

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/02/2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” FACULDADE DE MEDICINA

Kamila Sauer Veiga Leme

Efeitos toxicogenômicos do MTA Fillapex® em
fibroblastos humanos *in vitro*

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, área
Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori
Coorientador: Prof. Dr. João Paulo de Castro Marcondes

**Botucatu
2020**

Kamila Sauer Veiga Leme

Efeitos toxicogenômicos do MTA Fillapex® em
fibroblastos humanos *in vitro*

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências, área Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori
Coorientador: Prof. Dr. João Paulo de Castro Marcondes

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Leme, Kamila Sauer Veiga.

Efeitos toxicogenômicos do MTA Fillapex em fibroblastos humanos in vitro / Kamila Sauer Veiga Leme. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientador: João Paulo de Castro Marcondes

Capes: 40105008

1. Toxicologia genética. 2. Citotoxicidade.
3. Fibroblastos. 4. Técnicas in vitro.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Genotoxicidade; MTA Fillapex; Toxicogenômica.

Dedicatória

Ao Senhor Jesus,

Toda honra, toda glória, todo louvor! Obrigada Senhor, pela força, determinação, sabedoria, inteligência, saúde e paz! Obrigada pelas pessoas preciosas que o Senhor colocou em minha vida! Obrigada pelas chuvas de bênçãos todos os dias! Sem o Senhor nada disso seria possível! Louvores ao Deus da minha salvação! Amém!

Ao meu amado marido Osni,

Obrigada meu amor pelo cuidado, carinho, atenção, paciência, companheirismo e amor, muito amor todos esses anos! Você é meu anjo, minha joia rara que o Senhor preparou para mim! Amo muito você! E sempre o amarei! Obrigada por fazer parte da minha vida!

Aos meus pais Ivone e Jarbas,

Meus queridos pais, obrigada pela vida, pelo amor, cuidado, carinho, ensinamentos, paciência e orações! Obrigada por me fazerem a pessoa que sou hoje! Obrigada por me ensinarem sobre dedicação, força, determinação, humildade e por me ensinarem a acreditar e lutar pelos meus sonhos! Amo muito vocês! Muito obrigada pela vida que me deram!

Aos meus irmãos Carol e Julinho,

Obrigada meus amores! Obrigada pelo carinho, paciência, cuidado e amor que vocês sempre me deram! Obrigada por torcerem por mim e sempre acreditarem em mim! Agradeço a Deus todos os dias por me dar irmãos tão preciosos! Amo muito vocês! Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Aos meus sogros Clarice e Osni,

Obrigada meus queridos! Obrigada pelo amor e carinho que sempre me deram! Obrigada por torcerem por mim e pelas incansáveis orações! Amo muito vocês!

Agradecimentos

À minha querida orientadora **Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori**, pelo carinho, atenção e ensinamentos de vida e estudos! Obrigada por me aceitar como sua aluna e por sempre estar pronta a me ouvir e orientar! Obrigada pela paciência, confiança e pela amizade!

Ao meu coorientador **Dr. João Paulo de Castro Marcondes**, pela atenção, ensinamentos e amizade! Muito obrigada!

À minha grande amiga **Elaine Aparecida de Camargo**, pela dedicação em me ajudar, pelos ensinamentos, pela paciência, pela amizade! Obrigada E, por todo carinho e atenção!

Aos meus queridos amigos do OMICS, **Fábio Fernandes, Phillipe Franklin, Leonardo Menezes, Amanda Tanamachi, André Sávio**; e do GENOTOX, **Juliana Lara, Drielle Figueiredo, Aline Aun, Kátina Meneghetti** pelos ensinamentos, pela amizade, pela atenção, pela paciência e pelo carinho que vocês me deram! Esse trabalho também é de vocês! Agradeço muito a todos!

À **Dra. Márcia Guimarães**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação da Patologia, pelo carinho, atenção e ensinamentos! Muito obrigada professora!

À **Vânia Soler**, secretaria do Programa de Pós-Graduação da Patologia, pela atenção e carinho! Obrigada Vânia!

Às meninas do laboratório de Cultura Celular, **Vicky e Paulinha**, obrigada pela paciência, pelas orientações e amizade!

À **Maria Regina Moretto**, pelas leituras das placas de citotoxicidade e pela amizade! Obrigada!

À **Eloísa Elena Paschoalinotte**, pela atenção e carinho com minhas análises estatísticas. Obrigada!

Aos funcionários da UNIPEX, pela atenção e carinho! Obrigada!

À **Dra. Mariana Gobbo Braz**, pela atenção, amizade e disponibilidade! Obrigada!

Ao **Dr. Carlos Alberto de Souza Costa** e sua aluna **Taisa Pansani** pela doação das células e atenção! Muito obrigada!

Ao **Dr. Fábio Tobias Perassi** pelos ensinamentos, amizade e carinho! Obrigada!

À **Dra. Eliana Miniccuci** pela atenção e disponibilidade! Obrigada!

À todos meus familiares e amigos que estiveram orando e torcendo por mim! Muito obrigada!

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro.

Epígrafe

“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam.”

1 Coríntios 2.9

Sumário

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>I</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</u>	<u>III</u>
<u>RESUMO</u>	<u>IV</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>VI</u>
<u>CAPÍTULO I</u>	<u>13</u>
<u>1.REVISÃO DE LITERATURA</u>	<u>13</u>
1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	13
1.2 PROBLEMÁTICA DO ESTUDO	16
1.3. CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE	20
1.4 EFEITOS TOXICOGENÔMICOS DE MATERIAIS ODONTOLÓGICOS E FERRAMENTAS DE AVALIAÇÃO	23
<u>2. OBJETIVOS</u>	<u>28</u>
2.1 OBJETIVOS GERAIS	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
<u>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>29</u>
<u>CAPÍTULO II</u>	<u>37</u>
<u>RESUMO</u>	<u>38</u>
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>39</u>
<u>2. MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>40</u>
2.1 LINHAGEM CELULAR E COMPOSTO TESTE	40
2.2 CITOTOXICIDADE E SOBREVIVÊNCIA CELULAR	42
2.3 CICLO CELULAR E APOPTOSE	43
2.4 TESTE DO COMETA	43
2.5 EXPRESSÃO GÊNICA POR QRT-PCR	45
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
<u>3. RESULTADOS</u>	<u>46</u>

3.1 CITOTOXICIDADE	46
3.2 SOBREVIVÊNCIA CELULAR	47
3.3 CITOMETRIA DE FLUXO	48
3.3.1 CICLO CELULAR	48
3.3.2 MORTE CELULAR	49
3.4 GENOTOXICIDADE	51
3.5 EXPRESSÃO GÊNICA	52
<u>4. DISCUSSÃO</u>	<u>54</u>
<u>5. CONCLUSÃO</u>	<u>56</u>
<u>AGRADECIMENTOS</u>	<u>57</u>
<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>57</u>
<u>ANEXO</u>	<u>63</u>

Lista de Figuras

Capítulo I

- Figura 1:** Imagem ilustrativa das partes do dente e regiões vizinhas.....14
- Figura 2.** A: Imagem ilustrativa da progressão da cárie e lesão periapical com indicação de tratamento endodôntico; B. radiografia periapical: do lado esquerdo, dente com lesão periapical sem tratamento; do lado direito, dente com tratamento de canal concluído, com extravasamento do cimento obturador pelo ápice.....14
- Figura 3:** Tipos de cimentos endodônticos. A) AH Plus; B) Sealapex; C) BioRoot RCS; D) MTA Fillapex.....16
- Figura 4:** Ilustração das aplicações clínicas do cimento MTA.....17
- Figura 5:** Ilustração simplificada das fases do ciclo celular. (CP – *checkpoints*)..21

Capítulo II

- Figura 1.** Viabilidade celular em cultura de fibroblastos gengivais humanos tratados com o cimento MTA Fillapex®. C-: controle negativo (células sem tratamento). * $p < 0,05$ em relação ao C-. D.O.; Densidade óptica.....46
- Figura 2:** Viabilidade celular em cultura de fibroblastos gengivais humanos 5 dias após o tratamento com o cimento MTA Fillapex®. C-: controle negativo (células sem tratamento). * $p < 0,001$ em relação ao C-. D.O.; Densidade óptica.....47
- Figura 3:** Ciclo celular de fibroblastos gengivais humanos tratados *in vitro* com o cimento MTA Fillapex®. Gráficos gerados por citometria de fluxo mostrando as fases G1, S e G2.....48

Figura 4: Frequência de fibroblastos gengivais humanos nas respectivas fases do ciclo celular após tratamento com o MTA Fillapex®. * $p < 0,001$ em relação ao controle negativo (C-).	49
Figura 5: Porcentagem de células viáveis (quadrante inferior esquerdo), apoptose inicial (quadrante inferior direito), apoptose tardia (quadrante superior direito) e necrose (quadrante superior esquerdo) em cultura de fibroblastos gengivais humanos expostos ao cimento MTA Fillapex®. C-: controle negativo (células sem tratamento).	50
Figura 6: Porcentagem de células viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia e de necrose em cultura de fibroblastos gengivais humanos expostos ao cimento MTA Fillapex®. C-: controle negativo (células sem tratamento). * $p < 0,05$ em relação ao C-.	51
Figura 7: Danos no DNA (<i>tail intensity</i>) em fibroblastos gengivais humanos tratados com o cimento MTA Fillapex®. C-: controle negativo (células sem nenhum tratamento); C+: controle positivo (células tratadas com H_2O_2 ; 100 μ M). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (em relação ao controle negativo).	52
Figura 8: Níveis de expressão (RQ – quantificação relativa) dos genes <i>TP53</i> , <i>BAX</i> e <i>BCL-2</i> em fibroblastos gengivais humanos tratados com o cimento MTA Fillapex®. C-: controle negativo. * $p < 0,05$ (em relação ao C-).	53

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADA	<i>American Dental Association</i>
APAF-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor -1</i>
APCD	Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas
BAX	<i>BCL-2 Associated X (gene apoptótico)</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2 (gene anti-apoptótico)</i>
BISGMA	Bisfenol-A glicidil metacrilato
Ca ²⁺	íon Cálcio
CDC25A	<i>Cell Division Cycle 25A</i>
Cdk	<i>Cyclin - dependent Kinases</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
CKIs	<i>Cyclin- dependente kinases inhibitors</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
E2F	Fator de transcrição do ciclo celular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAS	Receptor da família do fator de necrose tumoral
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FGH	Fibroblastos Gengivais Humano
G1	<i>Gap1</i> (primeira fase da intérfase do ciclo celular)
G2	<i>Gap2</i> (terceira fase da intérfase do ciclo celular)
M	<i>Mitosis</i>
MTA	Mineral Trióxido Agregado
NIH/3T3	Células de Fibroblastos Musculares de Rato
PUMA, NOXA, BIM	<i>proteínas membros 'BH3-only' da família BCL-2</i>
p53	<i>proteína 53</i> (proteína codificada pelo gene <i>TP53</i>)
qRT-PCR	Quantificação da transcrição reversa pela reação em cadeia da polimerase
Rb	<i>Retinoblastoma</i>
SAOS-2	<i>Sarcoma Osteogenic -2</i> (células de osteosarcoma)
Sbendo	Sociedade Brasileira de Endodontia
S	<i>Synthesis</i> (segunda fase da intérfase do ciclo celular)
SSB	<i>single-strand breaks</i>
TEGDMA	Trietileno glicol dimetacrilato
TNFR1	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor1</i>
TP53	<i>Tumor Protein 53</i> (gene)

Resumo

A odontologia sempre preconizou o uso de materiais biocompatíveis para não causar agressão aos tecidos sadios adjacentes. Um dos materiais mais utilizados na endodontia é o cimento endodôntico para obturação, utilizado juntamente à guta-percha para preenchimento dos canais radiculares. No entanto, compostos presentes na fórmula de alguns cimentos podem apresentar efeitos tóxicos desde o momento em que foram inseridos, até meses ou anos após o tratamento. Um dos cimentos produzidos com o objetivo de ser biologicamente compatível e com propriedades físico-químicas adequadas foi o Mineral Trióxido Agregado Fillapex (MTA Fillapex®), que foi desenvolvido a partir do cimento Mineral Trióxido Agregado (MTA), o qual possui as propriedades biológicas desejadas. Considerando os resultados divergentes sobre a citotoxicidade do MTA Fillapex®, o presente estudo teve como objetivo investigar, *in vitro*, os efeitos citotóxicos e toxicogenômicos desse composto em linhagem celular de fibroblastos humanos gengivais. Para tanto, foram avaliados a sobrevivência e ciclo celular, os níveis de apoptose e necrose, o potencial genotóxico (teste do cometa) e o padrão de expressão (qRT-PCR) de genes relacionados à apoptose e proliferação celular (*BCL-2*, *BAX* e *TP53*). Os resultados mostraram efeito citotóxico significativo do cimento nas concentrações 20% e 40%, muito embora apenas na concentração mais alta o efeito persistiu por até 5 dias após o tratamento das células (teste de sobrevivência). Por outro lado, o MTA Fillapex® apresentou efeito genotóxico em concentrações menores, de 5% e 20%, e efeito toxicogenômico, modulando a expressão dos genes *BCL-2*, *BAX* e *TP53*, na concentração de 20%. Além disso, foram observadas alterações na cinética do ciclo celular em todas as fases e taxas de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose na concentração de 40% e apoptose inicial na de 20% em comparação ao grupo controle. Concluindo, o cimento MTA Fillapex® apresentou potencial citotóxico e toxicogenômico em fibroblastos humanos gengivais *in vitro*, indicando a necessidade da realização de outros testes,

com diferentes desenhos experimentais, a fim de evitar riscos inerentes ao seu uso na odontologia.

Abstract

Dentistry has always advocated the use of biocompatible materials to avoid damage to adjacent healthy tissues. One of the most commonly used endodontic material is the endodontic cement, which is used together with gutta-percha to fill root canals after pulp tissue removal. However, compounds in the formula of some cement may have toxic effects from the time they were inserted to months or years after treatment. The Mineral Trioxide Aggregate Fillapex (MTA Fillapex®), which was developed from the Mineral Trioxide Aggregate (MTA) cement, is one of the biologically compatible cements with adequate physicochemical properties. Considering the divergent results about MTA Fillapex® toxicity, the present study aimed to investigate the *in vitro* cytotoxicity and toxicogenomic potential of this compound in human gingival fibroblasts cell line. Cell cycle and survival, apoptosis and necrosis rates, genotoxicity (comet assay) and gene expression profiling (*BCL-2*, *BAX*, *TP53*) were evaluated. The results showed significant cytotoxicity of the cement at concentrations 20% and 40%, although only the effect induced at the highest concentration persisted 5 days after cell treatment (survival test). MTA Fillapex® genotoxicity was observed for treatments at concentrations of 5% and 20% and toxicogenomic effects on *BCL-2*, *BAX* and *TP53* genes were detected at 20%. Changes in the cell cycle kinetics and in the rates of initial and late apoptosis and necrosis were observed at 40%. In conclusion, MTA Fillapex® presented cytotoxic and genotoxic effects, and also induced increased expression of genes related to apoptosis regulation.

Capítulo I

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Considerações iniciais

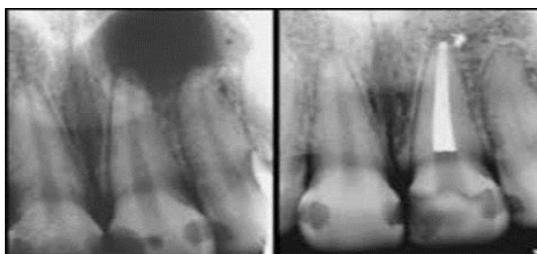
A odontologia é a ciência que estuda e trata as doenças relacionadas ao aparelho estomatognático, formado pela face, cavidade bucal e pescoço. Atualmente, a odontologia é subdividida em várias especialidades, dentre elas a endodontia. A endodontia (do grego “*En*” = dentro e “*Odus*” = dente) foi reconhecida como a oitava especialidade odontológica pela *American Dental Association* (ADA), em 1963. No Brasil, esse reconhecimento também aconteceu na década de 1960, porém, só em 2009 foi fundada a entidade representativa da área, a Sociedade Brasileira de Endodontia (Sbendo) (APCD, 2018). A endodontia abrange a etiologia, diagnóstico e terapêutica das doenças e lesões que afetam a polpa e a raiz dentária, bem como o tecido periapical (Figura 1). O principal objetivo do tratamento endodôntico (terapia do canal radicular) é remover a polpa, limpar e modelar o sistema de canais radiculares e, em seguida, preencher esse sistema de condutos endodônticos para prevenir a infecção e promover, quando necessário, a reparação perirradicular (Figuras 2A e 2B).



Figura 1: Imagem ilustrativa das partes do dente e regiões vizinhas



A



B

Figura 2. A: Imagem ilustrativa da progressão da cárie e lesão periapical com indicação de tratamento endodôntico; **B.** radiografia periapical: do lado esquerdo, dente com lesão periapical sem tratamento; do lado direito, dente com tratamento de canal concluído, com extravasamento do cimento obturador pelo ápice.

Há hoje no mercado vários instrumentos e materiais que tornaram mais seguros e eficientes os tratamentos endodônticos. Dentre esses, estão os cimentos obturadores utilizados para o selamento dos canais radiculares. A importância da escolha do cimento está no fato desses materiais possuírem a consistência de pasta fluida que escoam pelos canais e, em muitos casos, atingirem regiões periapicais, promovendo reparo ou dano, dependendo de seus componentes (Scelza et al., 2012; Chang et al., 2014; Wafai et al., 2017). Os cimentos podem apresentar-se como pasta-pasta ou pó-líquido e devem possuir características que compreendem estabilidade dimensional, facilidade de escoamento, baixa solubilidade, biocompatibilidade, radiopacidade, atividade antimicrobiana e adesão à dentina radicular (Silva Almeida et al., 2017).

Estão entre os cimentos utilizados atualmente, cimentos à base de resina epóxi (ex. AH Plus), cimentos à base de hidróxido de cálcio (ex. Sealapex), cimentos biocerâmicos (ex. EndoSequence BC e BioRoot), cimentos à base de MTA (ex. MTA Fillapex®), entre outros (Figura 3).



Figura 3: Tipos de cimentos endodônticos. A) AH Plus; B) Sealapex; C) BioRoot RCS; D) MTA Fillapex.

1.2 Problemática do estudo

O Mineral Trióxido Agregado (MTA), principal elemento do cimento MTA Fillapex®, foi introduzido na endodontia em 1993 pelo Professor Mahmoud Torabinejad e tem sido utilizado para procedimentos de retro obturação, perfuração radicular e de furca, em capeamento pulpar direto e também em dentes com raízes incompletas (Roberts et al., 2008) (Figura 4). O MTA foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda, Estados Unidos, e recebeu aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA) para uso em seres humanos em 1998 (Torabinejad et al., 1998).

O composto consiste de finas partículas hidrofílicas de silicato tricálcico, óxido de alumínio tricálcico, óxido tricálcico, sulfato de cálcio di-hidratado (*gypsum*) e outros óxidos minerais (Parirokh et al., 2010).

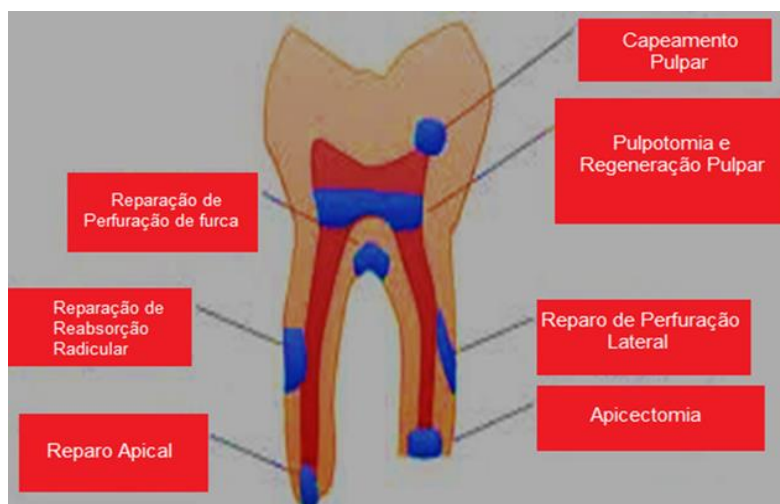


Figura 4: Ilustração das aplicações clínicas do cimento MTA.

Vários estudos têm demonstrado que o MTA promove reações favoráveis aos tecidos, especialmente pela ausência de resposta inflamatória severa, pela presença de cápsula fibrosa e pela indução da reparação do tecido mineralizado (Pitt et al., 1995; Bernabé et al., 2005). De fato, há estudos que mostram, por exemplo, que o MTA induz a diferenciação de osteoblastos (Nakayama et al., 2005; Gomes-Filho et al., 2008) e a estimulação da mineralização de células pulpare dentárias (Yasuda et al., 2008), sendo, portanto, eficaz para tratamentos odontológicos. No entanto, apesar dessas características, o MTA não possui todas as propriedades físicas necessárias para ser utilizado como um cimento obturador devido à dificuldade de manipulação e, principalmente, pelo tempo necessário entre o início do procedimento (aplicação do

cimento) até a completa presa no local, que ocorre em torno de 2h 45min (Grossman, 1988; Torabinejad et al., 1995).

Na tentativa de contornar as deficiências do MTA, as indústrias de produtos odontológicos têm procurado por materiais que combinam as propriedades biológicas às físico-químicas desejáveis dos cimentos endodônticos (Al-Hiyasat et al., 2010). Nesse sentido, foi produzido o MTA Fillapex®, cimento obturador com base no MTA, e que é comercializado na forma de duas pastas: a base e a catalisadora. De acordo com o fabricante, a pasta base contém resina salicilato, resina natural, tungstato de cálcio, sílica nanoparticulada e pigmentos, e a pasta catalisadora contém resina diluente, MTA, sílica nanoparticulada e pigmentos. Ainda segundo o fabricante (Angelus S/A), o cimento possui biocompatibilidade com os tecidos, a qual é garantida pelo MTA e pela resina de salicilato. Salles et al. (2012) afirmaram que o MTA Fillapex® representa o esforço em combinar um material com excelentes propriedades biológicas (o MTA) a resinas e outros compostos, a fim de melhorar a adesividade dentinária, estabilidade dimensional, radiopacidade, fluidez, além dos efeitos antibacterianos. De fato, foi demonstrado que o MTA Fillapex®, antes da sua completa presa, apresenta atividade antibacteriana contra o *E. faecalis*, não obstante esse efeito não tenha persistido sete dias após sua aplicação (Morgental et al., 2011).

Embora a prática venha demonstrando a eficácia do MTA Fillapex®, há estudos que mostram que o cimento possui potencial citotóxico. Segundo Bramante et al. (2008), a citotoxicidade do MTA Fillapex® estaria relacionada à presença da resina ou à liberação de arsênio, metal pesado que pode ser encontrado como contaminante do produto. Scelza et al. (2012) observaram efeitos citotóxicos de extratos de MTA

Fillapex® em cultura de osteoblastos 1 e 7 dias após o tratamento com o cimento. Da mesma forma, Bin et al. (2012) descreveram maior citotoxicidade do MTA Fillapex® quando comparado ao MTA, e aumento da frequência de micronúcleo (fragmentos cromossômicos resultantes de quebras) em fibroblastos de hamster chinês. Resultado semelhante foi encontrado por Yoshino et al. (2013) em células do ligamento periodontal, tendo o MTA Fillapex® apresentado maior citotoxicidade que o MTA branco. No entanto, outros autores demonstraram que o MTA Fillapex® induziu menor expressão de mediadores inflamatórios e maior diferenciação dos osteoblastos que o cimento Sealapex em células do ligamento periodontal (Chang et al., 2014). Outro estudo, comparando os efeitos dos cimentos MTA Fillapex®, Epiphany SE (Pentron) e do óxido de zinco e eugenol (ZOE) mostrou o efeito citotóxico de todos os compostos em células osteoblásticas humanas (SAOS-2), mas sete dias após a exposição, as células tratadas com o MTA Fillapex® apresentaram evidente recuperação da viabilidade (Salles et al., 2012). Contudo, estudo realizado com dois subtipos de macrófagos (M1 e M2) demonstrou ação deletéria do MTA Fillapex®, diminuindo a viabilidade e adesão celular e a habilidade fagocítica das células (Braga et al., 2015). Da mesma forma, a citotoxicidade do MTA Fillapex® foi também demonstrada pela diminuição da viabilidade de células do ligamento periodontal 168h após a exposição ao cimento (Collado-González et al., 2017). Mais recentemente, Vouzara et al. (2018) descreveram a maior citotoxicidade do MTA Fillapex® quando comparado ao silicato de tricálcico em fibroblastos de rato NIH/3T3. Além do efeito nocivo MTA Fillapex® *in vitro*, Bóscio et al. (2014) mostraram que esse cimento foi

citotóxico e estimulou reação inflamatória em tecido conjuntivo de ratos Wistar, persistindo por 90 dias.

Diante dos achados apresentados e levando-se em conta que os cimentos endodônticos ficam em íntimo contato com os tecidos periapicais por tempo prolongado, com a possibilidade de extravasarem através dos túbulos dentinários, canais laterais e acessórios ou forame apical, torna-se fundamental a elucidação do potencial toxicogenético desses compostos, a fim de reduzir os possíveis eventos nocivos aos pacientes (Silva et al., 2012).

1.3. Citotoxicidade e genotoxicidade

O ciclo celular é uma série complexa de eventos contínuos que culminam com a divisão das células em duas células idênticas (células somáticas). O ciclo celular é dividido em quatro fases principais - G1, S, G2 e M - as quais são controladas por várias proteínas, como as ciclinas D/Cdk4-6 e a E/Cdk2 que promovem a progressão da célula em G1 e a transição G1/S; a ativação da ciclina A/Cdk2, que assegura a progressão em S e G2; a ciclina B/Cdk1, cujo pico de atividade encaminha para a progressão da mitose (Santamaria et al., 2007). Além dessas, a fosfatase CDC25A, o fator de transcrição E2F, a proteína retinoblastoma (Rb) e as inibidoras das quinases dependentes de ciclinas (CKIs), como a p21 e p27, são também importantes para o desenvolvimento normal do ciclo celular (Qu et al., 2003).

Para que o processo de divisão celular ocorra de forma regular, evitando o acúmulo de alterações especialmente no DNA, existem alguns pontos de checagem (*checkpoints*) (Velez; Howard, 2015; Tubbs; Nussenzweig, 2017) (Figura 5).

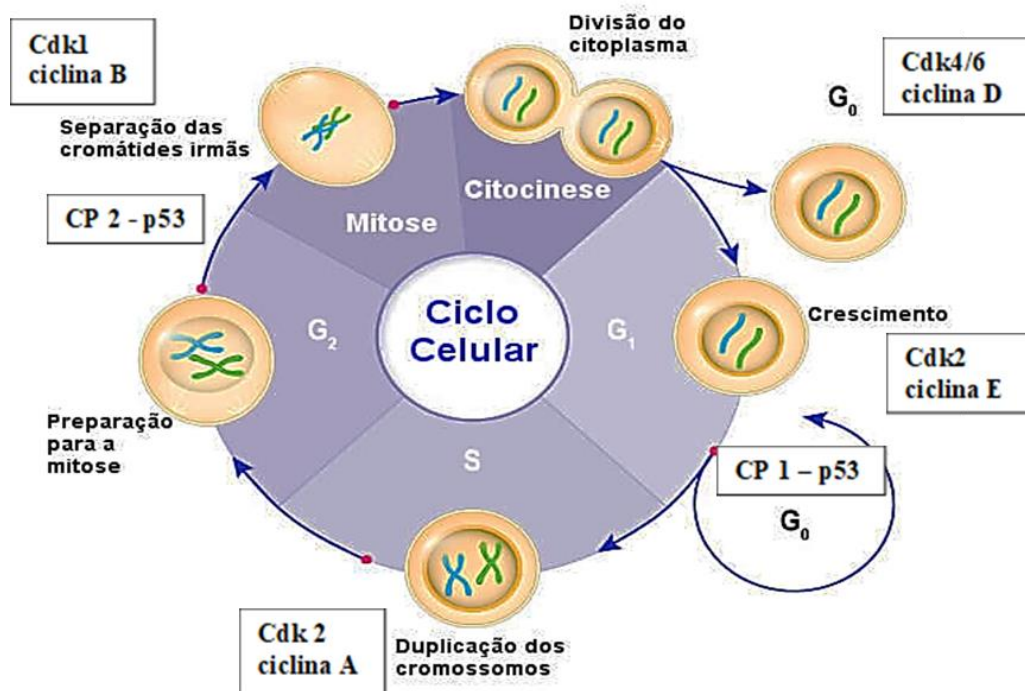


Figura 5: Ilustração simplificada das fases do ciclo celular. (CP – *checkpoints*).

Nesses, algumas proteínas têm papel central, como é o caso da p53, a qual tem função de bloquear o ciclo celular na transição das fases G₁/S e G₂/M, para que ocorra o reparo de lesões no DNA induzidas por agentes genotóxicos exógenos (químicos, físicos ou biológicos), endógenos (p. ex. estresse oxidativo), ou pela indução transcricional de proteínas pró-apoptóticas, incluindo a PUMA, NOXA e BAX (Hotchkiss et al., 2009). Em caso de insucesso no reparo das alterações genéticas,

alguns genes são ativados e direcionam a célula para morte programada ou apoptose. O gene *TP53*, que codifica a proteína p53, ficou, portanto, conhecido como “guardião do genoma” (Leslie; Zhang, 2016; Binayke et al., 2019).

Estudos com a proteína BCL-2, codificada pelo gene de mesmo nome (*BCL-2*), mostraram que os mecanismos de morte celular foram amplamente conservados durante a evolução dos animais, e que as translocações cromossômicas que ativam o gene estão associadas a doenças malignas nos seres humanos, uma vez que a proteína bloqueia a morte por apoptose, permitindo que a célula se divida carregando alterações no DNA. A família da proteína BCL-2 possui pelo menos 16 membros distribuídos em três grupos funcionais de acordo com a quantidade de domínios homólogos (BH) ao *BCL-2*. Dentre esses, está a proteína BAX, que diferentemente da BCL-2, possui atividade pró-apoptótica (Delbridge et al., 2016).

O processo de apoptose pode ocorrer por via intrínseca e/ou extrínseca. Na via intrínseca (ou mitocondrial), as principais proteínas envolvidas (BAX, PUMA e NOXA) são membros da família BCL-2 e são ativadas pela proteína p53 (Fisher, 2017), levando à despolarização das membranas mitocondriais, onde estão localizadas. Essa despolimerização libera citocromo c para o citoplasma, ativando APAF-1 (fator de ativação da protease apoptótica-1) e a cascata de caspases que irão induzir à formação dos corpos apoptóticos (Green; Kroemer, 2004). Na via extrínseca (ou via receptor de morte), a apoptose ocorre após sinais de auto-destruição ou sinais vindos de outras células que sofreram apoptose, que chegam aos receptores de morte (como TNFR1 e FAS) que acionam seus ligantes de domínio intracelular recrutando proteínas FADD (FAS Associado ao Domínio de

Morte) e ativando a caspase-8, que irão acionar a caspase-3 (Jayakiran, 2015). A ativação da caspase-8 pode também acionar as proteínas BID e BAX, despolarizando a membrana mitocondrial e levando à apoptose via intrínseca (Wang; El-Deiry, 2003).

Outro processo de morte celular é por necrose. Neste, ocorre o comprometimento das membranas das organelas por danos irreversíveis, permitindo que enzimas proteolíticas sejam liberadas dos lisossomos, causando a destruição da célula (Hotchkiss et al., 2009).

Desde antes da descoberta da dupla hélice do DNA em 1953, por Watson e Crick, sabia-se que agentes exógenos físicos (raio-X e luz ultravioleta), químicos e biológicos podiam interagir com o material genético, resultando em mutações e instabilidade genômica (Araldi et al., 2015). Hoje, sabe-se que a maioria das lesões induzidas no DNA (75%) são quebras de fita simples (*single-strand breaks - SSB*), as quais podem resultar de danos oxidativos gerados durante o metabolismo ou hidrólises de bases. No entanto, as SSB podem ser convertidas em quebras de dupla fita do DNA, que são menos frequentes, mas com maiores consequências à célula (Friedberg, 2008; Tubbs & Nussenzweig, 2017).

1.4 Efeitos toxicogenômicos de materiais odontológicos e ferramentas de avaliação

Muitos ensaios devem ser realizados para a melhor compreensão dos efeitos biológicos dos materiais odontológicos no organismo humano. Os testes de

citotoxicidade, geralmente escolhidos como os primeiros a serem realizados *in vitro* podem gerar informações importantes, tais como dados sobre a biocompatibilidade de materiais com potencial aplicação clínica. São testes rápidos e de baixo custo, que fornecem informações preliminares importantes para o delineamento de estudos mais elaborados, que buscam identificar se tais materiais podem, por exemplo, causar danos ao material genético e, assim dar início a estados patológicos mais agressivos ao organismo.

As metodologias utilizadas para avaliação toxicogenética ou toxicogenômica, além de auxiliarem na identificação de biomarcadores genéticos da exposição a agentes genotóxicos, podem contribuir para a elucidação de seus respectivos mecanismos de ação. Nesse contexto, o teste do cometa ou eletroforese em gel de células individualizadas (*single cell gel electrophoresis assay*), é um ensaio amplamente utilizado para avaliação do potencial genotóxico dos mais diversos compostos, e para o biomonitoramento genético de populações humanas ou ecossistemas expostos a compostos potencialmente tóxicos (Koppen et al., 2017). Essa técnica permite detectar danos primários no DNA, como quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-lábeis, lesões oxidativas e alterações no sistema de reparo (Collins et al. 1998; Tice et al., 2000; Gontijo et al, 2003).

Embora ainda escassos, há dados que demonstram que cimentos endodônticos que possuem óxido de zinco e eugenol ou resina em sua formulação são capazes de promover aumento de danos no DNA em células de carcinoma escamoso oral (Huang et al., 2001). Esse efeito, no entanto, não foi observado com cimento composto por hidróxido de cálcio (Huang et al., 2001). O potencial genotóxico dos cimentos MTA

Fillapex®, MTA Plus e RealSeal (SE) foi avaliado em fibroblastos de hamsters recém-nascidos, por meio do teste do cometa. O MTA Fillapex® e o RealSeal induziram maior aumento de danos no DNA (com resposta dose-tempo-dependente) que o MTA Plus, cuja ação não foi dependente da concentração e tempo de tratamento (Darrag et al., 2014). Naghavi et al. (2014) também mostraram que cimento enriquecido com cálcio, embora genotóxico, induz menor quantidade de danos no DNA de células L929 (fibroblastos de rato) que o MTA.

Recentemente, Ribeiro et al. (2017), em uma revisão da literatura sobre materiais odontológicos, relataram que o MTA e o cimento Portland não teriam efeito genotóxico em células do sangue periférico humano, mas que compostos utilizados em resinas e cimentos odontológicos como BISGMA (bisfenol-A glicidil metacrilato) e TEGDMA (triétileno glicol dimetacrilato), causaram danos no DNA de células de glândulas salivares humanas e em linfócitos humanos *in vitro*.

Além de mudanças na estrutura do DNA, foi demonstrado que diversos materiais odontológicos podem também promover alterações transcricionais e interferir na cinética do ciclo celular e/ou nos processos de morte celular (Gordusys et al., 2007). Dentre os métodos utilizados para análise do transcriptoma estão a qRT-PCR (quantificação da transcrição reversa pela reação em cadeia da polimerase), que, além de ser uma técnica rápida para a mensuração da expressão gênica, possui acurácia e alta sensibilidade (Derveaux et al., 2010), e a citometria de fluxo para análise de alterações do ciclo e morte celular, também rápida e confiável (Riccardi et al., 2006).

Utilizando o método de qRT-PCR, Bonson et al. (2004), em estudo *in vitro* com fibroblastos humanos gengivais e do ligamento periodontal, observaram que o MTA foi capaz de induzir fenótipo osteogênico, com aumento da expressão do gene da fosfatase alcalina, osteonectina e osteopontina, elementos indicativos de reparo ósseo. Além disso, nesse mesmo estudo, os autores detectaram que a resina composta de ionômero híbrido (RCIH) inibiu a transcrição osteogênica, com diminuição da expressão da fosfatase alcalina, periostina e pleitrofina. Mais tarde, Yasuda et al. (2008) observaram que em células da polpa dentária de ratos o MTA, apesar de não apresentar efeito citotóxico, induziu aumento da expressão gênica e proteica de BMP-2 (*bone morphogenetic protein – 2*). Ainda em relação a efeito toxicogênico, a literatura mostra que o TEGDMA promoveu o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio da ativação do proteína NOX4 (NADPH oxidase 4 – fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidase 4), que levou à liberação do citocromo C, à diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica BCL-XL (*B-cell lymphoma-extra large*), à ativação da caspase 9 e ao aumento das taxas de apoptose em células embrionárias do mesênquima palatal humano e em células da polpa dentária (Yeh et al., 2015). Foi ainda demonstrado que o eugenol, substância também utilizada em alguns cimentos endodônticos, reduziu os níveis de expressão das proteínas BCL-2 (*B-cell lymphoma-2 – anti-apoptose*) e BAX (*BCL2-associated X protein – pró-apoptose*) em células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7). Esse composto foi também capaz de induzir aumento das taxas de apoptose, por afetar diretamente a integridade da membrana mitocondrial (Wafai et al., 2017). Recentemente,

Rohmaniar et al. (2017) mostraram que técnicos em odontologia, que manipulavam materiais como cobalto, níquel e cromo sem o uso de equipamentos de proteção individual (luvas, máscara, óculos, etc), apresentaram aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição da expressão do *TP53* em células do sangue periférico. Da mesma forma, Wei et al. (2018), investigando o impacto de materiais restauradores odontológicos sobre a expressão dos genes *BCL-2* e *BAX* em fibroblastos L-929, observaram aumento da expressão de *BAX* e diminuição do *BCL-2*.

Assim como estudos de genômica, transcriptômica e proteômica são importantes para avaliação de alterações gênicas e proteicas, a análise da cinética do ciclo celular é de grande valia para o entendimento do comportamento dos tecidos frente à agressão de um agente químico. Gorduysus et al. (2007), em estudo realizado em fibroblastos do ligamento periodontal humano tratados por 24 horas com os cimentos White ProRoot MTA, Diaket, Endion e CYMED 8410, observaram mudanças no ciclo e morte celular representadas por picos na fase subG1 compatíveis a altos níveis de morte celular por apoptose/necrose em culturas expostas ao cimentos Diaket, Endion e CYMED 8410. Por outro lado, o cimento White ProRoot MTA mostrou ser biocompatível, não causando alteração do ciclo e com mínima porcentagem de células mortas. Recentemente, Rodríguez-Lozano et al. (2019) utilizando citometria de fluxo para avaliar a viabilidade celular de fibroblastos do ligamento periodontal humano tratados com os cimentos endodônticos GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow 2, MTA Fillapex e AH Plus por 72 horas, observaram viabilidade

acima de 90% para os cimentos Guttaflow Bioseal e GuttaFlow 2 e porcentagens altas de apoptose/necrose com os cimentos MTA Fillapex e AH Plus.

Diante desse cenário e considerando a escassez de estudos sobre o potencial toxicogenômico de matérias odontológicos, torna-se necessário e urgente a avaliação dos efeitos genéticos dos compostos que são mais rotineiramente utilizados na medicina dentária.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Considerando que são limitados, divergentes e, portanto, inconclusivos os resultados sobre a biocompatibilidade do cimento MTA Fillapex®, e que são também escassos os relatos sobre seu potencial toxicogenômico, este estudo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e transcripcionais do MTA Fillapex® em fibroblastos gengivais humanos (FGH).

2.2 Objetivos específicos

Avaliar, em FGH tratados *in vitro* com o MTA Fillapex®:

- a citotoxicidade e sobrevivência celular;
- alterações na cinética do ciclo e nas taxas de morte celular;
- os níveis de danos primários no DNA (quebras de fita e sítios álcali lábeis);
- alterações transcripcionais nos genes *BCL-2*, *BAX* e *TP53*.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Hiyasat, A.S., Tayyar, M., Darmani, H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *Int Endod J*. 2010; 43:148-153.
- Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, <http://www.angelus.ind.br> > MTA-Angelus-10 (Acesso em 01/10/2019).
- APCD – Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas. Endodontia: especialidade trata lesões e doenças da polpa e raiz do dente. 2018; <http://www.apcd.org.br/index.php/noticias/1255/por-dentro-das-especialidades/18-06-2018/endodontia-especialidade-trata-lesoes-e-doencas-da-polpa-e-raiz-do-dente>
- Araldi, R.P., Melo, T.C., Mendes, T.B., Sá Junior, P.L., Noima, H.N., et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Bio & Pharmac* 2015; 72: 74-82.
- Bernabe, P.F., Holland, R., Morandi, R., de Souza, V., Nery, M.J., Otoboni Filho, J.A., et al. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. *Braz Dent J* 2005; 16: 149–155.
- Binayke, A., Mishra, S., Suman, P., Das, S., Chander, H. Awakenig the “guardian of genome”: reactivation of mutant p53. *Cancer Chemother Pharmacol* 2019; 83:1-15.
- Bin, C.V., Valera, M.C., Camargo, S.E., Rabelo, S.B., Silva, G.O., Balducci, I., et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2012; 38: 495-500.

- Bonson, S., Jeansonne, B.G., Laillier, T.E. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res* 2004; 83: 408–13.
- Bósio, C.C., Felipe, G.S., Bortoluzzi, E.A., Felipe, M.C.S., Felipe, W.T., Ribeiro, E.R.C. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. *Int Endod J* 2014; 47: 667-674.
- Braga, J.M., Oliveira, R.R., Martins, R.C., Vieira, L.Q., Sobrinho, A.P.R. Assessment of the cytotoxicity of a mineral trioxide aggregate – based sealer with respect to macrophage activity. *Dental Traumatol* 2015; 31: 390-395.
- Bramante, C.M., Demarchi, A.C., Moraes, I.G., et al. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106: 909–913.
- Chang, S.W., Lee, S.Y., Kang, S.K., Kum, K.Y., Kim, E.C. In vitro biocompatibility, inflammatory response, and osteogenic potential of 4 root canal sealers: Sealapex, Sankin Apatite Root Sealer, MTA Fillapex, and iRoot SP Canal Sealer. *J Endod* 2014; 40:1-7.
- Collado-González, M., Tomás-Catalá, C.J., Oñate-Sánchez, R.E., Moraleda, J.M., and Rodríguez-Lozano, F.J. Cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow2, MTA Fillapex, and AH Plus on Human Periodontal Ligament Stem Cells. *J Endod* 2017; 43: 816–822.
- Collins, A.R., Raslová, K., Smorovská, M.P., et al. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Rad Biol Méd* 1998; 25: 373-377.

- Darrag, A.M., Fayyad, D.M. Genotoxicity of three endodontic sealers by single cell gel-electrophoresis/comet assay. *J. Dent Tanta* 2014; 11:85-92.
- Delbridge, A.R.D., Grabow, S., Strasser, A., and Vaux, D.L. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 2016; 16: 99.
- Derveaux, S., Vandesompele, J., and Hellemans, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Met* 2010; 50: 227–230.
- Fischer, M. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncog* 2017; 36:3944-3956.
- Friedberg, E.C. A brief history of the DNA repair field. *Cell Res* 2008; 18:3-7.
- Gomes-Filho, J.E., de Faria, M.D., Barnabe, P.F., et al. Mineral trioxide aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. *J Endod* 2008; 34: 62-65.
- Gontijo, A. M. M. C., Tice, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. (Org.). *Mutag Amb. Canoas: Ulbra*, 2003. p. 173-200.
- Gorduysus, M., Avcu, N., Gorduysus O., Pekel A., Baran Y., Avcu F., Ugur A. Cytotoxic Effects of Four Different Endodontic Materials in Human Periodontal Ligament Fibroblast. *J Endod* 2007; 33:1450-1454.
- Green, D.R., Kroemer, G. *The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death* 2004.
- Grossman, L. *Endodontics*, 11th edn. Philadelphia: Lea & Febiger; 1988.
- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., Swanson, P.E. Cell Death. *New Eng J of Med* 2009; 361: 1570–1583.

- Huang, T.H., Lee, H., Kao, C.T: Evaluation of the genotoxicity of zinc oxide eugenol-based, calcium hydroxide-based, and epoxy resin-based root canal sealers by comet assay. *J Endod* 2001; 27: 744-748.
- Jayakiran, M. Apoptosis-Biochemistry: A Mini Review.*J Clin Exp Pathol* 2015; 5:1.
- Koppen, G., Azqueta, A., Pourrut, B., Brunborg, G., Collins, A.R., Langie, S.A.S. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. *Mutagen*. 2017; 32: 397-408.
- Leslie, P.L., Zhang, Y. MDM2 oligomers: antagonizers o the guardian of the genome. *Oncogene Res* 2016; 35: 6157-6165.
- Morgental, R.D., Vier-Pelisser, F.V., Oliveira, S.D., Antunes, F.C., Cogo, D.M., Kopper P.M. Anti-bacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int Endod J* 2011; 44:1128–1133.
- Naghavi, N., Ghoddusi, J., Sadeghnia, H.R., Asadpour, E., Asgary, S. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. *J Dent Mat* 2014; 33: 64-69.
- Nakayama, A., Ogiso, B., Tanabe, N., Takeichi, O., Matsuzaka, K., Inoue, T. Behavior of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone-related protein mRNAs. *Int Endod J* 2005; 38: 203–210.
- Parirokh, M., Torabinejad, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part I: chemical, physical, and antibacterial. *J Endod* 2010; 36: 16–27.

- Pitt Ford, T.R., Torabinejad, M., McKendry, D.J., Hong, C.U., Kariyawasam, S.P. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995; 79: 56–63.
- Promega Corporation, <http://www.promega.com> > CellTiter 96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Acesso em 10/10/2019).
- Qu, Z., Weiss, J.N., Maclellan, W.R. Regulation of the mammalian cell cycle: a model of the G1-to-S transition. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: 349–364.
- Ribeiro, D.A., Yujra, V.Q., Moura, C.F.G.D., Handan, B.A., Viana, M.D.B., Yamauchi, L.Y., Castelo, P.M., and Aguiar, O. Genotoxicity induced by dental materials: A Comprehensive Review. *Anticancer Res* 2017; 37: 4017–4024.
- Riccardi, C., Nicoletti, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 2006; 1: 1458–1461.
- Rodríguez-Lozano, F.J., Collado-González, M., Tomás-Catafá, C.J., García-Bernal, D., López, S., Oñate-Sánchez, R.E., Moraleda, J.M., Murcia, L. GuttaFlow Bioseal promotes spontaneous differentiation of human periodontal ligament stem cells into cementoblast-like cells. *Dent Mater* 2019; 35: 114–124.
- Roberts, H.W., Toth, J.M., Berzins, D.W., Charlton, D.G. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater* 2008; 24: 149–164.
- Rohmaniar, P.D., Berniyanti, T., Rahayu, R.P. The correlation between the use of personal protective equipment and level wild-type p53 of dental technicians in Surabaya. *Dent J* 2017; 4.

- Santamaria, D., Barriere, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Caceres, J.F., Dubus, P., Malumbres, M., Barbacid, M. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 2007; 448: 811– 815.
- Salles, L.P., Conélio, A.L.G., Guimarães, F.C., Herrera, B.S., Ba,o S.N., Rossa-Junior, C., Guerreiro-Tanomaru, J.M., Tanomaru-Filho, M. Mineral Trioxide Aggregate based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod* 2012; 38: 971-976.
- Scelza, M.Z., Linhares, A.B., da Silva, L.E., Granjeiro, J.M., Alves, G.G. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J* 2012; 45: 12-18.
- Silva Almeida, L.H., Moraes, R.R., Morgental, R.D., Pappen, F.G. Are Premixed Calcium Silicate-based Endodontic Sealers Comparable to Conventional Materials? A Systematic Review of In Vitro Studies. *J Endod* 2017; 43, 527– 535.
- Silva, E.J, Accorsi-Mendonça, T., Almeida, J.F., Ferraz, C.C., Gomes, B., Zaia, A.A. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *Int Endod J* 2012; 45:49-56.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35: 206-221.
- Torabinejad, M, White DJ. United States Patent 5, 415, 547 USPTO. Patent Full Text and Image Database 1998.

- Torabinejad, M., Hong, C.U., McDonald, F., Pitt Ford, T.R. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995; 21: 349–53.
- Tubbs, A., Nussenzweig, A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer. *Cell* 2017; 168: 644-656.
- Velez, A.M.A., Howard, M.S. Tumor-suppressor genes, cell cycle regulatory checkpoints, and the skin. *N AM J Med Sci*. 2015; 7: 176-188.
- Vouzara, T., Dimosiari, G., Koulaouzidou, E.A., Economides, N. Cytotoxicity of a New Calcium Silicate Endodontic Sealer. *J Endod*. 2018; 44: 849-852.
- Wafai, R.A., El-Rabih, W., Katerji, M., Safi, R., Sabban, M.E., EL-Rifai, O., Usta,, J. Chemosensitivity of MCF-7 cells to eugenol: release of cytochrome-c and lactate dehydrogenase. *Sci Rep*. 2017; 7: 43730.
- Wang, S., El-Deiry, W. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncog* 2003; 22: 8628-8633.
- Wei, Y., Sun, J., Men, Q., and Tian, X. Toxic effects of four kinds of dental restorative materials on fibroblast HGF-1 and impacts on expression of Bcl-2 and Bax genes. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2018; 16: 4155–4161.
- Yasuda, Y., Ogawa, M., Arakawa, T., Kodowaki, T., Takashi, S. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod* 2008; 34:1057–1060.
- Yeh, C.C., Chang, J.Z., Yang, W.H., Chang, H.H., Lai, E.H., Kuo, M.Y. NADPH oxidase 4 is involved in the triethylene glycol dimethacrylate-induced reactive oxygen species and apoptosis in human embryonic palatal mesenchymal and dental pulp cells. *Clin Oral Investig*. 2015; 19: 1463-71.

Yoshino, P., Nishiyama, C.K., Modena, K.C., et al. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex(R) and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J* 2013; 24:111–116.