



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



DANILO CASSIANO FERRAZ

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA CITOTOXICIDADE E INIBIÇÃO
DA OSTEOCLASTOGENESE PROMOVIDA POR CIMENTOS
ENDODÔNTICOS BIOCERAMICOS EM CULTURA
PRIMÁRIA DE MACRÓFAGOS E OSTEOCLASTOS**

UBERLÂNDIA

2019

DANILO CASSIANO FERRAZ

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA CITOTOXICIDADE E INIBIÇÃO
DA OSTEOCLASTOGENESE PROMOVIDA POR CIMENTOS
ENDODÔNTICOS BIOCERAMICOS EM CULTURA
PRIMÁRIA DE MACRÓFAGOS E OSTEOCLASTOS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Faculdade de
Odontologia da UFU, como requisito
parcial para obtenção do título de
Graduado em Odontologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camilla
Christian Gomes Moura

Co-orientadora: Ms. Gabriela Leite de
Souza

Uberlândia, MG

2019

AGRADECIMENTOS

Acho importante iniciar essa sessão com a compreensão de que nada acontece no nosso caminho por acaso. Portanto tenho de agradecer a mim, livre de qualquer soberba, sabendo reconhecer os meus esforços para levar cinco anos de faculdade voltados em trilhar todas as necessidades possíveis que um dia fariam toda a diferença no meu futuro profissional e pessoal. E, portanto, hoje estou saindo dessa escola realizado por tudo que tive força de levar adiante e os percalços que precisei deixar para trás para que servisse de crescimento.

Acredito ser importante agradecer às pessoas que passaram por nossa vida, brevemente ou por um longo período, mas que eventualmente não estão mais presentes. Elas nos moldam de uma forma muito eficaz e isso reflete diretamente nas ações que tomamos quanto a nós mesmos. Aos que ficaram e sempre estarão por mim, tenho meus pais Fátima e Sebastião, que não mediram e ainda não medem esforços para me ver ser quem eu quero. Constroem juntos comigo meus sonhos e apoiam cada decisão que parece impossível. Meus irmãos, Vinicius que a partir de crianças rixosas se tornou minha referência de melhor amigo, e Nicolas, a criança da qual ainda espero ser uma referência e poder prover muito carinho.

Agradeço ao companheirismo de Bruno, Paloma, Stephanie, Giselle e Maria Clara. Vocês estão presentes na minha trajetória há muito tempo sabendo ouvir com atenção, cuidado, e compartilhando as vivências em cada esfera de vida que cada um tem a oferecer. Saibam o quanto é incrível dividir vitórias com vocês, sabendo eu o quanto cada um é vitorioso onde esteja. Com propriedade, ofereço um amor desmesurado a vocês.

Agradeço a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, que mudou todos os meus planos de vida e me ensinou o ser humano diferente que eu podia ser. Valorizar coisas realmente importantes e lidar com situações de responsabilidade que me fizeram olhar pra frente e reconhecer o profissional que posso ser em um futuro breve. Isso não seria possível sem a ajuda de professores incríveis que decidem passar pelo nosso caminho afim de fazer a diferença, portanto obrigado à esses docentes que se fazem empáticos e necessários, eu não poderia hoje deixar de olhar para trás e ignorar o quanto vocês fizeram e ainda fazem a diferença. Foi essa instituição também que me trouxe pessoas incríveis. Devo

reconhecer a presença sólida dos meus amigos que trilharam todas as dificuldades segurando a mão um do outro, Ana Carolina Stival, Andressa e Calebe. Aos laços que se fortaleceram durante os cinco anos de curso, portanto obrigado Kássia, Tatiana, Jéssica, Isadora, Larissa, Rita, Sávio, vocês foram peças-chaves para tornar meus dias extremamente mais leves e sorridentes. Aos colegas de sala, passamos momentos conturbados e outros extremamente empáticos, aprendemos a lidar com a individualidade de cada um, e no fim, eu não me imaginaria em nenhuma outra turma, portanto meu coração é sempre 81. Agradeço a comissão de formatura da qual faço parte juntamente de Anahi, Lorena, Rafael Caixeta e Thalles, por ter me ensinado questões básicas de crescimento. Obrigado a vocês, por além de se prontificarem a passar por situações adversas e desconfortáveis tratando-se do cargo que ocupamos, nunca mediram esforços para proteger uns aos outros e abraçar a dificuldade para obter resolutivas satisfatórias.

Finalmente, a minha orientadora Camilla Moura, tenho todos os elogios do mundo a oferecer, agradeço por todo carinho, todas as oportunidades, e sobretudo por me fazer enxergar em mim meu potencial. Tenho a agradecer por sua orientação além do tecnicismo, por querer trazer o melhor do outro à tona, e hoje, me sinto extremamente grato a você por isso, portanto saiba que onde nossos caminhos se separarem minha disponibilidade a você e suas necessidades serão sempre atendidas com prazer. Agradeço às minhas co-orientadoras por me disporem do privilégio de ter a orientação de duas pessoas tão competentes. Tanto Camila Rosatto que não mediu esforços em passar dias afundo no laboratório e me ensinando novas formas de trabalho, sabendo eu que isso será decisivo na minha trajetória, quanto Gabriela Leite que com todo seu carisma nunca se negou a um pedido de ajuda da forma mais solícita possível, portanto, sei que não poderia ter sido melhor assistido, principalmente tratando-se deste presente trabalho que demandou tantos esforços em conjunto, tomo vocês três como extrema referência. Por fim, todo meu coração a todos citados diretamente e indiretamente. Sigo acreditando que o universo irá prover pessoas tão incríveis quanto vocês de agora em diante.

*"Embora me tente olhar para trás tem noites que eu penso
que não vai dar mais. Mas ser, é melhor que lembrar e eu
pensei que o que eu construí tempo atrás só foi existir
depois que eu fui buscar"*

(Bernardes, 2017)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar in vitro a citotoxicidade e osteoclastogênese em cultura de osteoclastos em contato com os seguintes cimentos biocerâmicos: Endosequence BC Sealer (END), BioRoot RCS (BIR), Sealer Plus (SMK) e Bio-C Sealer (BIC). Células indiferenciadas proveniente da medula do fêmur de camundongos de linhagem C57BL/6 foram coletadas e induzidas a diferenciação em células osteoclásticas com fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) e ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL). As células foram mantidas em contato com os estratos dos cimentos nas diluições de 1:20, 1:100, 1:500 e 1:2500 durante todo o período de diferenciação. Parte das amostras foram utilizadas para avaliação da osteoclastogênese, através da porcentagem de células positivas para fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP) e avaliação qualitativa da formação de anéis de actina. Outra parte foi analisada a viabilidade celular pelo ensaio MTT Formazan, após 12 horas, 24 horas e 48 horas de contato com os estratos dos cimentos. Quanto a viabilidade celular, não houve diferença estatística tratando-se do tempo e diluição dos cimentos ($P > 0,05$). Quando comparados ao controle, o grupo END se apresentou semelhante ao controle na diluição de 1:20 no tempo de 12h e 48h. Os grupos BIR, BIC e SMK diferem do controle negativo, mas quando avaliadas as diluições, não apresentam diferença, portanto possuem viabilidade estável. De acordo com o TRAP, em geral o grupo SMK apresentou maior contagem de células clásticas e o grupo BIC menor quantidade de osteoclastos. Quando comparado ao controle, todos os cimentos apresentaram diferença estatística do grupo controle negativo ($P < 0,001$). No controle positivo, todos os cimentos apresentaram menor número de osteoclastos, devido aos mesmos não serem induzidos a osteoclastogênese. É possível observar que em na diluição de 1:2500 a presença de osteoclastos é mais significativa, sendo essa inibida de forma gradual até chegar em menores concentrações, no caso 1:20 ($P < 0,05$). Portanto conclui-se que a osteoclastogênese foi inibida pelos cimentos biocerâmicos e a viabilidade celular em todos os grupos reduziu após o período de 48 horas.

Palavras-chave: cimentos biocerâmicos, citotoxicidade, viabilidade celular, osteoclastogênese.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate in vitro cytotoxicity and osteoclastogenesis in osteoclast culture in contact with the following bioceramics: Endosequence BC Sealer (END), BioRoot RCS (BIR), Sealer Plus (SMK) and Bio-C Sealer (BIC). Undifferentiated cells originating from the marrow of C57BL mouse were collected and induced differentiation into osteoclastic cells with macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and nuclear factor activating receptor kappa B ligand (RANKL). Cells were kept in contact with cement extracts in the dilutions of 1:20, 1: 100, 1: 500 and 1: 2500 during the period of differentiation. Part of the samples were used for the evaluation of osteoclastogenesis, through the percentage of positive tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) cells and qualitative evaluation of the actuation ring formation. Another part was analyzed for cell viability by the Formazan MTT assay, after 12 hours, 24 hours and 48 hours of contact with the cement extract. Regarding cell viability, there was no statistical difference between time and cement dilution ($P > 0.05$). When compared to the control, END group presented similar to the control in dilution of 1:20 in the time of 12h and 48h. The groups BIR, BIC and SMK differ from the negative control, but when dilutions are evaluated, they have no difference, therefore, they have stable viability. According to TRAP, in general, the SMK group has the largest number of osteoclast cells and the BIC group has the least. When compared to the control, all groups exhibited statistical difference in the negative control group ($P < 0.001$). In positive control, all cements presented a lower number of osteoclasts, because they are not induced by osteoclastogenesis. It is possible to observe that in the dilution of 1: 2500 the presence of osteoclasts is more significant, being inhibited gradually until reaching lower rates, in the case 1:20 ($P < 0.05$). Therefore, we conclude that osteoclastogenesis was inhibited by bioceramic cements and cell viability in all groups reduced after 48 hours.

Key-words: calcium silicate-based sealer, cytotoxicity, cell viability, osteoclastogenesis

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	09
2.	METODOLOGIA	10
2.1.	Preparação dos estratos.....	10
2.2.	Obtenção, diferenciação e tratamento de clastos.....	11
2.3.	Teste de viabilidade celular pelo método MTT Formazan.....	11
2.4.	Análise da marcação para TRAP nas amostras.....	12
2.5.	Análise da marcação dos anéis de actina.....	12
2.6.	Análise estatística.....	13
3.	RESULTADOS	13
4.	DISCUSSÃO	19
5.	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da obturação do canal radicular é um fator importante para o sucesso do tratamento endodôntico, sendo a escolha do cimento endodôntico com base em suas características biológicas e físico-químicas fundamental nesse processo (Figueiredo *et al.*, 2001). Idealmente, a obturação deve ficar contida dentro do canal radicular, evitando que o material obturador entre em contato direto com os tecidos periapicais (Ricucci e Langeland, 1998; Schaeffer *et al.*, 2005). No entanto, em caso de reabsorções apicais e sobre instrumentação, o forame apical pode sofrer dilatação ou deformação (Ricucci e Langeland, 1998; Goldberg *et al.*, 2019), levando a incidência de extravasamentos acidentais do material obturador. Atualmente, com o advento dos cimentos a base de silicato de cálcio com princípio bioativo, é verificado também essa prática de forma intencional, com o objetivo de promover o reparo ósseo através da formação de hidroxiapatita após o contato do cimento com os tecidos periapicais (Chybowski *et al.*, 2018). Nestas situações o cimento entra em contato direto com as células do sistema imunológico, podendo desencadear apoptose ou necrose e estimular a liberação de mediadores pró-inflamatórios (Souza *et al.*, 2019). Tais reações imuno-inflamatórias são importantes para a cura periapical porém não devem se perpetuar para não interferir negativamente no reparo periapical e no processo de neoformação óssea (Sjogren *et al.*, 1990; Schaeffer *et al.*, 2005; Ricucci *et al.*, 2011). No entanto, experimentos *in vitro* tem demonstrado que a resposta celular desencadeada pelos cimentos endodônticos varia em função do tipo de célula analisada e da composição do cimento (Chang *et al.*, 2014).

Os cimentos biocerâmicos são desenvolvidos a base de silicato de cálcio, silicatos tricálcicos e dicálcicos, fosfatos de cálcio, hidróxido de cálcio e óxido de zircônio como radiopacificador (Bueno *et al.*, 2016). Estes foram introduzidos na prática odontológica principalmente devido a sua biocompatibilidade (Bosio *et al.*, 2014), atividade antibacteriana (Zhang *et al.*, 2009) e sobretudo potencial osteogênico, estimulando o reparo ósseo na região periapical (Chang *et al.*, 2014; Prati e Gandolfi, 2015; Utneja *et al.*, 2015). O reparo ósseo é um processo altamente regulado pela atividade osteoblástica e osteoclástica coordenada (Datta *et al.*, 2008), o que é de suma importância no reparo das lesões ósseas periapicais. Porém, é possível notar na literatura poucos estudos que avaliem a citotoxicidade e inibição de

osteoclastogênese dessa nova classe de cimentos em células osteoclásticas (Rodrigues *et al.*, 2013). Os osteoclastos por outro lado, são células multinucleadas que descendem de precursores hematopoiéticos CD14+ encontrados na medula óssea e responsáveis pela reabsorção óssea (Vaananen e Laitala-Leinonen, 2008). Considerando que há estudos que determinam o efeito citotóxico de cimentos biocerâmicos em contato fibroblastos (Shon *et al.*, 2012; Chakar *et al.*, 2017) e osteoblastos (Costa-Rodrigues *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2015), mas que negligenciam seus efeitos em células osteoclásticas, as quais são diretamente responsáveis pelo processo de remodelação óssea nas lesões periapicais este trabalho tem como objetivo avaliar a citotoxicidade e a atividade de fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP) em cultura de macrófagos e osteoclastos em contato com os cimentos biocerâmicos: Endosequence BC Sealer (Brasseler), BioRoot RCS (Septodont), Sealer Plus (MK Life) e Bio-C Sealer (Angelus). A hipótese nula testada é de que os diferentes cimentos endodônticos não afetarão as respostas celulares avaliadas.

2. METODOLOGIA

2.1. Preparação dos estratos

Foram testados os seguintes cimentos endodônticos biocerâmicos: Endosequence BC Sealer (Brasseler) – END; BioRoot RCS (Septodont) – BIR; Sealer Plus (MK Life) – SMK; e Bio-C Sealer (Angelus) – BIC. Os estratos dos cimentos foram preparados de acordo com o padrão ISO 10993-5 (Standardization, 2009). Os cimentos foram manipulados de acordo com instruções do fabricante sob condições assépticas, dentro de um fluxo laminar. 0,3 mL de cimento foi inserido no fundo do poço em uma placa de 24 poços, e foi adicionado imediatamente 1,5 mL de meio de cultura α -MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1% de antibiótico e antimicótico (Sigma-Aldrich) em cada poço. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Posteriormente, os extratos originais obtidos foram coletados, filtrados e em seguida, diluídos nas concentrações de 1:20, 1:100, 1:500 e 1:2500. (22)

2.2. Obtenção, diferenciação e tratamento de clastos

Todos os procedimentos com animais foram realizados sob aprovação pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA-UFU) sob o número do projeto de 003/19. Células da medula óssea (BMMs) derivadas do fêmur de camundongos C57BL/6 de 5 semanas de idade foram plaqueadas e cultivadas em meio essencial mínimo modificado alfa (α -MEM) (Sigma-Aldrich) suplementado com antibióticos (Sigma-Aldrich) e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen). As BMMs foram isoladas e 2×10^6 células foram incubadas com 30 ng/mL de fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) (Peprotech, Rock Hill, NJ), em placa petri. Após 3 dias, os macrófagos-monócitos derivados da medula óssea (BMMs) foram desaderidos e semeados em placas de 96 poços na densidade de 2×10^4 cel/pç para marcação de TRAP, ou sobre lamínulas em placas de 48 poços para marcação dos anéis de actina. Todos os testes foram realizados com três amostras por grupo ($n=3$) em réplica biológica. Após a adesão das células (3 horas), o meio de cultura foi removido e substituído pelos estratos nas diluições em teste e foi feita estimulação com 10 ng/mL de ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) e 30 ng/mL de M-CSF (dia 1 do tratamento). Após 2 dias, os estratos foram trocados e as células foram estimuladas novamente com RANKL (10 ng/mL) e M-CSF (30 ng/mL) (dia 3 do tratamento). Depois de 2 dias, as células foram fixadas (dia 5 do tratamento) para marcação de TRAP e anéis de actina. (Soares *et al.*, 2019).

2.3. Teste de viabilidade celular pelo método MTT Formazan

O teste de viabilidade celular, foi realizado com três amostras por grupo ($n=3$) em réplica biológica. BMMs foram plaqueados em placas de 96 poços na concentração e 2×10^4 cel/pç, em meio de cultura α -MEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB (Invitrogen), 1% de antibiótico e antimicótico (Sigma-Aldrich) e 30 ng/mL de M-CSF (Peprotech). As células foram tratadas com os estratos dos cimentos nas diluições de 1:20, 1:100, 1:500 e 1:2500 pelos períodos de 12, 24 e 48 horas e a viabilidade celular determinada pelo método MTT Formazan. Tal método avalia atividade metabólica das mitocôndrias, sendo considerado um indicador indireto da viabilidade celular. Consiste na remoção do meio e substituição pela solução de 5 mg/ml de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich) seguido de incubação por 4 horas. (Reis *et al.*, 2018) Após

este período, o sobrenadante foi removido e adicionado Dimetil sulfoxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) em cada poço para dissolução dos cristais de formazan formados. A viabilidade celular foi obtida em uma leitora de microplacas na densidade óptica de 570 nm.

2.4. Análise da marcação para TRAP nas amostras

Para a marcação de TRAP, as células foram tratadas com os estratos dos cimentos nas diluições de 1:20, 1:100, 1:500 e 1:2500. No dia 5 do tratamento, o meio de cultura (estratos + M-CSF + RANKL) foi removido e as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e marcadas para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) seguindo as recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich). Resumidamente, as células foram incubadas durante 1 hora numa solução contendo 45 ml de água destilada, 1 ml de solução diazotizada granada GBC, 0,5 ml naftol AS-BI, 2 ml da solução de acetato e 1 ml da solução de tartarato. E a partir disso, as amostras foram contra coradas com hematoxilina, montadas e analisadas ao microscópio de luz. Foram consideradas células TRAP positivas aquelas com 3 ou mais núcleos com grânulos citoplasmáticos marcados por depósitos de cor púrpura a vermelho escuro, sendo a contagem de células positivas determinada por toda a extensão do poço. O número de amostras contendo células positivas para TRAP em cada espécime foi contado e expresso com média. As imagens foram obtidas com magnificação de 10 x usando um microscópio invertido Leica DM IRB acoplado com uma câmera DFC490 (Leica, Wetzlar, Germany). Esta análise possibilita verificar a presença de clastos e se eles se encontram ativos (Reis *et al.*, 2018).

2.5. Análise da marcação dos anéis de actina

Para a análise dos anéis de actina, as células foram tratadas com os estratos dos cimentos na diluição de 1:20. No dia 5 do tratamento, o meio de cultura (estratos + M-CSF + RANKL) foi removido e as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído. Após a fixação das células foram permeabilizadas com Triton X-100 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) em soro fetal bovino e incubadas com Faloidina tetrametilrodamina B isotiocianato (TRITIC) (Sigma) na concentração de 1:200 por 50 minutos. A partir disso foi utilizado solução tampão tris salino (TBS) para limpeza, e as células foram incubadas com TO-PRO – 3 iodide (Invitrogen) na diluição de 1:1000 para marcação do núcleo durante 30 minutos. As lâminas foram montadas

com solução de montagem antifading Prolong (Invitrogen) e levadas no microscópio invertido confocal (LSM 510 Meta) para captura de imagens (40x de magnificação) sob análise qualitativa (Reis *et al.*, 2018).

2.6. Análise estatística

Os dados foram analisados por distribuição normal e homocedasticidade usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, seguidos por testes estatísticos paramétricos. Para a viabilidade celular, foi usado One Way ANOVA seguido de teste de Tukey para verificar se houve diferença estatisticamente significativa quando os cimentos foram comparados entre si, dentro de uma mesma diluição e tempo. Two Way ANOVA foi usado quando os cimentos foram comparados em relação ao controle (seguido pelo teste de Dunnett) e posteriormente, entre suas diferentes diluições (seguido pelo teste de Tukey).

Para a análise de TRAP, foi preconizado One Way ANOVA seguido de teste de Tukey quando os cimentos foram comparados entre as suas diluições. Também foi utilizado Two Way ANOVA seguido de teste de Tukey afim de verificar diferença estatisticamente significativa quando os cimentos foram comparados entre si, dentro de uma mesma diluição e tempo. Além disso, 2-Way também foi utilizado quando cada cimento foi comparado em relação ao grupo controle, seguido do teste de Dunnett. Todos os testes tiveram nível de significância de $\alpha = 0,05$ e todas as análises foram feitas usando o software SigmaPlot, versão 13.1 (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA).

3. RESULTADOS

Em relação a viabilidade celular, quando comparados os cimentos biocerâmicos nos tempos de 12 e 24 horas (Tabelas 1 e 2), independente das diluições realizadas, nenhum deles apresentou diferença estatisticamente significativa entre si ($P > 0,05$). No entanto, no tempo de 48 horas (Tabela 3), o grupo END apresentou maiores valores de viabilidade celular quando comparado aos outros cimentos na diluição de 1:20 ($P < 0,001$) e 1:500 ($P = 0,001$). Porém, na diluição de 1:100 e 1:2500, END apresentou resultados semelhantes ao BioRoot ($P = 0,053$ e $P = 0,068$,

respectivamente). Além disso, END não apresentou diferença estatisticamente significativa comparado com o grupo SMK na diluição de 1:2500 ($P=0,327$).

Quando comparados ao grupo controle, END mostrou-se semelhante na diluição de 1:20, em 12 e 48 horas ($P=0,352$ e $P=0,120$, respectivamente). Nestes mesmos tempos, as diluições de 1:100, 1:500 e 1:2500, apresentaram diferença estatisticamente significativa na viabilidade em relação ao controle ($P<0,05$). No tempo de 24 horas, todas diluições apresentaram viabilidade significativamente menor que o controle ($P<0,05$). Quando as diluições foram comparadas entre si para END, não houve diferença nos tempos de 12 e 24 horas ($P>0,05$), mas em 48 horas houve diferença entre as diluições de 1:20 e 1:2500 ($P=0,035$). De modo geral, no tempo de 12 e 24 horas, as diluições foram similares, e em 48 horas a viabilidade celular diminuiu de forma gradativa juntamente com as diluições.

O grupo BIR nas diferentes diluições e tempos apresentou diferença estatisticamente significativamente comparada ao controle ($P=0,006$), assim como BIC ($P=0,049$) e SMK ($P=0,016$). Porém, SMK não apresentou diferença estatística em relação ao controle ($P=0,112$) na concentração de 1:20 em 24 horas. Quando as diluições foram comparadas entre si dentro do mesmo tempo, não foi detectada diferença estatística para BIR ($P>0,501$), BIC ($P=0,560$) e também SMK ($P=0,661$). No entanto, percebeu-se que os valores de viabilidade celular destes cimentos no tempo de 48 horas reduziram de forma expressiva.

Tabela 1. Médias e desvio padrão (%) referentes a viabilidade celular para as diferentes diluições dos cimentos biocerâmicos em análise de 12 horas, e comparação com o grupo controle¹

Cimentos biocerâmicos	Controle	12 horas			
	α-MEM	1:20	1:100	1:500	1:2500
END	100,00 (0,00)	92,31 (10,76)	83,52 (8,58)	80,14 (8,47)	79,66 (10,06)
	Aa	Aaα	Aba	Aba	Aba
BIR	100,00 (0,00)	84,45 (10,76)	76,78 (8,61)	76,29 (5,56)	74,55 (10,22)
	Aa	Aba	Aba	Aba	Aba
BIC	100,00 (0,00)	81,33 (8,96)	74,29 (4,20)	72,62 (5,31)	81,04 (8,58)
	Aa	Aba	Aba	Aba	Aba
SMK	100,00 (0,00)	84,82 (12,33)	75,96 (12,44)	79,60 (10,84)	74,29 (6,92)
	Aa	Aba	Aba	Aba	Aba

Fonte: O autor.

Tabela 2. Médias e desvio padrão (%) referentes a viabilidade celular para as diferentes diluições dos cimentos biocerâmicos em análise de 24 horas, e comparação com o grupo controle¹

Cimentos biocerâmicos	Controle	24 horas			
	α-MEM	1:20	1:100	1:500	1:2500
END	100,00 (0,00)	85,50 (13,61)	82,63 (11,16)	84,19 (12,98)	87,27 (9,44)
	Aa	Aba	Aba	Aba	Aba
BIR	100,00 (0,00)	83,64 (6,86)	85,00 (7,95)	84,34 (8,07)	84,47 (6,55)
	Aa	Aba	Aba	Aba	Aba
BIC	100,00 (0,00)	74,72 (10,47)	76,92 (13,86)	73,10 (12,46)	75,30 (13,05)
	Aa	Aba	Aba	Aba	Aba
SMK	100,00 (0,00)	88,46 (12,70)	83,42 (3,82)	82,20 (6,99)	79,37 (10,64)
	Aa	Aaα	Aba	Aba	Aba

Fonte: O autor.

¹Letras maiúsculas diferentes (A/B/C) representam diferença estatística entre colunas (cimentos variados na mesma diluição), sendo que letras minúsculas diferentes (a/b/c) representam diferença entre linhas quando se comparou as diluições com o controle; Já os símbolos diferentes (α/β/γ) representam diferença estatística entre as diluições para o mesmo cimento.

Tabela 3. Médias e desvio (%) padrão referentes a viabilidade celular para as diferentes diluições dos cimentos biocerâmicos em análise de 48 horas, e comparação com o grupo controle²

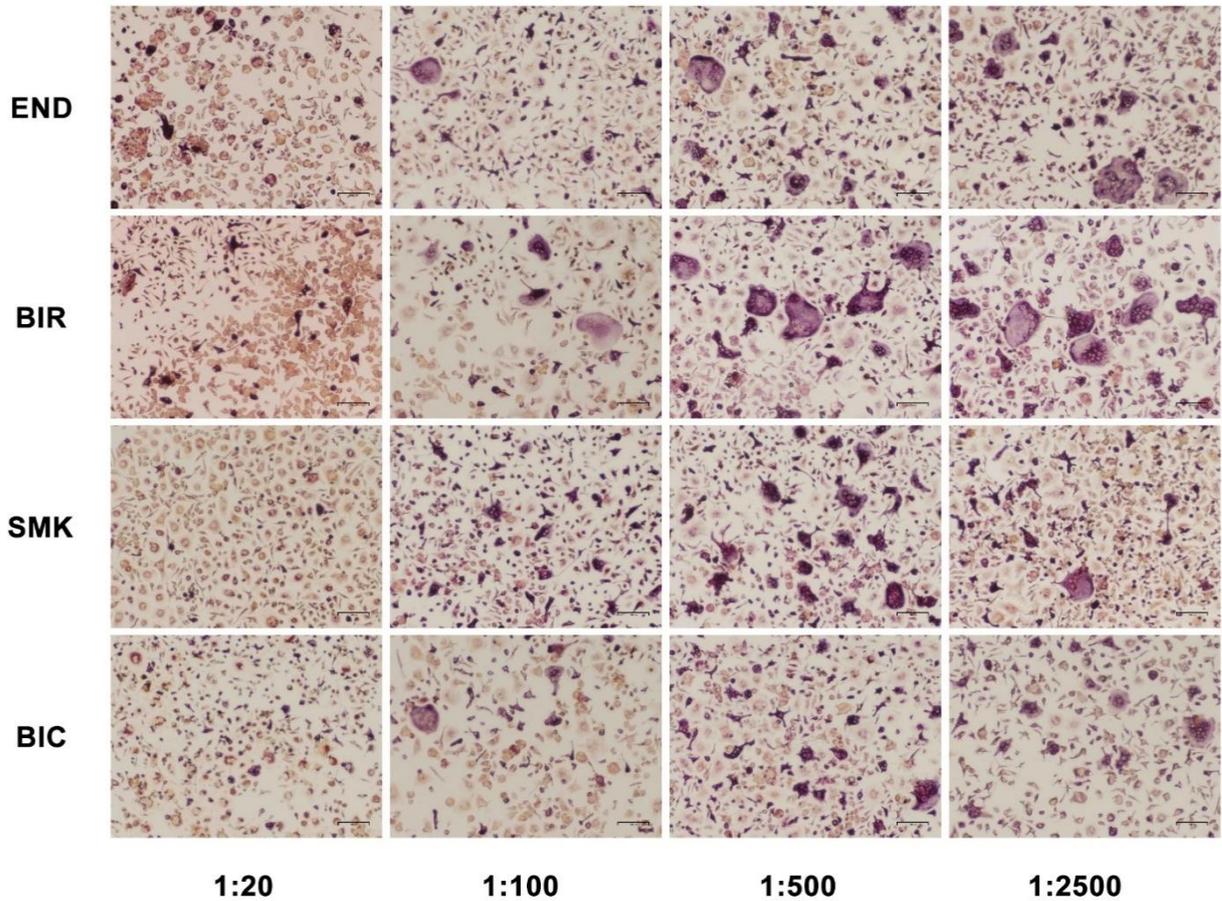
Cimentos biocerâmicos	Controle	48 horas			
	α -MEM	1:20	1:100	1:500	1:2500
END	100,00 (0,00)	89,46 (3,02)	85,74 (9,78)	78,01 (8,00)	73,90 (4,77)
	Aa	Aaa	Ab $\alpha\beta$	Ab $\alpha\beta$	Ab β
BIR	100,00 (0,00)	64,62 (7,95)	69,38 (15,92)	58,96 (5,93)	59,64 (9,81)
	Aa	Bba	ABba	Bba	ACba
BIC	100,00 (0,00)	65,32 (14,74)	60,95 (5,84)	60,27 (7,66)	55,34 (3,30)
	Aa	Bba	Bba	Bba	BCba
SMK	100,00 (0,00)	60,66 (12,51)	57,04 (5,89)	61,65 (9,21)	64,49 (14,79)
	Aa	Bba	Bba	Bba	ACba

Fonte: O autor

As células positivas para TRAP foram observadas no quinto dia de cultura após estimulação com RANKL conforme Figura 1. Tratando-se da contagem de clastos (Tabela 4), células positivas para TRAP, todos os cimentos biocerâmicos quando comparados entre si nas diferentes concentrações apresentaram diferença estatística significativa ($P < 0,001$). No geral, o grupo SMK apresentou maior número de células clásticas e BIC os menores valores. Quando comparados o controle negativo (α -MEM) e positivo (RANKL) em relação as diluições de cada cimento, foram detectadas diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,001$) para todos os cimentos em todas as concentrações em relação aos controles. As células que não receberam tratamento, mas foram expostas ao RANKL (controle positivo) apresentaram os valores significativamente mais altos de atividade de TRAP em comparação com todos os outros grupos, diferentemente do controle positivo que não apresentou atividade osteoclástica (Figura 2).

²Letras maiúsculas diferentes (A/B/C) representam diferença estatística entre colunas (cimentos variados na mesma diluição), sendo que letras minúsculas diferentes (a/b/c) representam diferença entre linhas quando se comparou as diluições com o controle; Já os símbolos diferentes ($\alpha/\beta/\gamma$) representam diferença estatística entre as diluições para o mesmo cimento.

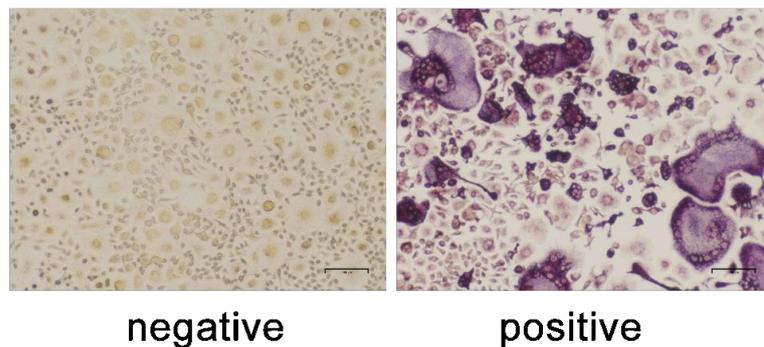
Figura 1 - Diferenciação de osteoclastos para os diferentes cimentos endodônticos em diferentes diluições do estrato



Fonte: O autor.

Figura 2 - Controle negativo (α -MEM) e positivo (RANK-L) da diferenciação osteoclástica

CONTROL



Fonte: O autor.

Quanto às diferenças entre as diluições dentro de um mesmo cimento, houve diferença estatística entre todas as diluições para todos os cimentos ($P < 0,001$), com exceção entre 1:20 e 1:100 para MK Life ($P = 0,058$). Nessas concentrações, houve uma menor quantidade de osteoclastos enquanto que em 1:2500 houve maior presença de células clásticas e diferença estatística em relação as outras diluições ($P < 0,05$). Em END, as diluições diferiram-se estatisticamente entre si ($P \leq 0,001$), sendo semelhantes apenas entre 1:500 e 1:2500 ($P = 0,311$) com números mais expressivos de osteoclastos quando comparados à outras diluições. Para BIC e BIR, a diluição que apresentou diferença estatística com as demais ($P < 0,001$) e menor número de células clásticas foi também 1:20, sendo que as diluições maiores (1:100, 1:500 e 1:2500) apresentaram maior presença de osteoclastos e não diferiram estatisticamente entre si ($P > 0,05$).

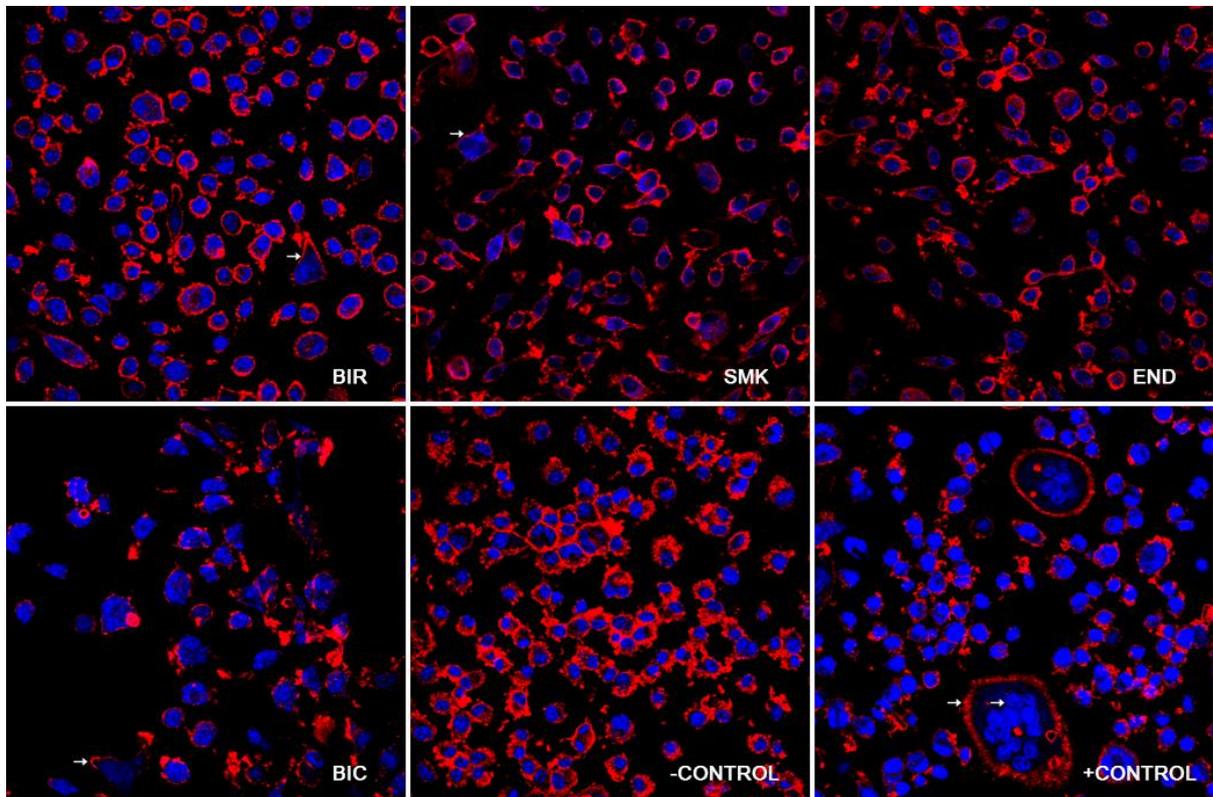
Tabela 4. Médias e desvio padrão referentes ao TRAP para as diferentes diluições dos cimentos biocerâmicos, e comparação com os grupos controle (negativo e positivo)³

Cimentos biocerâmicos	Controle		Número de osteoclastos			
	Negativo (α -MEM)	Positivo (RANKL)	1:20	1:100	1:500	1:2500
SMK	0,00 (0,00) Ec	131,33 (10,39) Aa	34,33 (3,72) Aby	22,33 (3,50) Dby	84,83 (7,94) Ab β	101,83 (10,61) Aba
BIR	0,00 (0,00) Ec	131,33 (10,39) Aa	27,67 (5,61) Bb β	86,83 (8,08) Aba	83,50 (8,41) Aba	79,50 (7,77) Bba
END	0,00 (0,00) Ec	131,33 (10,39) Aa	19,17 (4,67) Aby	46,83 (11,05) Bb β	81,33 (6,19) Aba	92,17 (16,17) ABba
BIC	0,00 (0,00) Ec	131,33 (10,39) Aa	10,67 (4,37) ACb β	31,00 (4,65) Cba	32,00 (3,16) Bba	34,33 (3,72) Cba

³Letras maiúsculas diferentes (A/B/C) representam diferença estatística entre colunas (cimentos variados na mesma diluição), sendo que letras minúsculas diferentes (a/b/c) representam diferença entre linhas quando se comparou as diluições com o controle; Já os símbolos diferentes ($\alpha/\beta/\gamma$) representam diferença estatística entre as diluições para o mesmo cimento.

A formação de osteoclastos viáveis foi confirmada de forma qualitativa por meio da formação de uma banda de actina e no seu interior múltiplos núcleos conforme as setas apresentadas na Figura 3. É possível verificar no controle positivo (RANK-L) células osteoclásticas mais diferenciadas quando comparado às células que entraram em contato com o estrato de cimento biocerâmico previamente, e em contrapartida, o grupo controle negativo (M-CSF) mostrou um padrão celular mononucleado e com células sem presença de diferenciação. Esse aspecto se mostrou semelhante em todos os cimentos testados.

Figura 3 - Imagens de anéis de actina obtidos em imunofluorescência após 5 dias de tratamento das células



Fonte: O autor.

4. DISCUSSÃO

Este estudo abordou o comportamento das células osteoclásticas na presença de estratos de cimentos endodônticos biocerâmicos em diferentes diluições (1:20, 1:100, 1:500, 1:2500). Este tipo de análise segue as recomendações internacionais para análise da citotoxicidade de cimentos endodônticos, de acordo com ISO 10993-5 (Organization, 2009). Além disso, é importante considerar que a diluição do cimento

é extremamente importante na avaliação *in vitro*, pois, quando não diluído, o material pode induzir a morte celular (Mestieri *et al.*, 2015). Para os ensaios de viabilidade foram utilizadas células precursoras não diferenciadas provenientes da medula óssea de camundongos. Estudos prévios também utilizaram células não induzidas para análise da viabilidade de biomateriais (Rodrigues *et al.*, 2013; Mestieri *et al.*, 2015). No entanto, é preciso realçar que não existe consenso quanto a escolha de culturas primárias ou linhagens celulares imortalizadas como modelo (Honegger, 2001; Martinho *et al.*, 2018) mais adequado para estudo de biomateriais. O uso de células imortalizadas para estudos de osteoclastogênese em virtude do seu perfil de diferenciação previsível, com mudanças fenotípicas esperadas (Giacomino *et al.*, 2019) tem sido empregado. Porém, o uso de BMMs estimuladas por M-CSF, também representa um modelo apropriado por proporcionar a obtenção de um grande número de precursores osteoclásticos, que mediante estímulo com RANKL expressam receptores TRAP e calcitonina (Quinn *et al.*, 2002; Kartsogiannis e Ng, 2004; Ng *et al.*, 2018).

A viabilidade foi apresentada em três tempos, pois, apesar das limitações de um estudo *in vitro*, o desempenho clínico de um cimento endodôntico se dá pela diminuição dos agentes citotóxicos após a presa, tornando o material inerte para os tecidos periapicais. Tal mecanismo de redução da citotoxicidade dos cimentos se deve também pelo fato do organismo possuir células de defesa agindo no periápice, como leucócitos e células polimorfonucleares, células plasmáticas e macrófagos que agem na eliminação de agentes agressores (Camps e About, 2003). No entanto, a análise de viabilidade em modelos celulares se dá de forma limitada, pois, as culturas celulares não são homeostáticas e, portanto, não apresentam eliminação de substâncias tóxicas (Güven *et al.*, 2013). Essa constatação pode estar diretamente relacionada aos resultados obtidos no presente trabalho, em que a viabilidade celular em geral reduziu de forma gradual, já que neste modelo não existe o mesmo mecanismo de remoção dos componentes citotóxicos apresentados *in vivo*.

Em relação ao ensaio de viabilidade esperava-se que os diferentes tipos de cimentos biocerâmicos não apresentassem diferenças entre si em relação a viabilidade celular, pois segundo a bula dos fabricantes os componentes presentes são similares. De fato, não houve diferença na viabilidade celular nos tempos iniciais de contato com os cimentos (12 e 24 horas), porém, o comportamento dos cimentos no tempo de 48 horas foi variável, tanto em relação a diluição como comparando os

cimentos entre si. Tal fato provavelmente indica diferentes porcentagens dos componentes dos cimentos no meio de cultura ao longo do tempo, influenciando na viabilidade com uma tendência para um melhor comportamento das células cultivadas em contato com os extratos de END e BIR. Estes dois cimentos apresentam sua composição e desempenho biológico amplamente amparados na literatura atual (Siboni *et al.*, 2017; Chybowski *et al.*, 2018; Vouzara *et al.*, 2018; Giacomino *et al.*, 2019). Para análise deste parâmetro foi utilizado o método MTT Formazan, o qual é um dos mais empregados para determinação de citotoxicidade. Este baseia-se na mensuração do metabolismo celular mediante uma reação catalisada pela enzima succinato desidrogenase (Jung *et al.*, 2015), consistindo na conversão do sal de tetrazólio amarelo em cristais azul-escuro de formazan através da atividade mitocondrial das células (Silva *et al.*, 2015). Comparado a outros ensaios de viabilidade, ele é apresentado de forma simples, rápida, precisa, sensível e factível (Sepet *et al.*, 2009).

No cotidiano clínico, é possível que os cimentos sejam extruídos além do ápice radicular e conseqüentemente entrem em contato com os tecidos periapicais influenciando no padrão de osteoclastogênese. Este extravasamento pode ocorrer também de forma intencional, devido a bioatividade dos cimentos biocerâmicos, objetivando favorecer o reparo da região periapical (Parirokh e Torabinejad, 2010a; b). Portanto, um cimento que seja capaz de reduzir o processo de osteoclastogênese é potencialmente interessante pois poderia atuar inibindo um processo de reabsorção periapical já instalado, resultando numa mudança do balanço neoformação-reabsorção. Para a simulação do efeito dos cimentos na osteoclastogênese as BMMs foram induzidas com RANKL, conforme preconizado em outros estudos (Reis *et al.*, 2018; Soares *et al.*, 2019). Durante o processo de diferenciação dessas células, é possível determinar a expressão de atividade de fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP), devido à sua alta expressão pelos osteoclastos (Datta *et al.*, 2008; Vaananen e Laitala-Leinonen, 2008).

A contagem de células TRAP-positivas em BMMs não diferenciadas (controle negativo), diferenciadas sem tratamento (controle positivo) e diferenciadas e tratadas com os extratos dos cimentos, permite comparar o potencial inibidor entre os grupos e em relação aos controles. Devido ao fato de pertencerem a mesma classe de cimentos classificados como biocerâmicos, a hipótese nula testada é de que não haveria diferença entre eles. Porém a mesma foi negada, pois os grupos testados

apresentaram diferenças estatísticas significantes durante o processo de osteoclastogênese nos ensaios *in vitro*. De forma geral, todos os grupos testados apresentaram diferenças significantes quando comparados ao grupo controle positivo, sendo o grupo BIC o que apresentou menores números de células clásticas e SMK o maior número. Tal fato põe em cheque a composição de SMK e reforça BIC como um cimento bastante interessante, pois foi lançado comercialmente há menos de dois anos e possui baixo custo quando comparado aos cimentos internacionais mais estudados no campo dos biocerâmicos como END e BIR, com resultados *in vitro* bastante favoráveis (Lopez-Garcia *et al.*, 2019; Torres *et al.*, 2019; Zordan-Bronzel *et al.*, 2019). No entanto são necessários mais estudos avaliando END quanto a diversos parâmetros como composição inicial e pós presa, solubilidade, e reatividade pois a despeito dos excelentes resultados apresentados no parâmetro inibição da osteoclastogênese, os cimentos internacionais apresentarem um melhor desempenho quanto a viabilidade celular, possibilitando assim inferir que a osteoclastogênese não está diretamente ligada à essa viabilidade celular. É importante também enfatizar pelos resultados obtidos que todos os cimentos inibiram a osteoclastogênese, sendo as diluições de 1:20 as mais favoráveis, o que poderia ser explicado por conta do maior potencial de ação do cimento frente à menores diluições como anteriormente citado (Martins *et al.*, 2015).

A determinação da imunofluorescência visa avaliar as células osteoclásticas funcionais pela localização dos anéis de actina. Esses são responsáveis pela verificação da ativação dos osteoclastos por meio da atividade da protease catepsina K – sendo essa essencial ao início da formação do anel de actina, e consequentemente verificação da disponibilidade de células osteoclásticas no meio de cultura (Reis *et al.*, 2018). Mesmo diante das limitações encontradas no presente estudo, é possível avaliar a presença de anéis de actina de forma qualitativa na concentração de 1:20 de cimentos biocerâmicos, o que confirma sua diferenciação a partir de células BMMs. Análises com outros marcadores relacionados a diferenciação e atividade clástica podem ajudar a enriquecer os dados desta pesquisa e são sugeridos para os próximos estudos.

5. CONCLUSÃO

Apesar das limitações encontradas, é possível concluir todos os grupos apresentaram redução da viabilidade celular pelo ensaio MTT Formazan comparado com o grupo controle (α -MEM) no período de 48 horas. O cimento biocerâmico END representa o material com menor citotoxicidade celular. Todos os cimentos testados inibiram a osteoclastogênese, sendo os grupos BIC o com menor quantidade de células clásticas e SMK com maior contagem.

REFERÊNCIAS

BERNARDES, T. **Quis Mudar. Recomeçar.** MUSIC, S. 2017.

BOSIO, C. C. et al. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. **Int Endod J**, v. 47, n. 7, p. 667-74, Jul 2014. ISSN 1365-2591 (Electronic) 0143-2885 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25057520> >.

BUENO, C. R. et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of bioceramic-, epoxy-, and calcium hydroxide-based sealers. **Braz Oral Res**, v. 30, n. 1, Jun 14 2016. ISSN 1807-3107 (Electronic) 1806-8324 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27305513> >.

CAMPS, J.; ABOUT, I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. **J Endod**, v. 29, n. 9, p. 583-6, Sep 2003. ISSN 0099-2399 (Print) 0099-2399 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14503832> >.

CHAKAR, S. et al. Cytotoxic evaluation of a new ceramic-based root canal sealer on human fibroblasts. **Eur J Dent**, v. 11, n. 2, p. 141-148, Apr-Jun 2017. ISSN 1305-7456 (Print). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28729783> >.

CHANG, S. W. et al. In vitro biocompatibility, inflammatory response, and osteogenic potential of 4 root canal sealers: Sealapex, Sankin apatite root sealer, MTA Fillapex, and iRoot SP root canal sealer. **J Endod**, v. 40, n. 10, p. 1642-8, Oct 2014. ISSN 1878-3554 (Electronic) 0099-2399 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260738> >.

CHYBOWSKI, E. A. et al. Clinical Outcome of Non-Surgical Root Canal Treatment Using a Single-cone Technique with Endosequence Bioceramic Sealer: A Retrospective Analysis. **J Endod**, v. 44, n. 6, p. 941-945, Jun 2018. ISSN 1878-3554 (Electronic) 0099-2399 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29606401> >.

COSTA-RODRIGUES, J.; FERNANDES, A.; FERNANDES, M. H. Reciprocal osteoblastic and osteoclastic modulation in co-cultured MG63 osteosarcoma cells and human osteoclast precursors. **J Cell Biochem**, v. 112, n. 12, p. 3704-13, Dec 2011. ISSN 1097-4644 (Electronic) 0730-2312 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21815187> >.

DATTA, H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **J Clin Pathol**, v. 61, n. 5, p. 577-87, May 2008. ISSN 1472-4146 (Electronic) 0021-9746 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18441154> >.

FIGUEIREDO, J. A. et al. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. **Int Endod J**, v. 34, n. 5, p. 377-85, Jul 2001. ISSN 0143-2885 (Print)

0143-2885 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11482721> >.

GIACOMINO, C. M. et al. Comparative Biocompatibility and Osteogenic Potential of Two Bioceramic Sealers. **J Endod**, v. 45, n. 1, p. 51-56, Jan 2019. ISSN 1878-3554 (Electronic)

0099-2399 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30558798> >.

GOLDBERG, F. et al. Relationship between unintentional overfilling and the long-term outcome of primary root canal treatments and non-surgical retreatment: a retrospective radiographic assessment. **Int Endod J**, Aug 27 2019. ISSN 1365-2591 (Electronic)

0143-2885 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31454090> >.

GUVEN, E. P. et al. In vitro comparison of induction capacity and biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and a bioceramic root canal sealer. **Int Endod J**, v. 46, n. 12, p. 1173-82, Dec 2013. ISSN 1365-2591 (Electronic)

0143-2885 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23617276> >.

HONEGGER, P. Overview of cell and tissue culture techniques. **Curr Protoc Pharmacol**, v. Chapter 12, p. Unit12 1, May 2001. ISSN 1934-8290 (Electronic)

1934-8282 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21965066> >.

JUNG, J. Y. et al. Effect of Biodentine and Bioaggregate on odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp cells. **Int Endod J**, v. 48, n. 2, p. 177-84, Feb 2015. ISSN 1365-2591 (Electronic)

0143-2885 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24738842> >.

KARTSOGIANNIS, V.; NG, K. W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. **Mol Cell Endocrinol**, v. 228, n. 1-2, p. 79-102, Dec 30 2004. ISSN 0303-7207 (Print)

0303-7207 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541574> >.

LOPEZ-GARCIA, S. et al. Comparative Cytocompatibility and Mineralization Potential of Bio-C Sealer and TotalFill BC Sealer. **Materials (Basel)**, v. 12, n. 19, Sep 22 2019. ISSN 1996-1944 (Print)

1996-1944 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31546696> >.

MARTINHO, F. C. et al. Comparison of cytotoxicity, genotoxicity and immunological inflammatory biomarker activity of several endodontic sealers against immortalized human pulp cells. **Int Endod J**, v. 51, n. 1, p. 41-57, Jan 2018. ISSN 1365-2591 (Electronic)

0143-2885 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28439952> >.

MARTINS, C. A. et al. Curcumin in Combination with Piperine Suppresses Osteoclastogenesis In Vitro. **J Endod**, v. 41, n. 10, p. 1638-45, Oct 2015. ISSN 1878-3554 (Electronic)

0099-2399 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26300429> >.

MESTIERI, L. B. et al. Biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based endodontic sealers in human dental pulp cells. **J Appl Oral Sci**, v. 23, n. 5, p. 467-71, Oct 2015. ISSN 1678-7765 (Electronic)

1678-7757 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26537716> >.

NG, A. Y. et al. Comparative Characterization of Osteoclasts Derived From Murine Bone Marrow Macrophages and RAW 264.7 Cells Using Quantitative Proteomics. **JBMR Plus**, v. 2, n. 6, p. 328-340, Nov 2018. ISSN 2473-4039 (Electronic)

2473-4039 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30460336> >.

ORGANIZATION, I. S. ISO 10993-5: 2009. Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. **J Endod**, v. 36, n. 1, p. 16-27, Jan 2010a. ISSN 1878-3554 (Electronic)

0099-2399 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003930> >.

_____. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. **J Endod**, v. 36, n. 3, p. 400-13, Mar 2010b. ISSN 1878-3554 (Electronic)

0099-2399 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171353> >.

PRATI, C.; GANDOLFI, M. G. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. **Dent Mater**, v. 31, n. 4, p. 351-70, Apr 2015. ISSN 1879-0097 (Electronic)

0109-5641 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25662204> >.

QUINN, J. M. et al. The generation of highly enriched osteoclast-lineage cell populations. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 164-70, Jan 2002. ISSN 8756-3282 (Print)

1873-2763 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792580> >.

REIS, M. V. P. et al. Effects of Lectin (ScLL) on osteoclast-like multinucleated giant cells' maturation-A preliminary in vitro study. **Dent Traumatol**, v. 34, n. 5, p. 329-335, Oct 2018. ISSN 1600-9657 (Electronic)

1600-4469 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29856524> >.

RICUCCI, D.; LANGE LAND, K. Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 2. A histological study. **Int Endod J**, v. 31, n. 6, p. 394-409, Nov 1998. ISSN 0143-2885 (Print)

0143-2885 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15551607> >.

RICUCCI, D. et al. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 112, n. 6, p. 825-42, Dec 2011. ISSN 1528-395X (Electronic)

1079-2104 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22099859> >.

RODRIGUES, C. et al. Long-term dose- and time-dependent effects of endodontic sealers in human in vitro osteoclastogenesis. **J Endod**, v. 39, n. 6, p. 833-8, Jun 2013. ISSN 1878-3554 (Electronic)

0099-2399 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23683288> >.

SCHAEFFER, M. A.; WHITE, R. R.; WALTON, R. E. Determining the optimal obturation length: a meta-analysis of literature. **J Endod**, v. 31, n. 4, p. 271-4, Apr 2005. ISSN 0099-2399 (Print)

0099-2399 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15793382> >.

SEPET, E. et al. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. **Quintessence Int**, v. 40, n. 8, p. e55-61, Sep 2009. ISSN 1936-7163 (Electronic)

0033-6572 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19639083> >.

SHON, W. J. et al. Effects of calcium phosphate endodontic sealers on the behavior of human periodontal ligament fibroblasts and MG63 osteoblast-like cells. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 100, n. 8, p. 2141-7, Nov 2012. ISSN 1552-4981 (Electronic)

1552-4973 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848036> >.

SIBONI, F. et al. Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. **Int Endod J**, v. 50 Suppl 2, p. e120-e136, Dec 2017. ISSN 1365-2591 (Electronic)

0143-2885 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28881478> >.

SILVA, E. J. et al. Cytotoxicity and gelatinolytic activity of a new silicon-based endodontic sealer. **J Appl Biomater Funct Mater**, v. 13, n. 4, p. e376-80, Dec 18 2015. ISSN 2280-8000 (Electronic)

2280-8000 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26391870> >.

SJOGREN, U. et al. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. **J Endod**, v. 16, n. 10, p. 498-504, Oct 1990. ISSN 0099-2399 (Print)

0099-2399 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2084204> >.

SOARES, M. P. R. et al. The use of apocynin inhibits osteoclastogenesis. **Cell Biol Int**, v. 43, n. 5, p. 466-475, May 2019. ISSN 1095-8355 (Electronic)

1065-6995 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30761659> >.

SOUZA, G. L. et al. Evaluation of apoptosis/necrosis and cytokine release provoked by three root canal sealers in human polymorphonuclears and monocytes. **Int Endod J**, v. 52, n. 5, p. 629-638, May 2019. ISSN 1365-2591 (Electronic)

0143-2885 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30388307> >.

STANDARDIZATION, I. O. F. Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. v. Third edition, n. ISO 10993-5, 2009.

TORRES, F. F. E. et al. 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. **Int Endod J**, Sep 30 2019. ISSN 1365-2591 (Electronic)

0143-2885 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31566768> >.

UTNEJA, S. et al. Current perspectives of bio-ceramic technology in endodontics: calcium enriched mixture cement - review of its composition, properties and applications. **Restor Dent Endod**, v. 40, n. 1, p. 1-13, Feb 2015. ISSN 2234-7658 (Print)

2234-7658 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25671207> >.

VAANANEN, H. K.; LAITALA-LEINONEN, T. Osteoclast lineage and function. **Arch Biochem Biophys**, v. 473, n. 2, p. 132-8, May 15 2008. ISSN 1096-0384 (Electronic)

0003-9861 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18424258> >.

VOUZARA, T. et al. Cytotoxicity of a New Calcium Silicate Endodontic Sealer. **J Endod**, v. 44, n. 5, p. 849-852, May 2018. ISSN 1878-3554 (Electronic)

0099-2399 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29550005> >.

ZHANG, H. et al. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, v. 35, n. 7, p. 1051-5, Jul 2009. ISSN 1878-3554 (Electronic)

0099-2399 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19567333> >.

ZORDAN-BRONZEL, C. L. et al. Evaluation of Physicochemical Properties of a New Calcium Silicate-based Sealer, Bio-C Sealer. **J Endod**, v. 45, n. 10, p. 1248-1252, Oct 2019. ISSN 1878-3554 (Electronic)

0099-2399 (Linking). Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31447172> >.