alcançar. Caso o cimento endodôntico não seja capaz de cumprir com suas funções, podem ocorrer microinfiltrações, isso é, a passagem de bactérias e fluidos, para o interior do canal ocupando os espaços não preenchidos. Portanto, a escolha de um cimento endodôntico para uso clínico tem o potencial de contribuir para o sucesso a longo prazo do tratamento (Zordan-Bronzel et al., 2019).

Para Torabinejad (2010), a obturação tem como objetivo promover um selamento compacto do sistema de canais radiculares; nesse contexto, o autor vê o cimento endodôntico com maior importância que o material obturador primário (cone de gutapercha). Segundo Chybowski (2018), o selamento adequado do canal após sua limpeza e desinfecção é de extrema importância, uma vez que, de acordo com Lopes & Siqueira (2020), elimina espaços vazios, anteriormente ocupados pela polpa dentária, que podem vir a servir de nichos para a proliferação de microorganismos resistentes ao preparo do conduto (infecção persistente) ou que, em um momento futuro possam obter acesso a estes espaços (infecção secundária).

Hargreaves (2011) descreve o papel exercido pelos cimentos endodônticos no sucesso do tratamento como material de selamento do espaço entre a parede dentinária

e o material obturador. Para que tais materiais possam exercer a sua função de forma adequada, eles devem cumprir alguns pré-requisitos descritos por Lopes & Siqueira (2020), são eles: facilidade de inserção e remoção do canal radicular, bom tempo de trabalho, promover selamento tridimensional do sistema de canais radiculares, boa estabilidade dimensional em condições de uso, bom escoamento, radiopacidade, não manchar a estrutura do elemento dentário, possuir adesividade às paredes dos canais, possuir força de coesão, não ser solúvel pelos fluidos teciduais e saliva, ser reabsorvido pelos tecidos perirradiculares, apresentar impermeabilidade no interior do canal, ter atividade antimicrobiana e possuir biocompatibilidade. Segundo vários autores (Hargreaves, 2011; Zhou et al., 2015; Vouzara et al., 2018), para que possa cumprir o requisito de selamento tridimensional, os cimentos endodônticos devem preencher as irregularidades entre as paredes dentinárias e o núcleo de gutapercha, preenchendo as lacunas e irregularidades dos canais principais, laterais, acessórios, além de espaços entre os cones de guta-percha usados na técnica de compactação lateral.

No entanto, irregularidades presentes com frequência no interior dos condutos radiculares, como istmos, recessos e canais laterais, podem oferecer certo grau de dificuldade no momento da obturação. Chybowski (2018) ressalta que a incapacidade de preencher e selar estas áreas de modo eficaz pode acarretar o insucesso do tratamento endodôntico.

Além das características físicas, Vouzara et al. (2018) destaca também às características biológicas e afirma que o cimento endodôntico também deve possuir biocompatibilidade, uma vez que ao serem usados no tratamento endodôntico seus subprodutos, dentro do canal radicular, se encontram próximos aos tecidos

perirradiculares. Segundo alguns autores (Prüllage et al. 2016, Vertuan et al. 2018, Vouzara et al. 2018), caso não possuam essa qualidade eles podem causar diversas reações ao redor da raiz. Os agentes citotóxicos presentes nos materiais também podem causar respostas inflamatórias e danos aos tecidos. De acordo com os princípios escritos por Grossman (1983), a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos, pode ser caracterizada pelos seguintes parâmetros; genotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade, histocompatibilidade e efeitos imunológicos. Desse modo, os cimentos endodônticos têm o potencial de causar efeitos adversos locais nos tecidos perirradiculares ou mesmo sistêmicos, devido à liberação de seus componentes. Portanto, conhecer as qualidades e características de um cimento endodôntico é fundamental para a sua seleção e aplicação para cada caso clínico, uma vez que podem causar não só a degeneração do tecido circundante, mas também retardar o processo de reparação.

Com base em sua composição, os cimentos endodônticos, podem ser definidos como à base de óxido de zinco e eugenol, hidróxido de cálcio, ionômero de vidro, silicone, resina e silicato de cálcio (biocerâmicos). O mercado de cimentos endodônticos é extenso, devido às variadas formulações disponíveis. Dentre estes materiais, os selantes à base de óxido de zinco e eugenol têm sido amplamente utilizados por muitas décadas, embora apresentem citotoxicidade considerável in vitro, devido à liberação do eugenol. No entanto, o mesmo eugenol, responsável por causar o efeito citotóxico do material, é também responsável pelo seu efeito antimicrobiano favorável e algum efeito anestésico/anti-inflamatório em baixas dosagens. Isso denota a importância de avaliar os

materiais com base em sua composição, a fim de definir sua melhor aplicação para cada caso (Vouzara et al. 2018).

Frente à importância da biocompatibilidade e à capacidade de ser bem tolerado pelos tecidos perirradiculares, Vouzara et al. (2018) defendem que os novos cimentos endodônticos devam ser submetidos a um rigoroso teste de triagem pré-clínica, antes de serem recomendados para uso comercial, dada a importância do princípio da biocompatibilidade e ciente de que os cimentos endodônticos apresentam características citotóxicas em diferentes graus, além de, como demonstrado em estudos como o de Seo et al. (2019), o grau de citotoxicidade variar também após a reação de presa do material, diminuindo gradativamente ao longo do tempo. Portanto a importância de se observar as características dos materiais em suas diferentes etapas de presa.

1.1 MATERIAIS OBTURADORES AVALIADOS NO PRESENTE ESTUDO

Os cimentos endodônticos são compostos monoméricos que sofrem uma reação de polimerização para formar uma estrutura sólida e impermeável. Alguns materiais avaliados, como o MTA Fillapex, Bio C Sealer e Bio C Sealer ION+, requerem a presença de água para que ocorra a reação de presa e endurecimento do material. O tempo ideal para a polimerização total de cada material varia, e é normalmente informada pelo fabricante na bula do produto.

1.1.1 MTA Fillapex

O MTA Fillapex (Angelus Industria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR) é um cimento endodôntico a base de silicato de cálcio, originado da tentativa de combinar

as propriedades biológicas presentes no MTA com as propriedades físicoquímicas de um cimento endodôntico (Sliva et al. 2013; Zhou et al. 2015), esse material é composto por 2 componentes principais, são eles, uma mistura biocerâmica tipo MTA e componentes resinosos, aos quais são adicionados MTA, resina salicilato, resina natural, óxido de bismuto e sílica. De acordo com o fabricante seu tempo de trabalho é de 23 minutos, e a umidade no interior dos condutos é suficiente para iniciar a sua reação de presa. Segundo Silva et al. (2013), o MTA Fillapex apresenta uma severa citotoxicidade quando seu eluato fresco é exposto as células. Os autores ressaltam também que essa citotoxicidade não diminui ao decorrer do tempo como ocorreu também nos estudos de Bin et al. (2012) e Scelza et al. (2012). Para Silva et al. (2013), uma possível explicação para o alto grau citotóxico apresentado pelo material é a presença de componentes tóxicos, como resina salicilato, resina diluente e sílica na em sua composição.

1.1.2 Bio C Sealer

O Bio C Sealer (Brasseler, Savannah, GA, EUA), é um material composto de silicatos de cálcio, óxido de zircônio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente de dispersão. Para que sua reação de presa seja obtida, é necessária a presença de água. Segundo o fabricante, seu tempo de trabalho é de 60 minutos, e sua presa ocorre em 2 horas após sua inserção no canal. Para Zhou et al. (2015), o pH elevado, sua característica hidrofílica e difusão ativa de ions cálcio pelo material podem ser relacionados aos relatos de sua atividade antimicrobiana. Assim como o MTA, o Bio C Sealer possui silicato de cálcio em sua composição, que é um composto biocompatível e reage com água para formar uma fase de hidrato de silicato de cálcio

durante a presa do material. Ainda segundo os autores, os estudos para a implementação de silicato de cálcio na composição dos novos materiais, se fundamentam na busca de cimentos com boa biocompatibilidade, com a capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado e fornecer propriedades físicas adequadas, dentre elas, a taxa de fluxo, a capacidade de selamento, a manipulação e a reação de presa mais rápida.

1.1.3 Bio C ION +

O Bio C ION + (Angelus, Londrina, PR) é um cimento endodôntico à base de silicato de cálcio hidráulico (hCSS). Sua composição também inclui silicato de cálcio, silicato de magnésio, polietilenoglicol, óxido de zircônio, nanopartículas de dióxido de silício, sulfato de potássio e sulfato de cálcio hemi-hidratado. Esse material é apresentado em um formato pré-misturado de pronto uso. Segundo o fabricante, sua presa ocorre dentro de 4 horas, e depende do nível de umidade no interior do canal.

Os biomateriais à base de silicato de cálcio, quando sofrem a reação de dissolução e a liberação de seus principais componentes catiônicos (Ca^{2+}), em contato com os fluidos teciduais, geram um intercâmbio iônico que acarreta a formação de uma camada mineral superficial. No estudo de Sanz et al (2021), a liberação de cálcio foi maior nas amostras de Bio C ION + do que de Bio C Sealer HiFlow após 48 h de presa.

Essa diferença de liberação de íons pode afetar na capacidade de selamento clínico. Também segundo aos autores, as diferenças presentes na composição do biomaterial podem provocar interações iônicas variadas com tecidos circundantes e respostas celulares.

1.1.4 Total Fill

O Total Fill (FKG, La Chaux-de-Fonds, Suíça) é um cimento endodôntico monofásico, que se apresenta em uma seringa única pré-misturada contendo em sua formulação, silicatos de cálcio, fosfato monobásico, óxido de zircônio, óxido de tântalo e agentes espessantes (Jafari et al. 2017; Donnermeyer et al. 2018). Segundo o fabricante material é antibacteriológico durante a reação de presa, que leva 20 minutos para acontecer, devido ao seu pH alcalino.

Xuereb et al. (2014) relata que esse material precisa entrar em contato com a humidade presente no interior do canal para iniciar sua reação de presa, e compara seu tempo de presa ao MTA Fillapex, que também requer humidade para iniciar sua polimerização. Segundo o autor ambos os cimentos falharam em tomar presa quando em meio seco, e apesar do tempo relatado por seus fabricantes, quando imersos em solução fisiológica, só completaram a reação de presa total após 19 horas.

O Toral Fill também é distribuído com os seguintes nomes comerciais: EndoSequence BC Sealer (BUSA, Savannah, USA) e iRoor ST (Innovative BioCeramix, Vancouver, Canada).

1.1.5 AH Plus

O AH Plus (Dentsply, DeTrey GmbH, Konstanz, Alemanha) é considerado um cimento obturador de padrão ouro, e por isso é usado frequentemente como material de comparação em pesquisas endodônticas (Vertuan et al. 2018; Silva et al. 2020). Este cimento é feito à base de resina epóxi e apresenta excelentes propriedades

físicoquímicas, biológicas e antimicrobianas. Lopes & Siqueira (2020) afirmam que seu comportamento histológico excelente e sua capacidade seladora apical, permitem um selamento biológico pela deposição de tecido cementóide.

O AH Plus é comercializado em dois tubos, dos quais o conteúdo deve ser aplicado sobre uma superfície lisa em partes iguais e manipulados até que se alcance uma substância homogênea. O primeiro tubo contém uma pasta composta por resina epóxi bisfenol, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, pigmentos de óxido de ferro; já a pasta do segundo tubo contém dibenzildiamina, aminodiamantana, triciclodecano, diamina, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, silicone. E de acordo com o fabricante seu tempo de trabalho é de 4 horas e sua presa ocorre em 8 horas.

Segundo o estudo de Silva et al. (2013), o AH Plus apresentou leve citotoxicidade em condições frescas e após 2 semanas tornou-se não citotóxico. Os autores levantam a hipótese de que seja devido ao resultado da diminuição da lixiviação de substâncias tóxicas presente nesta formulação.

1.1.6 Sealer Plus

O Sealer Plus (MKLife, Porto Alegre, RS), assim como o AH Plus, também é um cimento endodôntico a base de resina epóxi. Tem composição similar ao AH Plus, contendo preenchedores radiopacos, cálcio, tungstato e óxido de zircônio. Entretanto a maior diferença entre esses dois materiais se encontra na presença de hidróxido de cálcio na base e catalisador do Sealer Plus.

De acordo com o fabricante, o Sealer Plus é um material de fácil manuseio, devido à sua apresentação em uma seringa de corpo duplo, que despeja ao mesmo tempo as porções necessárias para a mistura do material, e sua presa ocorre dentro de 2 a 3 horas.

Segundo Alves et al. (2020) o Sealer plus libera íons de cálcio e apresenta pH alcalino e quando comparado com o AH Plus, apresentou maior solubilidade, menor radiopacidade e um pH mais alto

1.1.7 Sealer 26

O cimento endodôntico Sealer 26 (Dentsply, Petrópolis, Brazil), segundo Lopes & Siqueira (2020), possui uma composição similar ao AH 26, que é um cimento à base de resina epóxica, tendo como diferença básica a presença de hidróxido de cálcio em sua composição, e não prata. Siqueira (2000) relata ação antimicrobiana do Sealer 26, porem quando comparado ao AH Plus, sua ação antimicrobiana é inferior.

Kuga (2014) relata que o Sealer 26 é o cimento endodôntico mais usado clinicamente no Brasil, a pesar da sua baixa radiopacidade. O autor afirma que a diferença de radiopacidade entre o cimento e o cone de gutta-percha, pode gerar interpretações erradas da imagem radiográfica levando a acreditar que o canal está mal preenchido.

Esse material se apresenta numa composição de pó e líquido que devem ser misturados manualmente. O pó é composto de trióxido de bismuto, hidróxido de cálcio, hexametileno tetramina, dióxido de titânio, e o líquido é epóxi bisfenol (Teixeira et al. 2020). Segundo o fabricante, na temperatura corporal o Sealer 26 toma presa após 12 horas, mas em temperatura ambiente (23+2°C) ela ocorre por volta de 48 a 60 horas.

1.2 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS MATERIAIS OBTURADORES

Ao serem introduzidos nos canais radiculares, a fim de preencher todas as irregularidades, os cimentos endodônticos entram em contato com os tecidos perirradiculares. (Zhou et al. 2015; e Vouzara et al. 2018), portanto, dão destaque ao princípio da biocompatibilidade em seus estudos, afirmando que essa característica é de extrema importância, uma vez que, ao final do tratamento, o resultado pode ser influenciado pela resposta dos tecidos aos cimentos. Segundo Seo et al. (2019) os cimentos endodônticos devem ser biocompatíveis e não irritantes aos tecidos perirradiculares. Quando apresentam boa biocompatibilidade, esses materiais se mostram benéficos para auxiliar ou estimular o reparo de tecidos lesados.

Lopes & Siqueira (2020) afirmam que qualquer material que tenha como destino o uso biológico não deve apresentar citotoxicidade. A guta-percha é bem tolerada pelos tecidos circundantes, entretanto a maioria dos cimentos endodônticos apresentam níveis variados de citotoxicidade antes da presa, podendo perder essa propriedade após seu endurecimento. Para os autores, a biocompatibilidade de um cimento depende de seus componentes, seu tempo de presa e sua solubilidade.

De acordo com Seo et al. (2019), o AH Plus é um material que apesar das características favoráveis, como a boa capacidade de penetração nas paredes dentinárias e baixa microinfiltração, é citotóxico quando recém misturado. Os autores relatam que após a reação de presa a citotoxicidade diminui gradativamente. Entretanto, quando em contato com os tecidos periapicais por longos períodos, pode acarretar uma reação inflamatória levando a um retardo no processo de cicatrização. Dessa forma, com

o objetivo de minimizar o problema da citotoxicidade, foram criados os selantes à base de Silicato de Cálcio. Entretanto estudos relataram estímulos lesivos provocados por esses materiais, em maior ou menor grau (Silva et al. 2013; Komabayashi et al. 2020; Zhou et al. 2015).

1.3 ESTUDOS COMPARATIVOS

O estudo de Silva et al. (2013), realizou o teste de citotoxicidade de acordo com os padrões da ISO 10993-5, para comparar os cimentos endodônticos AH Plus e MTA Fillapex. Segundo os resultados obtidos pelo ensaio de metil-tiazolil-tetrazólio (MTT), o AH Plus foi moderadamente citotóxico em condições frescas, moderadamente citotóxico após 1 semana, e não apresentou citotoxicidade após 2 semanas. Por sua vez o MTA Fillapex permaneceu intensamente citotóxico no decorrer de todo período experimental. Portanto, com esse estudo foi possível notar que o MTA Fillapex apresentou maior grau de citotoxicidade quando comparado ao AH Plus em todo período testado.

Komabayashi et al. (2020), por sua vez, avaliou citotoxicidade do MTA em tecido subcutâneo de ratos, in vivo. O estudo constatou que o material é citotóxico, quando seções histológicas de tecido pulpar foram examinadas por microscopia de luz, nos períodos de duas e sete semanas. No período de 7 dias, os tecidos apresentavam apenas inflamação moderada, e no período de 30 dias, apresentavam inflamação leve.

Com base nas características histológicas observadas nos tecidos, os autores sugeriram que o MTA também é capaz de induz a biomineralização.

O estudo de Zhou et al. (2015) comparou o MTA Fillapex e o Bio C Sealer quanto à sua citotoxicidade, usando como controle o AH Plus. Para o estudo, foram usados fibroblastos gengivais em cultura com várias concentrações de extratos derivados do AH Plus, MTA Fillapex e Bio C Sealer. Foi possível perceber que em altas concentrações de extrato, o AH Plus fresco possuía uma forte toxicidade, entretanto, em uma diluição de extrato de 1:128, seu efeito citotóxico reduziu em comparação com o controle. Nesse estudo o MTA Fillapex apresentou citotoxicidade dependente da concentração, semelhante ao AH Plus, entretanto sua citotoxicidade foi reduzida para níveis de controle quando o extrato foi diluído em uma concentração de 1:8. O Bio C Sealer por sua vez, apresentou uma toxicidade leve em altas concentrações de extrato, e não demonstrou diferença significativa quanto a viabilidade celular nas várias concentrações do extrato. Segundo os autores, as células incubadas com o extrato do Bio C Sealer apresentaram maior viabilidade em todas as concentrações.

Sanz (2020) comparou o desempenho do Bio C ION+ com o Bio C Sealer HiFlow, tendo o AH Plus como material de referência. De acordo com os autores, o Bio C ION+ e o Bio C Sealer HiFlow apresentaram um alto teor de cálcio e liberação de iônica, assim como outros cimentos a base de silicato de cálcio, como BioRoot, MTA Fillapex, Bio-C Sealer, e TotalFill. Em seu estudo, o Bio C ION+ apresentou uma maior liberação de íons que o Bio C Sealer HiFlow após 48h de presa. Essa diferença na liberação de íons pode influenciar na capacidade de selamento do material. Quanto à viabilidade celular, o estudo constatou similaridade entre os resultados obtidos do Bio C ION+ e do Bio C Sealer HiFlow quando comparados com o grupo controle após um período de 48h de incubação. Os autores ressaltam o contraste entre evidências de estudos anteriores,

onde foi relatado menor viabilidade celular, quando em contato com os eluatos de Bio C Sealer HiFlow, em concentrações mais altas (diluições 1:4 versus 1:8; 1:16 versus 1:20), característica essa, que reduziu significativamente de 24 para 72h de incubação.

Silva et al. (2020) avaliou a citotoxicidade do Sealer Plus, tendo também o AH Plus como padrão comparativo, utilizando fibroblastos gengivais. Segundo os resultados obtidos a partir do ensaio de citotoxicidade (MTT), o AH Plus e Sealer Plus apresentaram efeitos citotóxicos após 24 horas e 1 semana de manipulação, e após 2 semanas ambos os cimentos se tornaram não citotóxicos.

O estudo de Komabayashi et al. (2020) constatou que os selantes de resina como um todo, possuem biocompatibilidade limitada quando não estão em seu estado endurecido. Nos ensaios de genotoxicidade em células de mamíferos, os selantes a base de resina epóxi não endurecidos apresentaram mutação, os autores atribuíram isso ao monômero residual e ao formaldeído. Quando tomaram presa, os cimentos mostraram resultados ambíguos quanto a genotoxicidade, e após 24h nenhuma atividade genotóxica foi constatada. Deve se ressaltar que o AH Plus possui uma composição modificada de forma a não liberar formaldeído. Komabayashi et al. (2020) também relata ter observado altos níveis de inflamação em tecidos periapicais e subcutâneos após o uso de cimentos à base de resina epóxi.

Por sua vez o estudo de Kitagawa et al. (2021) que avaliou as características bactericidas de cimentos endodônticos capazes de liberar partículas poliméricas com efeito antibacteriano de longo prazo, relatou que apesar de suas partículas causarem

100% de morte celular bacteriana, sua citotoxicidade para os tecidos não era significativa. Indicando que as partículas liberadas pelos materiais e suas qualidades, têm importância relevante sobre seu desempenho no tratamento endodôntico.

Até o momento, não foram encontrados na literatura estudos comparativos abrangendo uma grande quantidade de cimentos com diferentes composições no mesmo experimento.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo avaliar o grau de citotoxicidade *in vitro*, de sete cimentos endodônticos com diferentes composições e fabricantes antes e depois do endurecimento, utilizando células SaOS2, a fim de determinar quais apresentam maior biocompatibilidade.

2.1 JUSTIFICATIVA

Os cimentos endodônticos, quando não exercem um grau aceitável de biocompatibilidade com os tecidos, podem acarretar efeitos adversos locais ou sistêmicos, devido à liberação de seus componentes químicos. Portanto, é imprescindível conhecer as qualidades e características de um cimento endodôntico para a sua seleção e uso, de acordo com cada caso clínico, uma vez que podem causar não só danos ao tecido circundante, mas também retardar o processo de cicatrização. A maioria das comparações na literatura não abrange vários materiais nas mesmas condições

experimentais e não abordam os materiais em seu estado recém preparado (*fresh*). Durante a reação de presa dos materiais, estes apresentam diferentes graus de citotoxicidade. Quando o cimento endodôntico é inserido no interior do canal, ele é levado ainda em sua fase *fresh*, apresentando um grau de citotoxicidade diferente do que apresentara após endurecido. O presente estudo visa contribuir para a literatura, avaliando os materiais tanto em sua fase recém preparada, quanto após endurecida. Além disso, alguns materiais mais recentes ainda carecem de mais avaliações quanto à sua citotoxicidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Cada experimento foi realizado em triplicata, com alíquotas de células e corpos de prova de cimentos independentes.

3.1 PREPARO DOS MATERIAIS

Os seguintes cimentos foram utilizados neste experimento:

- a) AH Plus
- b) Sealer Plus
- c) Sealer 26
- d) Total Fill
- e) MTA Fillapex
- f) Bio C Sealer

g) Bio C Sealer ION+

Os cimentos foram preparados segundo as orientações dos fabricantes e colocados em moldes de silicone estéril para formar discos com 1 cm de diâmetro 1 mm de altura segundo ISO 10993. O excesso de material foi removido da superfície do molde com uma espátula 24 para que os discos ficassem uniformes.

3.2 PREPARO DO MEIO CONDICIONADO

Para preparação do meio condicionado, as pastilhas de material recém preparado (*fresh*), em triplicada, foram removidas do molde imediatamente após o preparo e colocadas em uma placa de cultura com 24 poços, onde foi imediatamente adicionado 1ml de meio *Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) high glicose* (4,5 g/L) suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina e incubadas na estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. As pastilhas de material (em triplicada) que tomarão presa por sete dias foram armazenadas dentro dos próprios moldes em uma cama de gaze umedecida com água destilada, ambas estéreis, e colocadas na estufa a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. O período de 7 dias de presa foi determinado como o tempo necessário para que todos os materiais atingissem o estado sólido nas mesmas condições. Após este tempo, as pastilhas foram colocadas em uma placa de cultura com 24 poços em presença de 1ml de meio DMEM high glicose suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (PS). Cada pastilha condicionou o meio durante 24h ou 7 dias, respectivamente. Os meios condicionados foram armazenados em tubo *ependorfs* e congelados a -20°C.

3.3 CITOTOXICIDADE

3.3.1 Plaqueamento para ensaio de citotoxicidade

Para realização do ensaio de citotoxicidade, as células SaOS-2 (ATCC-HBT-85) foram plaqueadas em uma densidade de 6×10^4 cel/cm² em meio DMEM *high glicose* com 15% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/streptomicina (PS). A incubação da placa foi realizada por 24h na atmosfera umidificada a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Para garantir a reprodutibilidade experimental, uma triplicata de poço foi plaqueada para cada condição a ser testada segundo indicado no esquema da figura 1, usando uma placa de 96 poços para cada material testado. As placas foram incubadas na estufa por 24 horas a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂ para que as células pudessem aderir à placa antes de realizar a exposição aos materiais.

3.3.2 Exposição ao Meio

Com objetivo de realizar a exposição celular ao meio condicionado, este foi descongelado e suplementado com 15 % de soro fetal bovino, como indicado no site da ATCC para cultivo da célula SAOS-2-HTB-85. As SaOS-2-HTB-85 segundo a ATCC, são células derivadas de osteosarcoma, que apresentam características semelhantes às dos odontoblastos humanos, e portanto podem ser usadas para fazer um link com as células presentes nos tecidos perirradiculares. Após, foram preparados para cada condição 350 µl em diluições seriadas, seguindo os padrões preconizados pela ISO 10993, como mostrado na tabela abaixo (tabela 1). Em cada poço foi adicionado 50µl de meio condicionado.

Tabela 1 – Diluição seriada padrão ISO

Diluição	EXTRATO	MEIO (DMEM 15% SFB, 1% PS)
Puro (350 ul)	350 µl	-
1:2 (300 ul)	150 µl do puro	150 µl
1:4 (300 ul)	150 µl do 1:2	150 µl
1:8 (300 ul)	150 µl do 1:4	150 µl
1:32 (300 ul)	75 µl do 1:8	150 + 75 µl
1:128 (300 ul)	75 µl do 1:32	150 + 75 µl

Fonte – ISO10993:2018

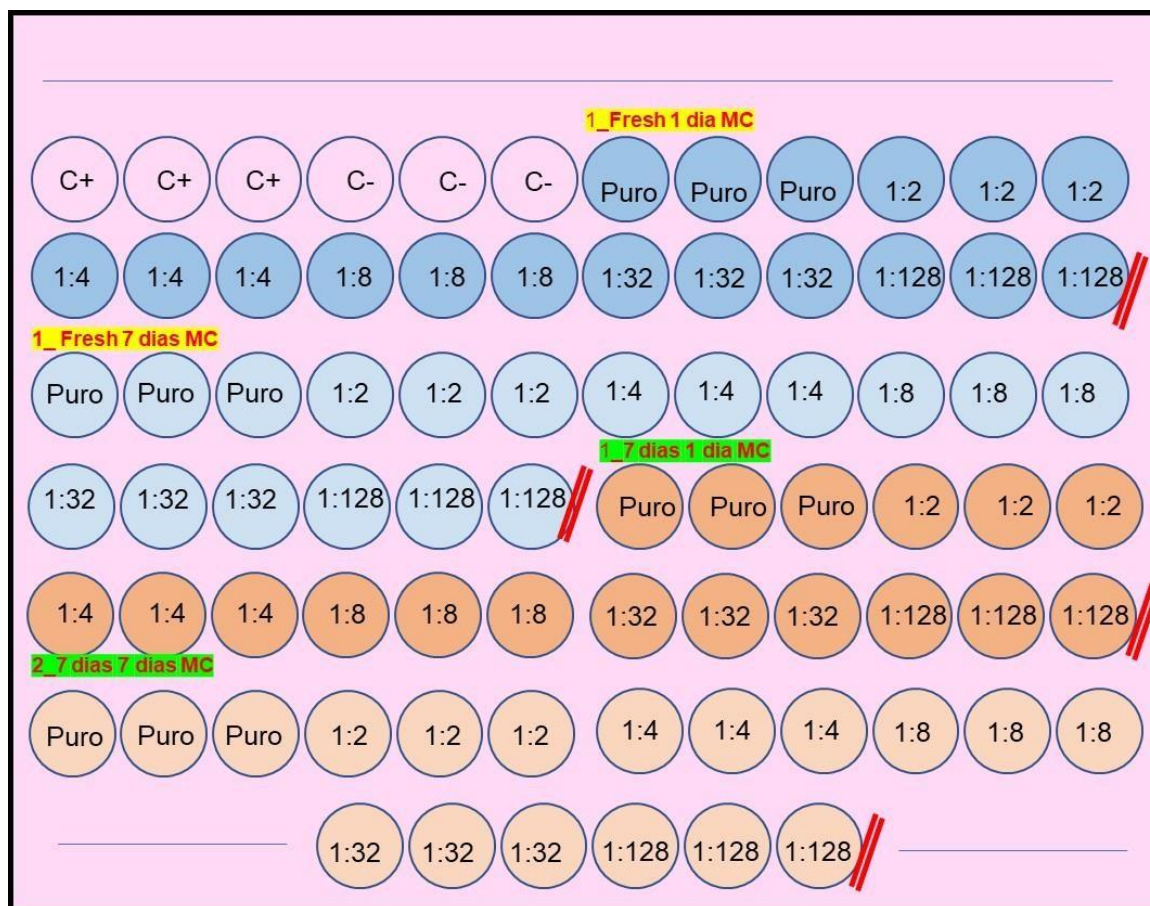


Figura 1- Esquema da configuração das placas de cultura. C+ (controle de morte) onde as células SaOS2 foram expostas a um detergente, com o objetivo de provocar a morte celular. C- (controle de vida) onde as células SaOS-2 não foram expostas ao meio condicionado. Puro, condição onde as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado puro, não diluído. 1:2, 1:4, 1:32, 1:128, são diluições feitas do meio condicionado, as quais as células SaOS-2 foram postas em contato. 1_Fresh 1 dia MC indica que o cimento que condicionou o meio estava em sua fase recém preparada e condicionou o meio durante 24h. 1_Fresh 7 dias MC indica que o cimento em sua fase recém preparada condicionou o meio por um período de 7 dias. 1_7dias 1 dia MC indica que o cimento após presa de 7 dias condicionou o meio por 24h. 2_7 dias 7 dias MC indica que o cimento após tomada de presa de 7 dias condicionou o meio por 7 dias.

3.3.3 Teste de citotoxicidade - MTT

A fim de avaliar a citotoxicidade, foi realizado o teste de metil-tiazolil-tetrazólio (MTT). Este teste se baseia na redução operada pela atividade metabólica das

mitocôndrias das células vivas, do sal de tetrazolio, em cristais de formazan. Após a redução, o sal que possui coloração amarela é transformado em cristais de coloração roxa. Tais cristais são dissolvidos em um solvente orgânico, o dimetilsulfóxido (DMSO), capaz de dissolver os cristais de formazan, para que as placas possam ser lidas no espectrofotômetro.

O espectrofotômetro realiza duas medições em diferentes comprimentos de onda, a primeira em 570 nm, onde se encontra o ponto de maior absorção da cor roxa e outra em 690 nm, onde nenhuma cor é absorvida (branco). A diferença entre esses valores é equivalente ao valor real de absorção da cor roxa. Isso se deve a possível interferência causada pelo material das placas (plástico) que pode absorver, mesmo de forma mínima, a luz, causando um pequeno desvio ao valor real medido a 570nm.

Para realizar o experimento, após a exposição das células ao material durante 24h, uma solução de 0,5 mg/ml de MTT foi colocada em contato com a célula e incubada por 4h a 37°C, 5% de CO₂. Em seguida, o MTT é removido e 50 µl de DMSO foram adicionados a cada poço para realizar a dissolução dos cristais de formazan. Para evitar possível interferência na absorbância devida a resquícios de material presente no poço, o DMSO foi transferido para placas novas e limpas. As placas foram inseridas no espectrofotômetro e foi realizada a leitura da absorbância em 570 nm e em 690 nm. Quanto maior o valor da absorbância, mais células vivas estarão presentes.

4. RESULTADOS

Para avaliar a citotoxicidade dos cimentos antes e depois da presa, foi realizado um ensaio de MTT após a exposição das células ao meio condicionado pelos diferentes

cimentos endodônticos (recém preparados [*fresh*] ou endurecidos durante 7 dias), coletado após 24h e, após da substituição do meio com meio fresco, por mais 7 dias, puro ou preparado em diluições seriadas, segundo descrito em Materiais e Métodos.

O Bio C Sealer induziu toxicidade celular apenas na condição de *fresh* puro com um dia de condicionamento do meio (Figura 2), enquanto o O Bio C Ion+ induziu citotoxicidade quando em sua condição *fresh* puro e na diluição 1:2 (Figura 3). Para ambos os cimentos as demais condições não apresentaram toxicidade (Figura 2 e 3).

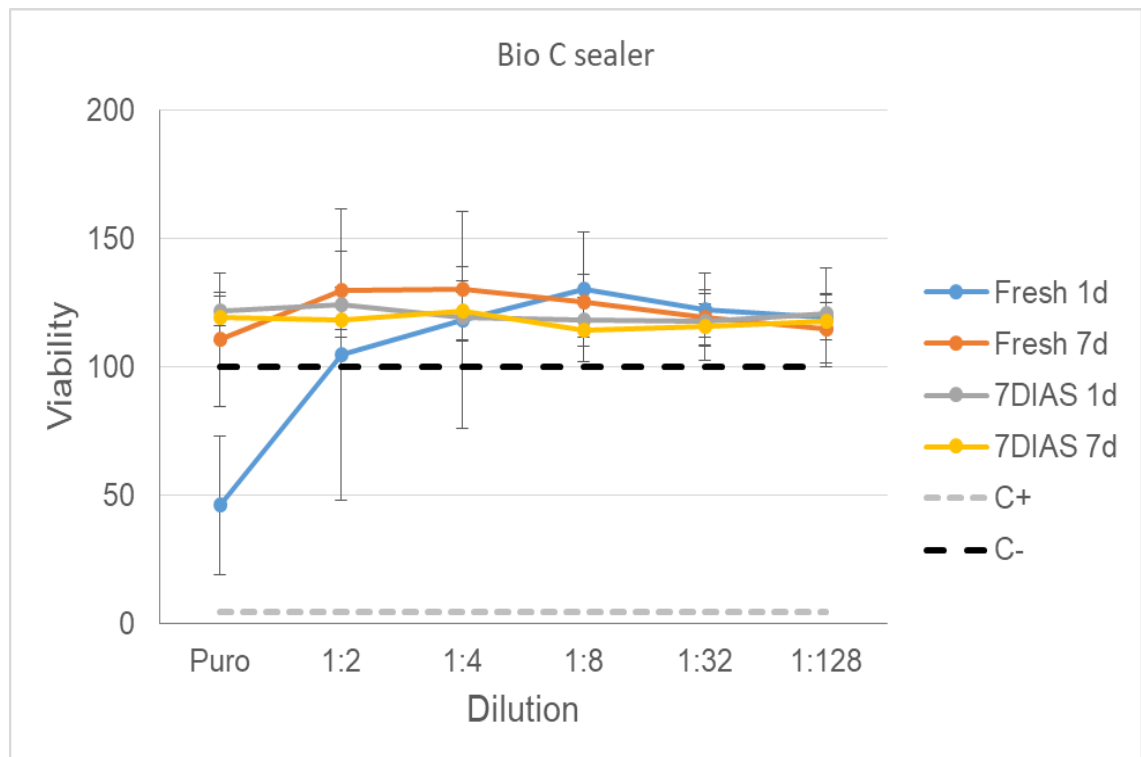


Figura 2: Gráfico de citotoxicidade relacionado ao cimento Bio C Sealer. A imagem apresenta os resultados obtidos no ensaio de MTT. C+ (controle de morte) – condição onde as células SaOS-2 foram expostas ao detergente. C- (controle de vida) – Condição onde as células SaOS-2 não foram expostas ao meio condicionado. Fresh 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 1 dia pelo cimento em sua fase recém preparada. Fresh 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 7 dias pelo cimento em sua fase recém preparada. 7DIAS 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 1 dia pelo cimento em sua fase após a presa de 7 dias. 7DIAS 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 7 dias pelo cimento em sua fase após a tomada de presa de 7 dia.

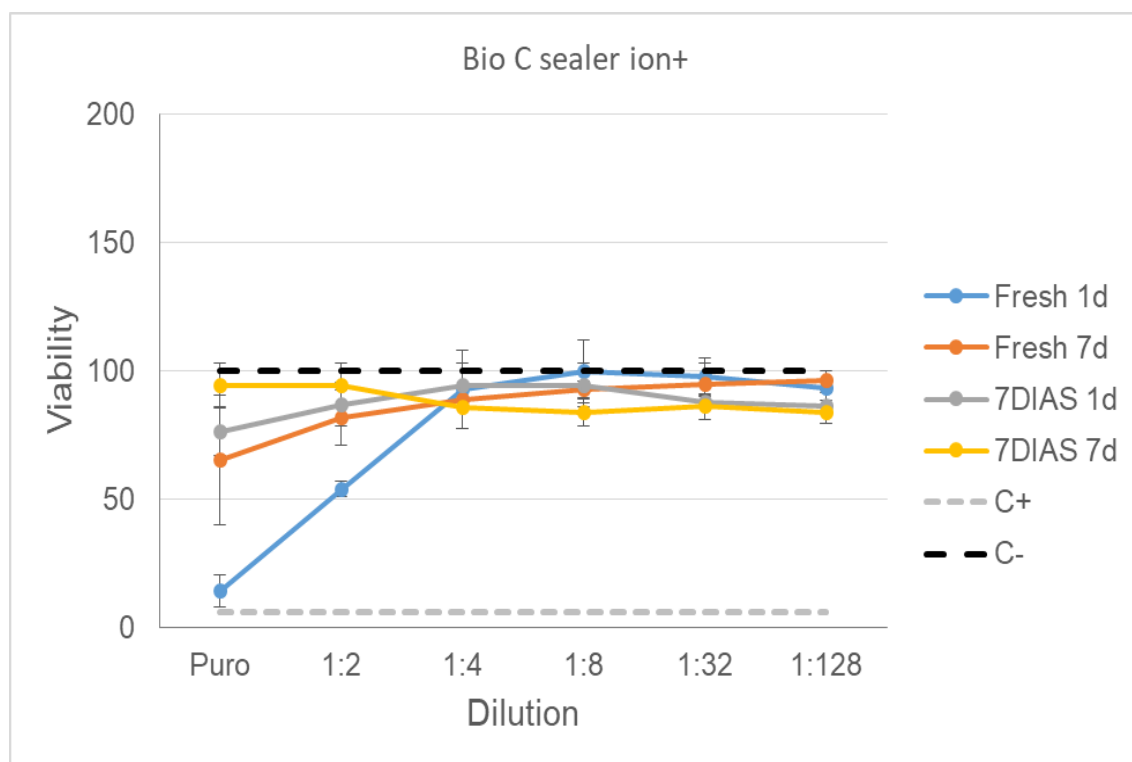


Figura 3: Gráfico de citotoxicidade relacionado ao cimento Bio C Sealer Ion+. A imagem apresenta os resultados obtidos no ensaio de MTT. C+ (controle de morte) – condição onde as células SaOS-2 foram expostas ao detergente. C- (controle de vida) – Condição onde as células SaOS-2 não foram expostas ao meio condicionado. Fresh 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 1 dia pelo cimento em sua fase recém preparada. Fresh 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 7 dias pelo cimento em sua fase recém preparada. 7DIAS 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 1 dia pelo cimento em sua fase após a presa de 7 dias. 7DIAS 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 7 dias pelo cimento em sua fase após a tomada de presa de 7 dia.

As células expostas ao meio condicionado pelo Total Fill apresentaram uma baixa da vitalidade celular estatisticamente significativa após a exposição ao meio condicionado em sua forma *fresh* durante 24h, puro e na diluição de 1:2 (Figura 4).

O AH Plus em sua forma *fresh*, após 24h de exposição ao meio condicionado, induziu mortalidade celular estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em sua condição pura e nas diluições 1:2, 1:4, 1:8. Nesse estudo os dados foram submetidos ao teste t, onde o valor de p considerado foi menor que 0,05. Nenhuma toxicidade foi encontrada a partir da

concentração de 1:32 e após a exposição do meio condicionado *fresh* condicionado por 7 dias e ao meio condicionado pelo cimento endurecido por 24h ou 7 dias (Figura 5).

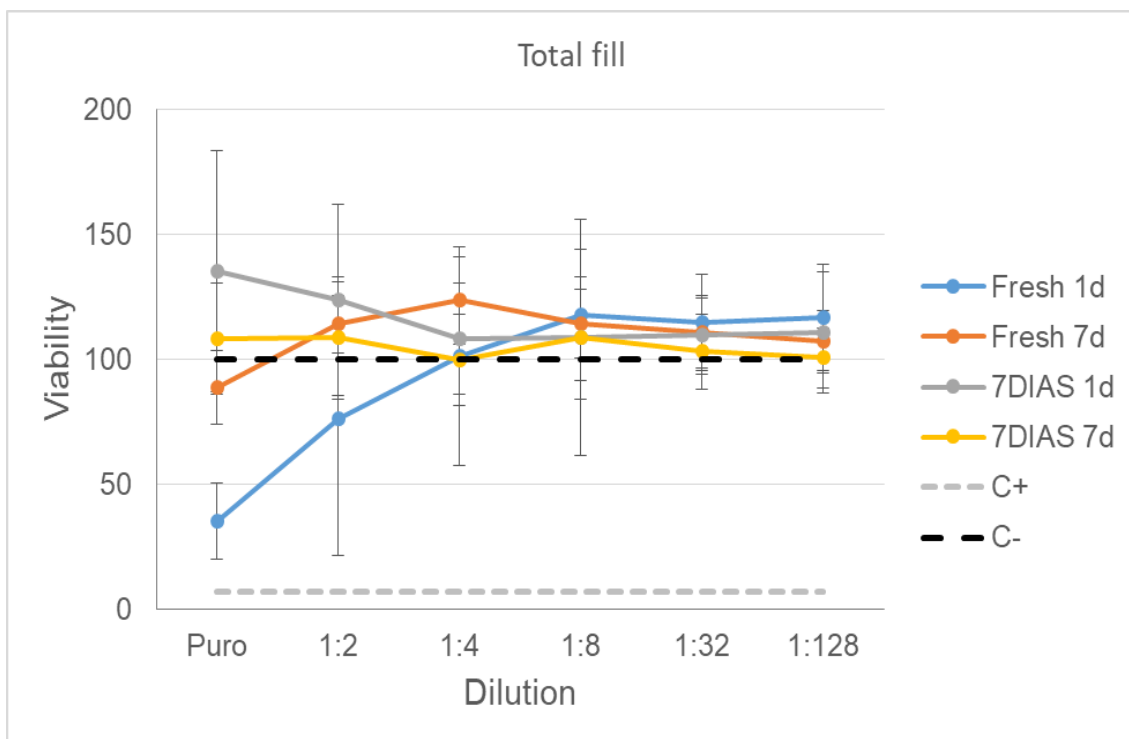


Figura 4: Gráfico de citotoxicidade relacionado ao cimento Total Fill. A imagem apresenta os resultados obtidos no ensaio de MTT. C+ (controle de morte) – condição onde as células SaOS-2 foram expostas ao detergente. C- (controle de vida) – Condição onde as células SaOS-2 não foram expostas ao meio condicionado. Fresh 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 1 dia pelo cimento em sua fase recém preparada. Fresh 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 7 dias pelo cimento em sua fase recém preparada. 7DIAS 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 1 dia pelo cimento em sua fase após a presa de 7 dias. 7DIAS 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 7 dias pelo cimento em sua fase após a tomada de presa de 7 dia.

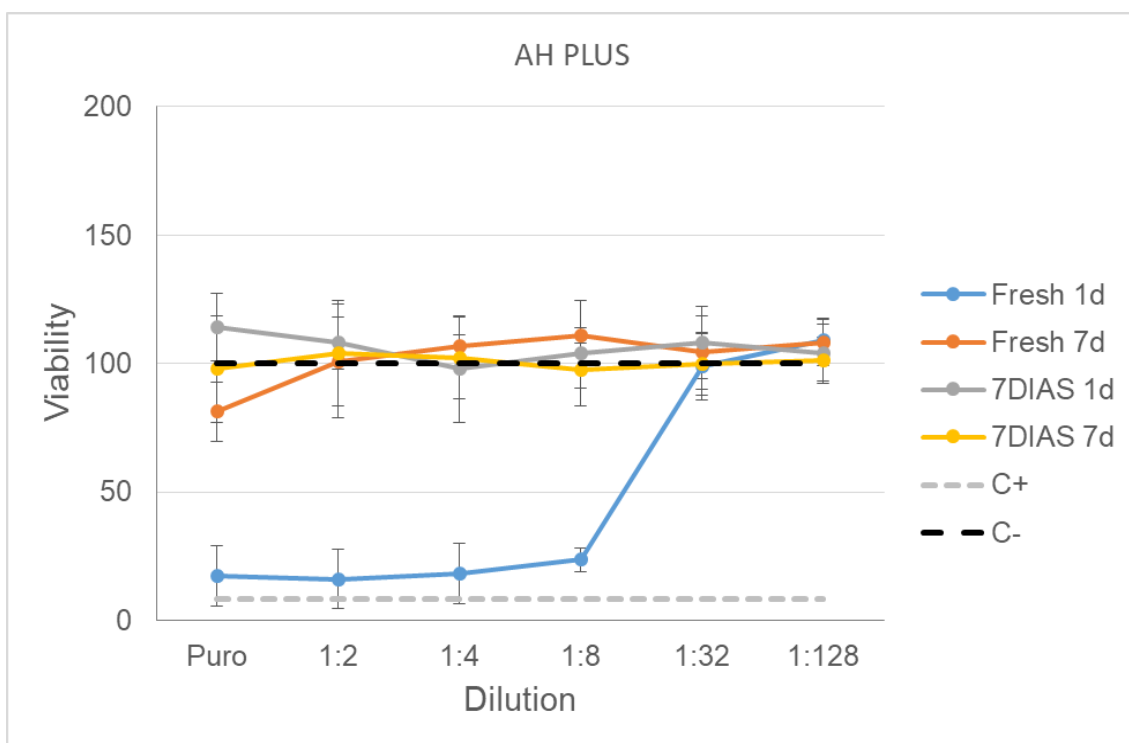


Figura 5: Gráfico de citotoxicidade relacionado ao cimento AH Plus. A imagem apresenta os resultados obtidos no ensaio de MTT. C+ (controle de morte) – condição onde as células SaOS-2 foram expostas ao detergente. C- (controle de vida) – Condição onde as células SaOS-2 não foram expostas ao meio condicionado. Fresh 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 1 dia pelo cimento em sua fase recém preparada. Fresh 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 7 dias pelo cimento em sua fase recém preparada. 7DIAS 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 1 dia pelo cimento em sua fase após a presa de 7 dias. 7DIAS 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 7 dias pelo cimento em sua fase após a tomada de presa de 7 dia.

O Sealer Plus causou diminuição da vitalidade celular estatisticamente significativa na condição *fresh* e endurecido após exposição ao meio condicionado durante 24h (Figura 6, linha azul e linha cinza), que reduziu de forma diretamente proporcional com o aumento das diluições. Após exposição das células ao meio condicionado por 1 dia, o material também apresentou maior citotoxicidade comparada com o condicionamento de 7 dias (Figura 6). As diluições de 1:32 e 1:128 não apresentam citotoxicidade significativa. No estudo para um dado ser considerado biologicamente significativo a diferença com o

controle de vida (C+) deve ser maior que 20% e para ser considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$. A exposição do meio condicionado com cimento durante 7 dias, tanto *fresh* quanto endurecido só apresentou uma toxicidade significativa para células na condição de puro (Figura 6, linha amarela e laranja).

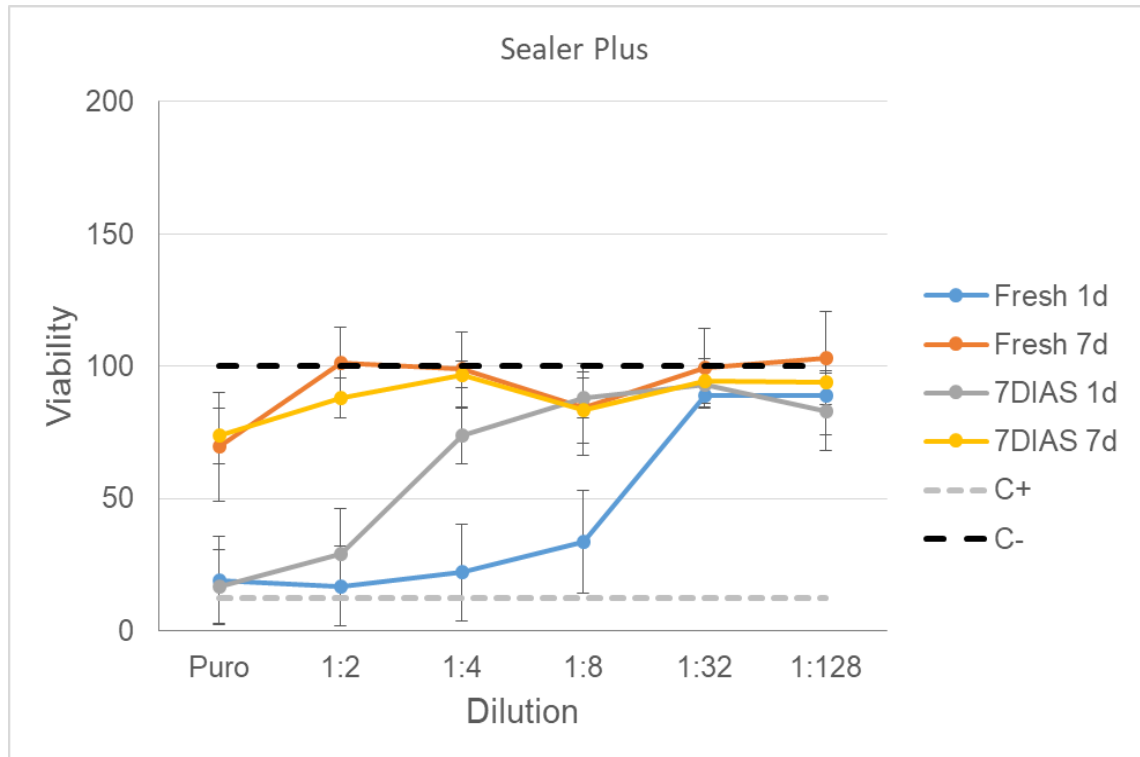


Figura 6: Gráfico de citotoxicidade relacionado ao cimento Sealer Plus. A imagem apresenta os resultados obtidos no ensaio de MTT. C+ (controle de morte) – condição onde as células SaOS-2 foram expostas ao detergente. C- (controle de vida) – Condição onde as células SaOS-2 não foram expostas ao meio condicionado. Fresh 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 1 dia pelo cimento em sua fase recém preparada. Fresh 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 7 dias pelo cimento em sua fase recém preparada. 7DIAS 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 1 dia pelo cimento em sua fase após a presa de 7 dias. 7DIAS 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 7 dias pelo cimento em sua fase após a tomada de presa de 7 dia.

A exposição ao meio condicionado durante 1 e 7 dias pelo cimento Sealer 26 em sua forma *fresh* apresentou um aumento da citotoxicidade estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na diluição 1:2, 1:4 e 1:8 (Figura 7, linha azul e laranja). Nas diluições 1:32 e

1:128 o cimento Sealer 26 foi tóxico apenas após o condicionamento de 1 dia enquanto não apresentou diferença na viabilidade celular após condicionamento de 7 dias.

Após o condicionamento de 1 dia com cimento endurecido puro e em 1:2, foi possível observar toxicidade celular que não aconteceu após a exposição ao meio condicionado 7 dias pelo cimento endurecido. Além disso, nas diluições 1:32 e 1:128 o meio condicionado 7 dias pelo cimento endurecido induziu um aumento da absorbância quando comparado ao controle negativo. Entretanto, não é possível afirmar que o material induziu a proliferação celular com base no estudo de MTT, uma vez que o princípio do ensaio não permite discriminar se o aumento de absorbância corresponde a um aumento do número de células, da respiração celular ou apenas a uma interferência do tipo de material.

O MTA Fillapex em todas as suas formas testadas apresentou na exposição das células ao meio condicionado pelo cimento puro, uma toxicidade marcante e estatisticamente significativa ($p < 0,05$), que diminuiu de forma diretamente proporcional conforme aumentaram as diluições, até não apresentar toxicidade nas diluições 1:32 e 1:128 (Figura 8).

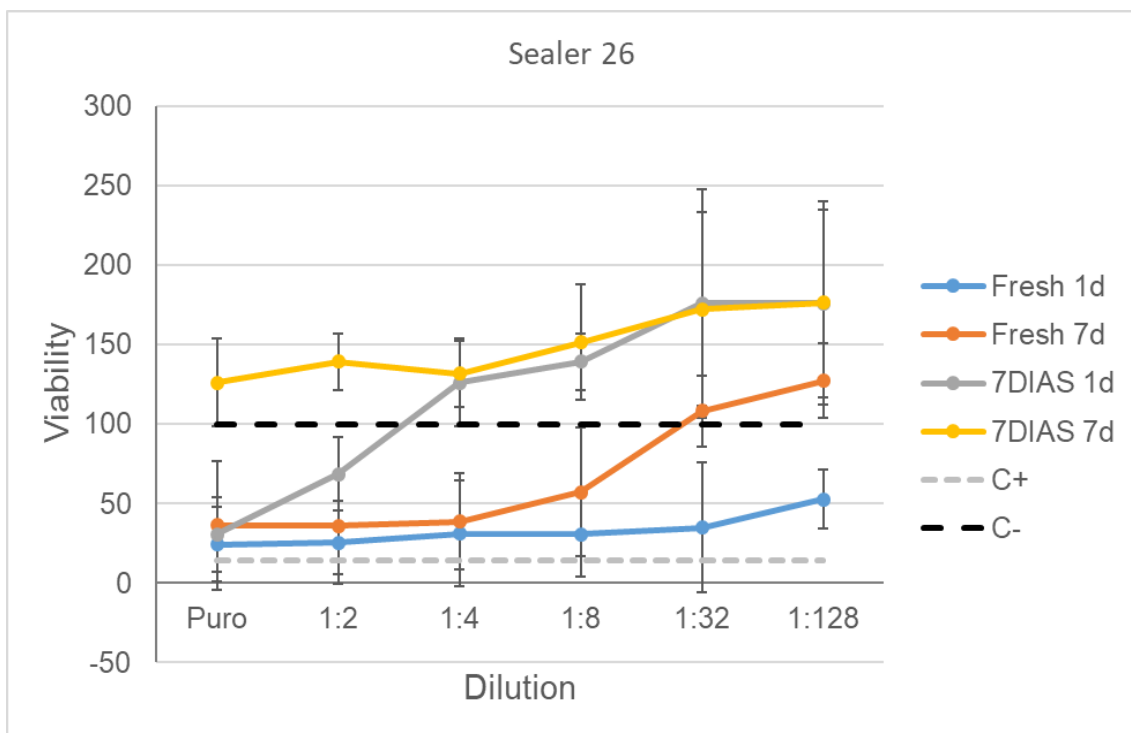


Figura 7: Gráfico de citotoxicidade relacionado ao cimento Sealer 26. A imagem apresenta os resultados obtidos no ensaio de MTT. C+ (controle de morte) – condição onde as células SaOS-2 foram expostas ao detergente. C- (controle de vida) – Condição onde as células SaOS-2 não foram expostas ao meio condicionado. Fresh 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 1 dia pelo cimento em sua fase recém preparada. Fresh 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 7 dias pelo cimento em sua fase recém preparada. 7DIAS 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 1 dia pelo cimento em sua fase após a presa de 7 dias. 7DIAS 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 7 dias pelo cimento em sua fase após a tomada de presa de 7 dia.

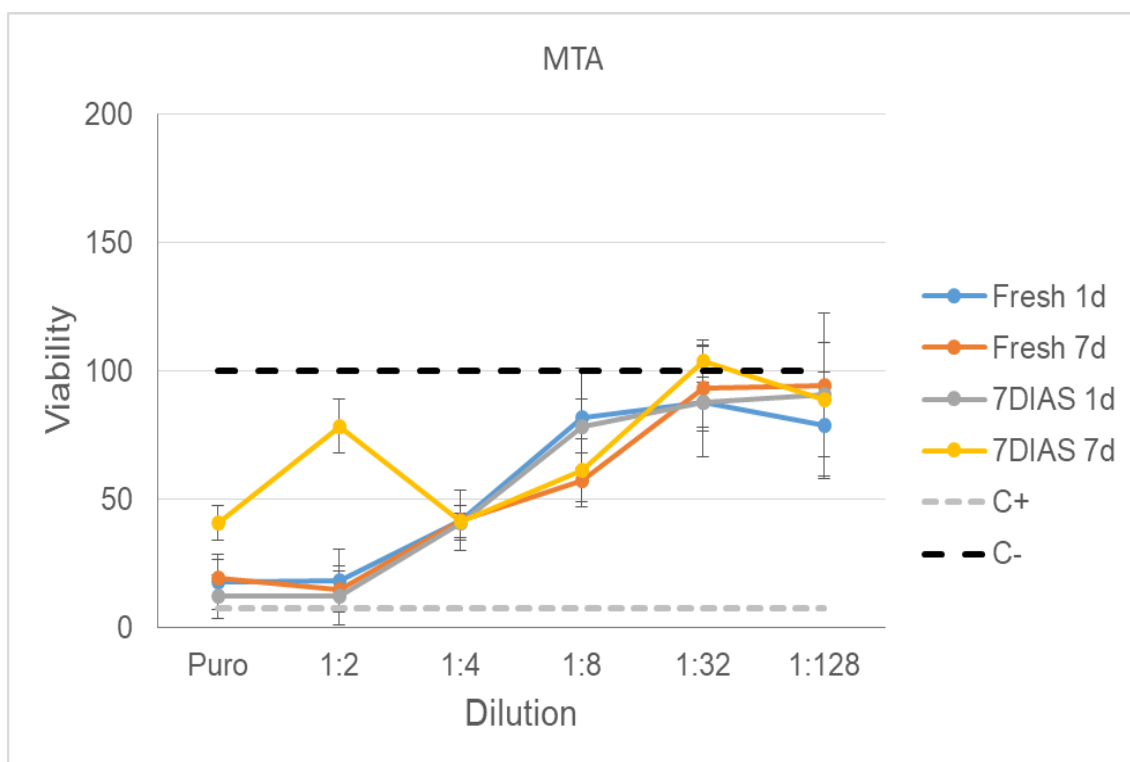


Figura 8: Gráfico de citotoxicidade relacionado ao cimento MTA. A imagem apresenta os resultados obtidos no ensaio de MTT. C+ (controle de morte) – condição onde as células SaOS-2 foram expostas ao detergente. C- (controle de vida) – Condição onde as células SaOS-2 não foram expostas ao meio condicionado. Fresh 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 1 dia pelo cimento em sua fase recém preparada. Fresh 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por 7 dias pelo cimento em sua fase recém preparada. 7DIAS 1d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 1 dia pelo cimento em sua fase após a presa de 7 dias. 7DIAS 7d – Condição em que as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado 7 dias pelo cimento em sua fase após a tomada de presa de 7 dia.

Para avaliar a significância das diferenças obtidas no ensaio de MTT, os dados foram submetidos ao teste *t* comparando cada condição com o controle (células sem exposição ao meio condicionado pelos cimentos). Para um dado ser considerado biologicamente significativo nesse estudo, é preciso apresentar uma diferença com o grupo controle maior que 20% e um *p value* < 0.05.

Os dados estatísticos obtidos na comparação de cada condição com o controle foram resumidos nas tabelas de 1 a 4, onde em destaque (amarelo) estão as diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 2: Dados estatísticos na condição *fresh* 1 dia de exposição. A tabela apresenta os resultados do teste T, onde cada condição foi comparada com o controle negativo (controle de vida). Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) estão marcadas com asterisco.

Fresh 1d							
	Bio C sealer	Bio C sealer ion+	Sealer Plus	Total fill	AH plus	MTA	Sealer 26
PURO	0,02*	0,00001*	0,001*	0,01*	0,0002*	0,0001*	0,005*
1:2	0,8	0,00001*	0,0006*	0,4	0,0002*	0,0001*	0,007*
1:4	0,4	0,4	0,001*	0,9	0,0002*	0,0001*	0,02*
1:8	0,07	0,9	0,004*	0,3	0,000008*	0,06	0,01*
1:32	0,055	0,6	0,01*	0,2	0,8	0,8	0,0503
1:128	0,1	0,003	0,2	0,2	0,1	0,7	0,01*

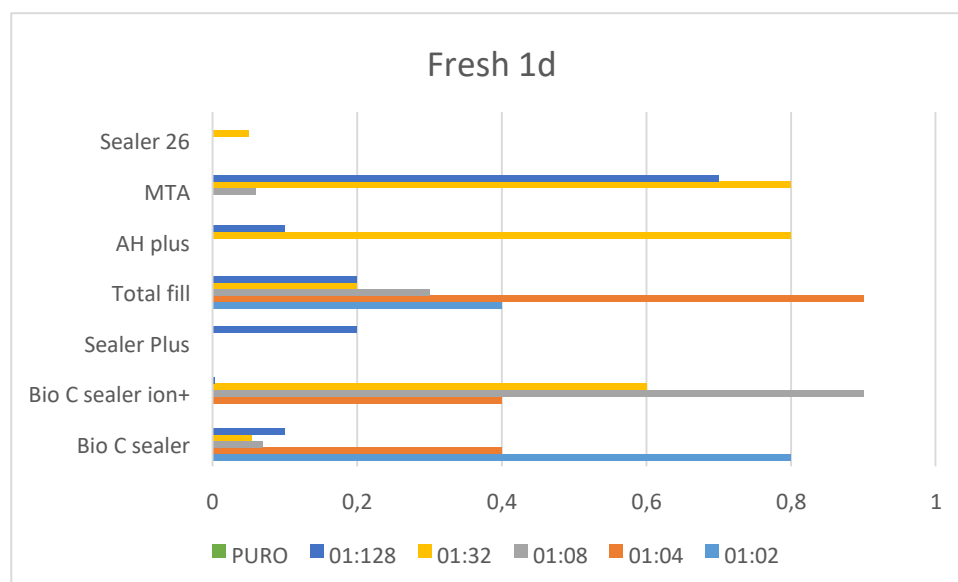


Figura 9: Representação em gráfico da tabela 2

Tabela 3: Dados estatísticos na condição *fresh* 7 dias de exposição. A tabela apresenta os resultados do teste T, onde cada condição foi comparada com o controle negativo (controle de vida). Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) estão marcadas com asterisco.

Fresh 7d							
	Bio C sealer	Bio C sealer ion+	Sealer Plus	Total fill	AH plus	MTA	Sealer 26
PURO	0,5	0,07	0,06	0,2	0,04*	0,00006*	0,052
1:2	0,02*	0,04*	0,8	0,1	0,9	0,00003*	0,02*
1:4	0,003*	0,002*	0,8	0,08	0,04*	0,0007*	0,9
1:8	0,01*	0,02*	0,1	0,1	0,003*	0,0009*	0,1
1:32	0,03*	0,3	0,9	0,2	0,6	0,9	0,5
1:128	0,1	0,1	0,7	0,3	0,1	0,8	0,1

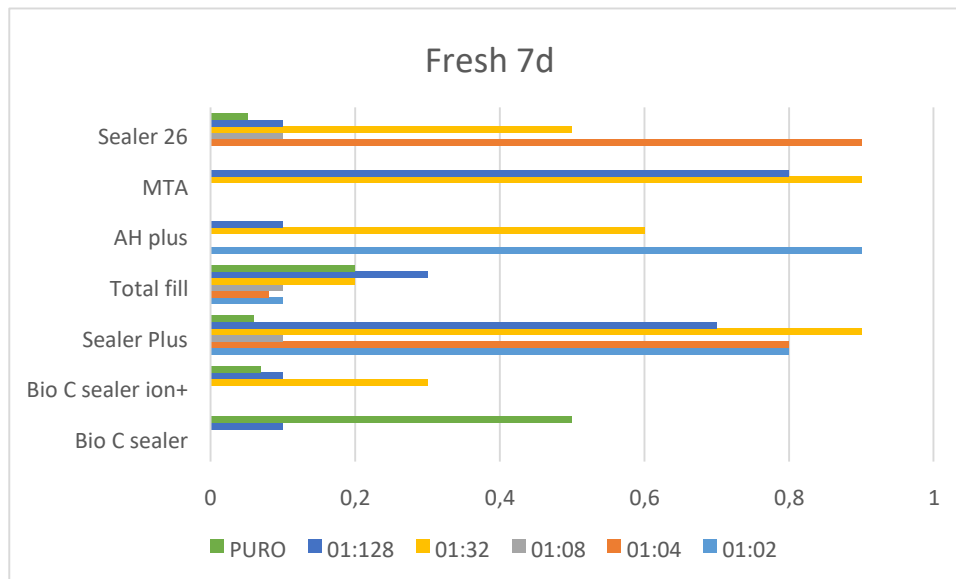


Figura 10: Representação em gráfico da tabela 3.

Tabela 4: Dados estatísticos na condição 7dias de presa 1 dia de exposição. A tabela apresenta os resultados do teste T, onde cada condição foi comparada com o controle negativo (controle de vida). Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) estão marcadas com asterisco.

7 DIAS 1d							
	Bio C sealer	Bio C sealer ion+	Sealer Plus	Total fill	AH plus	MTA	Sealer 26
PURO	0,002*	0,01*	0,0004*	0,2	0,1	0,00005*	0,006*
1:2	0,003*	0,057	0,001*	0,3	0,2	0,0001*	0,07
1:4	0,02*	0,3	0,01*	0,5	0,8	0,0001*	0,1
1:8	0,008*	0,3	0,0052	0,5	0,7	0,02*	0,02*
1:32	0,008*	0,0007*	0,1	0,3	0,3	0,3	0,1
1:128	0,009*	0,02*	0,1	0,4	0,5	0,6	0,08

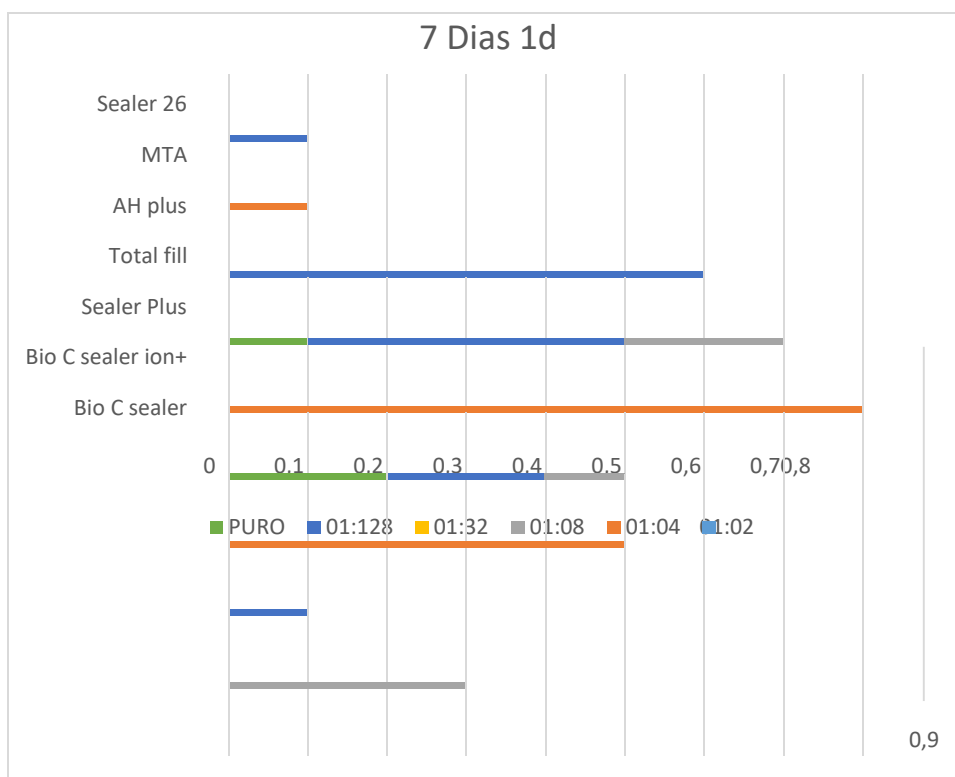


Figura 11: Representação em gráfico da tabela 4.

Tabela 5: Dados estatísticos na condição 7dias de presa 7 dias de exposição. A tabela apresenta os resultados do teste T, onde cada condição foi comparada com o controle negativo (controle de vida). Os resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) estão marcadas com asterisco.

7 DIAS 7d							
	Bio C sealer	Bio C sealer ion+	Sealer Plus	Total fill	AH plus	MTA	Sealer 26
PURO	0,02*	0,3	0,01*	0,5	0,8	0,0001*	0,1
1:2	0,008*	0,3	0,052	0,5	0,7	0,02*	0,02*
1:4	0,03*	0,04*	0,3	0,9	0,8	0,00007*	0,057
1:8	0,1	0,005*	0,1	0,7	0,5	0,005*	0,06
1:32	0,1	0,008*	0,3	0,7	0,9	0,4	0,1
1:128	0,01*	0,003*	0,07	0,9	0,8	0,4	0,1

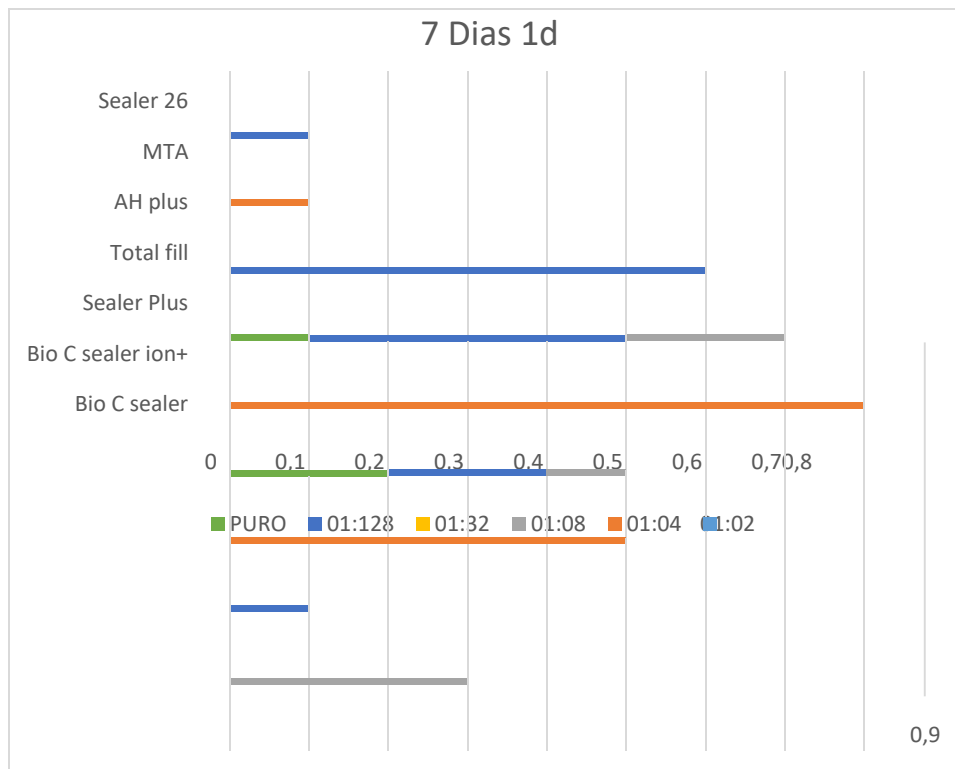


Figura 12: Representação em gráfico da tabela 5.

Ao avaliar a coloração do meio presente nos tubos *ependorfs* é possível determinar o pH presente nesse meio, isso porque, segundo as especificações do fabricante (MegaCell™), o meio DMEM possui um agente de coloração para esse fim. Quando o pH está básico o meio apresenta uma coloração rosa mais intensa, quando o pH está ácido o meio perde sua tonalidade rosa e tende para o amarelo.

É possível observar que os extratos dos cimentos que tomaram presa por 7 dias apresentaram pH mais básico quando comparados com os extratos dos cimentos *fresh*. Dentre os cimentos avaliados o Sealer 26 apresentou os meios mais ácidos, principalmente em suas condições *fresh* com 24h e 7 dias de condicionamento do meio. O Bio C Sealer por sua vez apresentou os meios mais básicos como pode ser observado na figura a baixo.

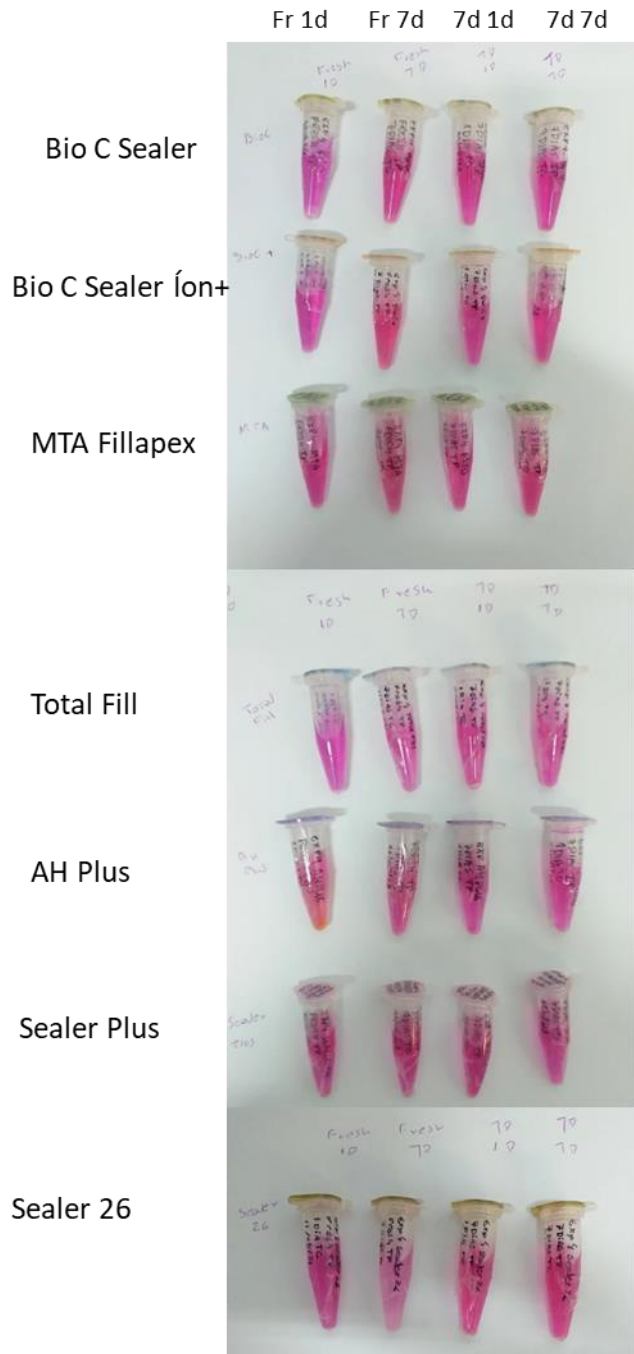


Figura 13: Meios condicionados armazenados em *ependorfs*. Fr 1d – Meio condicionado por 1 dia pelo cimento em sua fase recém preparada. Fr 7d – Meio condicionado por 7 dias pelo cimento em sua fase recém preparada. 7d 1d – Meio condicionado 1 dia pelo cimento em sua fase após a presa de 7 dias. 7d 7d – Meio condicionado 7 dias pelo cimento em sua fase após a tomada de presa de 7 dia.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos dos testes de MTT indicaram que a citotoxicidade é dependente da concentração, isto é, conforme o extrato é diluído, o índice de morte das células também diminui para alguns cimentos. Além disso, também foi possível observar que a condição *fresh* com um dia de exposição, em todos os materiais testados, se mostrou mais citotóxica quando comparada com as outras condições, principalmente com aquelas de 7 dias de presa.

Segundo Ahlberg (1998), a biocompatibilidade de qualquer sistema polimérico é extremamente dependente das biocaracterísticas do seu monômero. Omurlu e colaboradores (2016) também comentaram sobre a citotoxicidade dos monômeros presentes nos cimentos endodônticos, dando destaque aos cimentos resinosos que, além de terem sua biocompatibilidade afetada, também sofrem com a perda de adesão aos tecidos dentários, podendo levar à microinfiltração. Ainda afirmam que a presença de monômero residual, resultado da transformação incompleta de monômeros em polímero, pode causar irritação, inflamação e reações alérgicas a mucosa oral, além de serem citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Portanto, com base no que foi observado, a hipótese para explicar a maior citotoxicidade na condição *fresh* dos materiais testados é de que essa resposta celular é causada devido à maior presença de componentes livres na formulação que nesta fase ainda não reagiram entre si completamente.

Quando inseridos no interior do canal radicular, os cimentos endodônticos estão em sua forma *fresh*. Esses materiais entram em contato com tecidos vivos (polpa apical e/ou ligamento periodontal) na região do forame apical e em ocasionais canais laterais e ramificações. Além disso, se extravasados, podem afetar uma área muito maior dos

tecidos perirradiculares (ligamento periodontal e osso alveolar). Desse modo, no momento da obturação, esses materiais têm maior potencial de agressão aos tecidos perirradiculares, diminuindo ou perdendo essa capacidade conforme a reação de presa vai ocorrendo.

Prüllage (2016) ressalta que tempo de presa dos cimentos endodônticos depende de seus componentes constituintes, do tamanho de suas partículas, temperatura e umidade do ambiente. Materiais hidráulicos como o MTA podem não tomar presa mesmo após uma semana, se não estiverem em meio úmido. Para garantir que os materiais alcançassem a sua reação de presa, o tempo estipulado neste estudo foi de 7 dias em meio úmido, para simular a umidade presente no interior dos canais.

Após a reação de presa, segundo Lopes & Siqueira (2020) ocorre uma diminuição da quantidade de componentes livres nos materiais. No presente estudo, foi possível observar que após o período de 7 dias, houve o aumento da vitalidade celular em todos os cimentos, com exceção do MTA Fillapex, indicando que houve uma diminuição da citotoxicidade para a maioria.

Dentre os materiais testados, o MTA Fillapex foi o mais citotóxico, provocando morte celular tanto em sua fase *fresh*, como após 7 dias. O estudo realizado por Almeida e colaboradores (2020) também relatou citotoxicidade do MTA Fillapex durante todo período testado e especularam que isso pode ter sido devido principalmente aos componentes salicilato, resina diluída e sílica, presentes em sua composição. Os autores também comentam que de acordo com a quantidade de material extravasado para os tecidos perirradiculares durante a obturação, pode haver comprometimento do reparo

tecidual.

Entretanto, um estudo de *follow-up* de Ricucci et al. (2016) avaliou 105 dentes com extrusão apical de material obturador, tratados pelo mesmo operador, com diferentes cimentos endodônticos, a base de resina epóxi, hidróxido de cálcio e óxido de zinco/eugenol, com exames de acompanhamento variando de 1 a 30 anos. Dentre os dentes avaliados, 75 apresentavam lesões perirradiculares no momento do tratamento, conforme determinado radiograficamente, e 30 apresentavam normalidade dos tecidos apicais. Como resultado do estudo, todos os dentes que não apresentavam lesão perirradicular permaneceram sem doença, independentemente do tipo de cimento extravasado. Por outro lado, dos que apresentavam lesão perirradicular antes do tratamento (canais infectados), 79% foram caracterizados como reparados após um período superior a 4 anos de acompanhamento. Os autores concluíram que o resultado do tratamento não é significativamente afetado pelo tipo de cimento extruído, contanto que os canais radiculares estejam tratados adequadamente.

Por sua vez, o estudo de Chybowski et al. (2018) acompanhou 307 dentes tratados com Bio C sealer tratados em consulta única. A taxa de sucesso geral foi de 90,9%, com 83,1% reparados, 7,8% cicatrizado e 9,1% não reparados. No geral, 47% dos dentes tratados apresentaram radiograficamente extravasamento de cimento. Porém, os autores relataram não haver diferença significativa de sucesso entre a presença ou ausência de extrusão de cimento no pós-operatório. Os autores concluíram que no período avaliado de 12 meses a taxa de sucesso do tratamento com Bio C sealer foi de 90.9%.

Nagar et al (2018) avaliaram os cimentos endodônticos à base de resina epóxi

(AH Plus), MTA (ProRoot MTA), óxido de zinco/eugenol (Septodont), e biocerâmico (Smartpaste Bio) nos períodos de 1, 3 e 6 meses após obturação, quanto à presença de dor, sensibilidade à percussão, inchaço e mobilidade. Os autores concluíram que o biocerâmico apresentou maior eficácia no tratamento, seguido pelo MTA, AH Plus e óxido de zinco/eugenol.

Ao realizar a análise dos poços das placas de Petri no microscópio, foi notável a presença de partículas de cimento endodôntico no extrato. Nos experimentos com Bio C Sealer, Bio C ion+ e Total Fill, principalmente em sua condição pura de *fresh* 1 dia, essas partículas estavam presentes em grande quantidade. Os tamanhos das partículas também podem influir no índice de morte celular, uma vez que partículas pequenas podem atravessar a membrana celular e sufocar as células ao se alojarem nas mitocôndrias, enquanto partículas maiores são grandes demais para adentrarem no citoplasma, como as grandes partículas presentes no caso do Total Fill e do Bio C Sealer. Quando comparado com os resultados do MTT, os poços da condição *fresh* 1 dia puro dos três cimentos, aqueles que possuíam partículas maiores tiveram um índice maior de vitalidade que o cimento que apresentou partículas menores, no caso o Bio C Ion+.

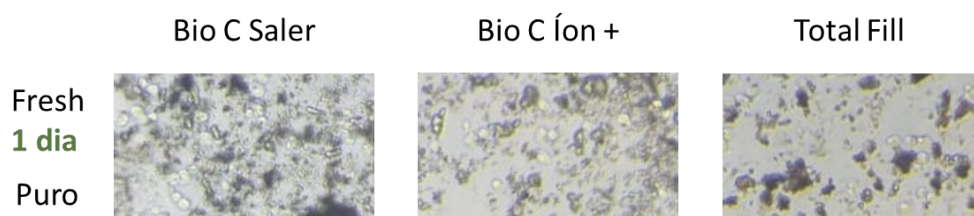


Figura 14: Microscopia. Imagens dos poços no microscópio da condição *fresh* 1 dia puro do Bio C Sealer, Bio C Íon + e Total fill. Nas imagens estão presentes os poços, do Bio C Sealer, Bio C Sealer Íon + e Total Fill, onde as células SaOS-2 foram expostas ao meio condicionado por um dia com o cimento *fresh*.

O estudo realizado não é suficiente para avaliar se os materiais induzem a proliferação celular, uma vez que os materiais podem induzir o aumento da formação de mitocôndrias nas células, fazendo com que reaja no teste de MTT. Sendo assim, não é possível afirmar com certeza se houve aumento do número de células ou do número de mitocôndrias.

6. CONCLUSÃO

Em todos os materiais avaliados, a forma *fresh* apresentou maior citotoxicidade, indicando que os cimentos endodônticos podem ser mais agressivos aos tecidos perirradiculares nas primeiras horas ou dias seguintes à obturação. Com o passar do tempo, conforme ocorre a reação de presa, a grande maioria tem toxicidade significativamente diminuída ou perdida, sem potencial de influenciar o sucesso do tratamento endodôntico. No presente estudo foi possível observar que o MTT apresentou maior citotoxicidade quando comparado aos outros cimentos, pois em todas as suas condições (*fresh* e após a presa, com 24h e 7 dias de exposição ao meio condicionado) apresentou valores consideráveis de mortalidade celular. Além disso, também foi possível notar que o Bio C Sealer ion + se mostrou mais citotóxico que o Bio C Sealer, com as imagens da microscopia podemos correlacionar esses resultados ao tamanho das partículas. O Bio C Sealer ion + apresenta partículas menores que o Bio C Sealer. Suas partículas menores podem influir no aumento da mortalidade celular.

Devido ao ensaio de MTT não ser sensível para avaliar a capacidade dos cimentos endodônticos de estimularem a proliferação celular, mais estudos devem ser realizados nesse sentido, visto que alguns gráficos indicam maior atividade mitocondrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida MM, Rodrigues CT, Matos AA, Carvalho KK, Silva EJ, Duarte MA, Oliveira RC, Bernardineli N. Analysis of the physicochemical properties, cytotoxicity and volumetric changes of AH Plus, MTA Fillapex and TotalFill BC Sealer. *J Clin Exp Dent*. 2020 Nov 1;12(11):1058-e1065.

Alves EC, Tanomaru-Filho M, Delfino MM, et al. Biocompatibility and Bioactive Potential of New Calcium Silicate-based Endodontic Sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *J Endod*. 2020 Oct;46(10):1470-1477. doi: 10.1016/j.joen.2020.07.011.

Ahlberg KM, Tay WM. A methacrylate-based cement used as a root canal sealer. *Int Endod J*. 1998 Jan;31(1):15-21.

Bin CV, Valera MC, Camargo SE, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):495-500. doi: 10.1016/j.joen.2011.11.003.

Chybowski EA, Glickman GN, Patel Y, Fleury A, Solomon E, He J. Clinical Outcome of Non-Surgical Root Canal Treatment Using a Single-cone Technique with Endosequence Bioceramic Sealer: A Retrospective Analysis. *J Endod*. 2018 Jun;44(6):941-945. doi: 10.1016/j.joen.2018.02.019.

Donnermeyer D, Dornseifer P, Schäfer E, et al. The push-out bond strength of calcium silicate-based endodontic sealers. *Head Face Med.* 2018 Aug 20;14(1):13. doi: 10.1186/s13005-018-0170-8.

Grossman L. *Endodontia Preatica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. Philadelphia: Lea and Febiger; 1982:343.

Hargreaves KM, Cohen S. *Caminhos da Polpa*. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

Jafari F, Jafari S. Composition and physicochemical properties of calcium silicate based sealers: A review article. *J Clin Exp Dent.* 2017 Oct 1;9(10):1249-1255. doi: 10.4317/jced.54103.

Kitagawa H, Kitagawa R, Tsuboi R, Hirose N, et al. Development of endodontic sealers containing antimicrobial-loaded polymer particles with long-term antibacterial effects. *Dent Mater.* 2021 Aug;37(8):1248-1259. doi: 10.1016/j.dental.2021.04.008.

Komabayashi T, Colmenar D, Cvach N, et al. Comprehensive review of current endodontic sealers. *Dent Mater J.* 2020 Sep 29;39(5):703-720. doi: 10.4012/dmj.2019288.

Lopes HP, Siqueira JF Jr. *Endodontia- Biologia e Técnica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Editora Gen, 2020.

Kuga MC, Faria G, Só MV, et al. The impact of the addition of iodoform on the physicochemical properties of an epoxy-based endodontic sealer. *J Appl Oral Sci.* 2014 Apr;22(2):125-30. doi: 10.1590/1678-775720130052.

Nagar N, Kumar NA comparative clinical evaluation of a bioceramic root canal sealer with

MTA based sealer, resin based sealer and zinc oxide based sealer-an in vivo study.

Journal of Dental and Medical Sciences 2018 May 17:81–85.

Omurlu H, Arisu HD, Dalkilic EE, et al. Investigation of eluted monomers from resinbased root canal sealer by high-performance liquid chromatography analysis. Eur J Dent. 2016 Jan-Mar;10(1):92-96.

Prüllage RK, Urban K, Schäfer E, et al. Material Properties of a Tricalcium Silicatecontaining, a Mineral Trioxide Aggregate-containing, and an Epoxy Resin-based Root Canal Sealer. J Endod. 2016 Dec;42(12):1784-1788. doi: 10.1016/j.joen.2016.09.018.

Ricucci D, Rôças IN, Alves FR, Loghin S, Siqueira JF Jr. Apically Extruded Sealers: Fate and Influence on Treatment Outcome. J Endod. 2016 Feb;42(2):243-9. doi: 10.1016/j.joen.2015.11.020.

Sanz JL, López-García S, Lozano A, et al. Microstructural composition, ion release, and bioactive potential of new premixed calcium silicate-based endodontic sealers indicated for warm vertical compaction technique. Clin Oral Investig. 2021 Mar;25(3):1451-1462. doi: 10.1007/s00784-020-03453-8.

Seo DG, Lee D, Kim YM, Song D, Kim SY. Biocompatibility and Mineralization Activity of Three Calcium Silicate-Based Root Canal Sealers Compared to Conventional ResinBased Sealer in Human Dental Pulp Stem Cells. Materials (Basel). 2019 Aug 5;12(15):2482. doi: 10.3390/ma12152482.

Silva EJ, Hecksher F, Vieira VT, et al. Cytotoxicity, antibacterial and physicochemical properties of a new epoxy resin-based endodontic sealer containing calcium hydroxide. *J Clin Exp Dent*. 2020 Jun 1;12(6):533-539. doi: 10.4317/jced.56534.

Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, et al. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod*. 2013 Feb;39(2):274-7. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.030.

Siqueira JF Jr, Favieri A, Gahyva SM, et al. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod*. 2000 May;26(5):274-7. doi: 10.1097/00004770-200005000-00005.

Teixeira ABV, de Castro DT, Schiavon MA, et al. Cytotoxicity and release ions of endodontic sealers incorporated with a silver and vanadium base nanomaterial. *Odontology*. 2020 Oct;108(4):661-668. doi: 10.1007/s10266-020-00507-x.

Torabinejad M, Richard E. *Endodontia – Princípios e Práticas*. 4. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

Vertuan GC, Duarte MAH, Moraes IG, et al. Evaluation of Physicochemical Properties of a New Root Canal Sealer. *J Endod*. 2018 Mar;44(3):501-505. doi: 10.1016/j.joen.2017.09.017.

Vouzara T, Dimosiari G, Koulaouzidou EA, et al. Cytotoxicity of a New Calcium Silicate Endodontic Sealer. *J Endod*. 2018 May;44(5):849-852. doi: 10.1016/j.joen.2018.01.015.

Xuereb M, Vella P, Damidot D, et al. In situ assessment of the setting of tricalcium silicatebased sealers using a dentin pressure model. *J Endod*. 2015 Jan;41(1):111-24. doi:

10.1016/j.joen.2014.09.015.

Zhou HM, Du TF, Shen Y, et al. In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. *J Endod.* 2015 Jan;41(1):56-61. doi: 10.1016/j.joen.2014.09.012.

Zordan-Bronzel C.L, Esteves Torres F.F, Tanomaru-Filho M, et al. Evaluation of Physicochemical Properties of a New Calcium Silicate-based Sealer, Bio-C Sealer. *J Endod.* 2019 Oct;45(10):1248-1252. doi: 10.1016/j.joen.2019.07.006.