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

LISTA DE FIGURAS **I**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS **III**

RESUMO **IV**

ABSTRACT **VI**

CAPÍTULO I **13**

1.REVISÃO DE LITERATURA **13**

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

2. OBJETIVOS **28**

2.1 OBJETIVOS GERAIS 28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **29**

CAPÍTULO II **37**

RESUMO **38**

1. INTRODUÇÃO **39**

2. MATERIAL E MÉTODOS **40**

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

3. RESULTADOS **46**

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

4. DISCUSSÃO 54

5. CONCLUSÃO 56

AGRADECIMENTOS 57

REFERÊNCIAS 57

ANEXO 63

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<0,001em 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 (*tail intensity*) 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; 100µM). * p < 0,05, ***p < 0,001 (em relação ao controle negativo).....52

Figura 8: Níveis de expressão (RQ – quantificação relativa) dos genes *TP53*, *BAX* e *BCL-2* 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	*American Dental Association*
APAF-1	*Apoptotic Protease Activating Factor -1*
APCD	Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas
BAX	*BCL-2 Associated X (gene apoptótico)*
BCL-2	*B-cell lymphoma 2 (gene anti-apoptótico)*
BISGMA	Bisfenol-A glicidil metacrilato
Ca^{2+}	íon Cálcio
CDC25A	*Cell Division Cycle 25A*
Cdk	*Cyclin - dependent Kinases*
DNA	*deoxyribonucleic acid*
CKIs	*Cyclin- dependente kinases inhibitors*
E. faecalis	*Enterococcus faecalis*
E2F	Fator de transcrição do ciclo celular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAS	Receptor da família do fator de necrose tumoral
FDA	*Food and Drug Administration*
FADD	*Fas-associated protein with death domain*
FGH	Fibroblastos Gengivais Humano
G1	*Gap1* (primeira fase da intérfase do ciclo celular)
G2	*Gap2* (terceira fase da intérfase do ciclo celular)
M	*Mitosis*
MTA	Mineral Trióxido Agregado
NIH/3T3	Células de Fibroblastos Musculares de Rato
PUMA, NOXA, BIM	*proteínas membros 'BH3-only' da família BCL-2*
p53	*proteína* 53 (proteína codificada pelo gene *TP53*)
qRT-PCR	Quantificação da transcrição reversa pela reação em cadeia da polimerase
Rb	*Retinoblastoma*
SAOS-2	*Sarcoma Osteogenic -2* (células de osteosarcoma)
Sbendo	Sociedade Brasileira de Endodontia
S	*Synthesis* (segunda fase da intérfase do ciclo celular)
SSB	*single-strand breaks*
TEGDMA	Trietileno glicol dimetacrilato
TNFR1	*Tumor Necrosis Factor Receptor1*
TP53	*Tumor Protein 53* (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 Aggreate 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

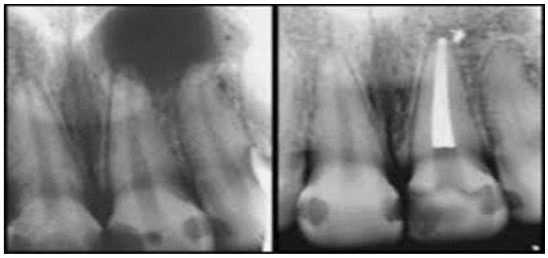
1.REVISÃO DE LITERATURA

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 escoa 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).

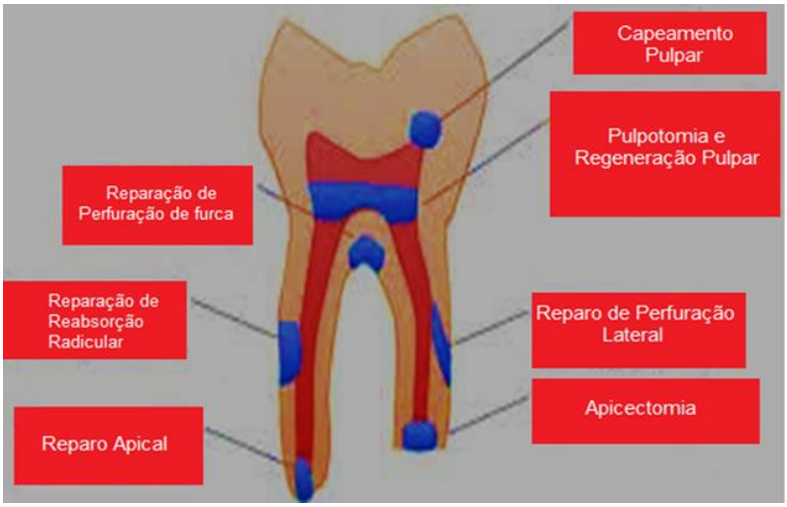


Figura 4: Ilustração das aplicações clínicas do cimento MTA.

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 pulpares 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).

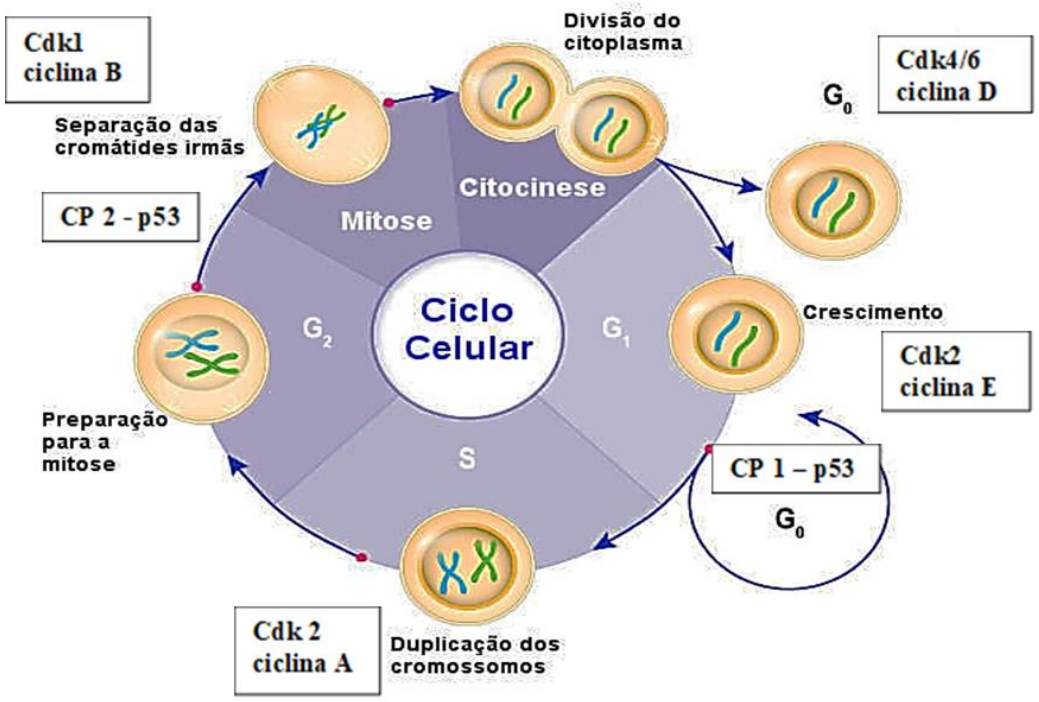


Figura 5: Ilustração simplificada das fases do ciclo celular. (CP – *checkpoints*).

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 (trietileno 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 (Gorduysus 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 toxicogenômico, 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 adenocarcimona 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, Rodrígues-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 transcricionais 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 transcricionais 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., Felippe, G.S., Bortoluzzi, E.A., Felippe, M.C.S., Fellippe, W.T., Ribeiro, E.R.C. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggreggate (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 cytotoxity 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.

Rodrígues-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 sourse 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.

Capítulo II

* **Manuscrito a ser submetido para a revista *Dental Materials*. FI: 4,44**

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

Kamila Sauer Veiga Leme[a], João Paulo de Castro Marcondes[b], Daisy Maria Fávero Salvadori[a]

[a] UNESP - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, SP, Brasil

[b] CESMAC – Centro Universitário de Maceió, AL, Brasil

RESUMO

Objetivos: este estudo foi delineado para avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos e toxicogenômicos do cimento endodôntico MTA Fillapex® em cultura de fibroblastos gengivais humanos (FGH). **Material e Métodos:** FGH foram expostos por 24 horas a concentrações correspondentes a 5% (T5), 10% (T10), 20% (T20) e 40% (T40) do MTA Fillapex® para a realização dos testes de citotoxicidade, sobrevivência celular (5 dias) e genotoxicidade (teste do cometa); análise do ciclo e morte celular (citometria de fluxo) e da expressão dos genes *TP53*, *BAX* e *BCL-2* (qRT-PCR). **Resultados:** os dados mostraram que o MTA Fillapex® apresentou citotoxicidade nas concentrações de 20% e 40%, mas apenas na de 40% houve redução da sobrevivência celular após 5 dias. A ação genotóxica do composto foi detectada nas concentrações de 5% e 20%, e os efeitos toxicogenômicos, que levaram ao aumento da expressão dos genes *TP53*, *BAX* e *BCL-2* na concentração de 20%. Foi também observado que o MTA Fillapex® (40%) induziu alteração na cinética do ciclo celular nas fases G1, S e G2, bem como nas taxas de apoptose inicial (20% e 40%) e tardia e necrose (40%). **Conclusão:** o cimento apresentou potencial citotóxico e toxicogenômico em FGH, alterando o ciclo celular e a expressão de genes que regulam vias de morte celular. Assim, os resultados indicam a necessidade da realização de outros testes, com diferentes desenhos experimentais, a fim de evitar riscos inerentes ao uso do MTA Fillapex® na odontologia.

Palavras-chave: apoptose; *BAX*; *BCL-2;* ciclo celular, genotoxicidade; *TP53.*

1. INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico, importante prática na clínica odontológica, tem a função de remover a polpa, limpar e modelar o sistema de canais radiculares contaminados e, em seguida, preencher esse sistema para prevenir a infecção e promover a cura perirradicular. Para isso, há a necessidade da utilização de materiais que sejam eficazes e não tragam danos futuros aos pacientes. Um dos materiais mais utilizados nos tratamentos endodônticos são os cimentos obturadores, responsáveis pelo preenchimento dos canais radiculares. Esses compostos devem possuir características que compreendem a estabilidade dimensional, facilidade de escoamento, baixa solubilidade, biocompatibilidade, liberação de íons Ca^{2+}, radiopacidade, atividade antimicrobiana e adesão à dentina radicular [1].

Atualmente, com o objetivo de serem biocompatíveis, são vários os cimentos que utilizam em sua composição o Mineral Trióxido Agregado (MTA). Esse 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 [2] 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 [3], promovendo reações favoráveis aos tecidos, especialmente pela ausência de resposta inflamatória severa, pela presença de cápsula fibrosa e pela indução da reparação do tecido mineralizado [4,5]. De fato, há estudos mostrando que o MTA é capaz de induzir a diferenciação de osteoblastos [6,7] e a estimulação da mineralização de células pulpares dentárias [8].

Embora o MTA apresentasse excelente atividade biológica, havia a necessidade de melhorar sua adesividade dentinária, a estabilidade dimensional, a radiopacidade, a fluidez e o potencial antibacteriano. Assim, o MTA Fillapex® foi desenvolvido buscando combinar as propriedades biológicas do MTA à resina salicilato, resina natural, tungstato de cálcio, sílica nanoparticulada e pigmentos [9]. No entanto, alguns estudos mostraram que o MTA Fillapex® apresenta maior potencial citotóxico [10,11,12,13] e genotóxico [14,15] que outros cimentos.

Portanto, considerando que os cimentos endodônticos permanecem por longo tempo em íntimo contato com regiões periapicais e que os eventos deletérios ao DNA e às células podem trazer graves consequências ao organismo, torna-se fundamental conhecer, em detalhes, os mecanismos de ação e os principais alvos desses compostos. Assim, o presente estudo foi delineado para investigar a capacidade do MTA Fillapex® em induzir danos primários no DNA de fibroblastos humanos gengivais, bem como em modular a expressão de genes relacionados à regulação do ciclo celular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagem celular e composto teste

A linhagem de fibroblastos gengivais humanos (FGH) foi gentilmente cedida pelo Prof. Carlos Alberto de Souza Costa, do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, com aprovação do Comitê de Ética. As células foram estocadas em nitrogênio líquido (-195ºC), em alíquotas de

$1x10^6$ células/mL de solução de congelamento (80% MEM, 10% soro fetal bovino, 10% DMSO) até o momento do uso. Para a realização dos experimentos, as células foram descongeladas, cultivadas em monocamadas utilizando-se o meio MEM (*Minimum Essential Medium*; Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% de antibiótico/antimicótico (10.000 uni/mL de penicilina, 10.000 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B - Gibco®), e incubadas a 37ºC em atmosfera com 5% de CO2 até atingirem confluência. O meio de cultura foi trocado a cada três dias. Para o subcultivo, o meio de cultura foi retirado e acrescentados 5 mL de solução de DPBS 1X (*Dulbeco's Phosphate Buffered Saline* - ATCC®) por 2 minutos. Após esse período, a solução de DPBS foi retirada e acrescentados 2 mL da solução de 0,05% tripsina/EDTA 1X (Gibco®) por 5 minutos, até a soltura das células. Em seguida, foram acrescentados 2 mL de meio de cultura suplementado, com posterior centrifugação (1500 rpm, por 5 min) e contagem das células. Os experimentos foram realizados em triplicata e sempre com as células em crescimento exponencial.

O composto MTA Fillapex® (Angelus S/A, lote 46454) foi adquirido diretamente de distribuidores especializados em materiais odontológicos. Para os testes, o cimento foi pesado (0,1g pasta base + 0,1g pasta catalisadora), misturado de acordo com as recomendações do fabricante e colocado em meio de cultura suplementado, respeitando a relação da área da superfície da amostra do cimento e volume de meio de cultura de 6 cm^2/mL, de acordo com a ISO 10993-5 (*International Organization for Standardization*), permanecendo em estufa a 37°C

por 6 horas. Após esse período, o meio de cultura foi coletado e filtrado com filtro de 0,22µm (solução mãe) para o tratamento das células.

2.2 Citotoxicidade e sobrevivência celular

Para avaliação da citotoxicidade e sobrevivência celular (5 dias) foi utilizado o *kit Cell Titter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation* (Promega). Este *kit* baseia-se no método colorimétrico de biorredução do composto MTS tetrazolium em formazam pelas células metabolicamente ativas (células viáveis). A absorbância da suspensão de células com o corante foi lida em espectrofotômetro (490 nm), sendo o resultado proporcional ao número de células viáveis. Nos testes, as células foram semeadas em placas de 96 poços, por 24 horas para adesão e estabilização e, posteriormente, tratadas com quatro diferentes concentrações do MTA Fillapex® por 24 h. As concentrações de 5%, 10%, 20% e 40% da solução mãe, assim como o tempo de permanência em contato com as células foram definidos a partir de ensaios pilotos. Foram semeadas $1x10^4$ células para o teste de citotoxicidade e $3x10^3$ células para o teste de sobrevivência celular de 5 dias (para evitar que as células entrassem em confluência antes dos 5 dias). Ambos os testes foram realizados em triplicata. Para o teste de citotoxicidade, imediatamente após os tratamentos, a solução cimento/meio cultura (solução mãe) foi removida, foi adicionado o reagente do *kit Cell Titter*®, e as células permaneceram incubadas por 2 horas, quando se procedeu a leitura em espectrofotômetro. Para o teste de sobrevivência celular, após o tratamento e remoção da solução cimento/meio de cultura, foi adicionado meio suplementado e

as células novamente incubadas à 37ºC por cinco dias. Após esse período, foi feita a incubação com o reagente do *kit Cell Titter*® da mesma maneira descrita para o teste de citotoxicidade.

2.3 Ciclo celular e apoptose

Para as análises do ciclo celular e taxas de apoptose foram semeadas $2x10^5$ células por poço, com triplicata para cada concentração testada do MTA Fillapex® (5%, 20% e 40%), seguindo o mesmo protocolo do teste de citotoxicidade. As culturas celulares foram avaliadas em citômetro de fluxo (GUAVA EASYCYTE; Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), utilizando-se iodeto de propídeo (Sigma) incubado em gelo e protegido da luz por 30 minutos para posterior análise da porcentagem das células nas fases G0/G1, S e G/M. A taxa de apoptose foi investigada utilizando-se o reagente Guava Nexin (Merk Millipore) em temperatura ambiente, por 20 minutos, segundo instruções do fabricante. O *status* celular foi definido em porcentagem de células viáveis [annexin(-) 7-AAD(-)], apoptose inicial [annexin(+) 7-AAD(-)], apoptose tardia [annexin(-) 7-AAD(+) e necrose [annexin(+) 7-AAD(+)]. Todas as análises foram feitas pelo *software GUAVA Cytosoft* versão 4.2.1.

2.4 Teste do cometa

O teste do cometa foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Singh [16] e Tice [17]. Inicialmente, as células foram cultivadas por 24 horas (aproximadamente 6×10^4 células/poço) em placas de 24 poços. Após esse período

as células foram tratadas com a solução cimento/meio de cultura (solução mãe) nas concentrações de 5%, 10% e 20% por 24 horas. Como controle positivo foram utilizadas células tratadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na concentração de 100µM. Os experimentos foram conduzidos em triplicata e protegidos da luz e apenas as culturas com taxa de viabilidade celular superior a 70% no teste com azul de tripano foram consideradas [18]. Para o processamento das células, o conteúdo de cada poço foi transferido para um microtubo previamente identificado e centrifugadas a 1000 rpm por 3 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, foram adicionados 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (37ºC) e a suspensão agarose/células foi colocada sobre uma lâmina previamente coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. Em seguida, a lâmina foi deixada à temperatura de 4ºC, por 5 minutos, para solidificação da agarose e, então, imersa em solução de lise (2,5M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris, 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO), na qual permaneceu por aproximadamente 15 horas. Após esse período, a lâmina foi colocada em solução de PBS (1X) por 5 minutos e, em seguida, em uma cuba horizontal de eletroforese, onde permaneceu em tampão alcalino (NaOH 10 N, 200 EDTA 200 mM, pH > 13) a 4º C, por 20 min. para o processo de "relaxamento" do DNA. A eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA, por 20 min., e, em seguida, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização (0,4 M de Tris-HCL, pH 7,5) por 15 minutos e fixadas em etanol absoluto. Para a coloração dos nucleóides foi utilizado o *SybrGold* (1:10.000 – Invitrogen). Foram analisados 50 nucleóides por lâmina, em aumento de 400x, em microscópio de fluorescência

acoplado a sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV – Perceptive Instyruments, UK*). O parâmetro utilizado para a mensuração dos danos no DNA foi o *tail intensity* (% DNA na cauda do cometa).

2.5 Expressão gênica por qRT-PCR

A avaliação da expressão relativa dos genes *BCL*-2 (Hs 00608023 m1), *BAX* (Hs 00414514 m1) e *TP53* (Hs 99999147 m1) foi realizada pela técnica de qPCR-RT. Após a extração do RNA total utilizando-se o *kit Direct-zol RNA MiniPrep Plus* (Zymo Research) foi realizada a síntese do cDNA (kit *High Capacity*; AppliedBiosystems). As etapas da PCR foram realizadas em termociclador automático (ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System, Applied Biosystems), utilizando-se o sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, EUA), que é composto por um PCR Master Mix universal e uma sonda específica para cada gene, marcada com o fluorocromo FAM. A análise foi feita pelo método do CT Comparativo (ΔΔCT). O gene endógeno escolhido como controle foi a beta-actina, após teste piloto. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.6 Análise estatística

Para os dados obtidos nos testes de citotoxicidade, sobrevivência celular e do cometa, foi inicialmente realizado teste de normalidade (Teste de Shapiro-Wilk e Kolmogororov-Smirnov) seguido pelo ANOVA e Tukey para comparações múltiplas. Para os dados com distribuição assimétrica, teste do cometa, esses foram

ajustados pelo Modelo Linear Generalizado com distribuição gama seguido de comparações múltiplas. Para as análises dos resultados do ciclo celular e apoptose foi utilizado o teste de comparações com distribuição binomial seguida por comparação múltipla do teste Wald. Considerou-se $p<0,05$ como nível de significância. Para expressão gênica, os valores de p foram calculados com base no teste t de Student para os valores das replicatas 2^ (- Delta CT) para cada gene nos grupos controle e experimental. As análises foram realizadas utilizando-se o programa SAS, v.9.4 (*Statistical Analysis System*) (SAS Institute Cary, NC).

3. RESULTADOS

3.1 Citotoxicidade

Os dados obtidos a partir do teste de citotoxicidade mostraram redução significativa ($p<0,05$) na viabilidade celular nas culturas tratadas com o cimento nas concentrações de 20% e 40% (Fig.1).

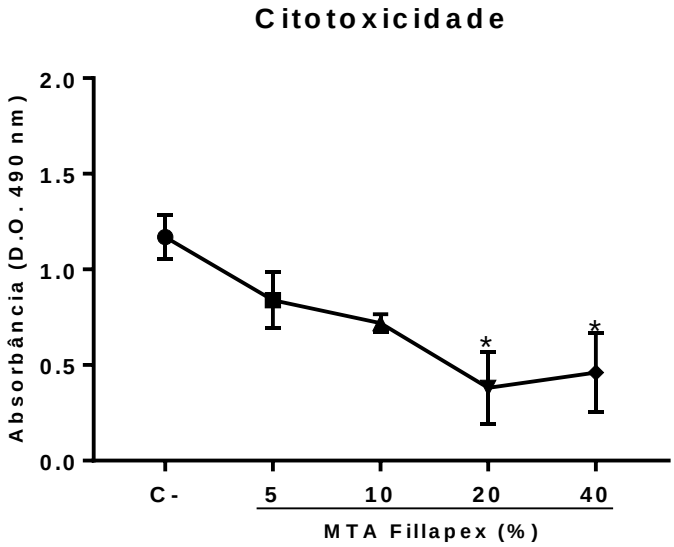


Figura 1. Viabilidade celular em cultura de fibroblastos gengivais humanos tratados com o cimento MTA Fillapex®. C-: controle negativo (células sem tratamento). * $p < 0,05$ em relação ao C-. D.O.; Densidade óptica.

3.2 Sobrevivência celular

Os dados mostram que 5 dias após exposição das células ao cimento houve redução significativa ($p<0,001$) na viabilidade celular apenas na concentração de 40% em relação ao controle negativo (Fig.2).

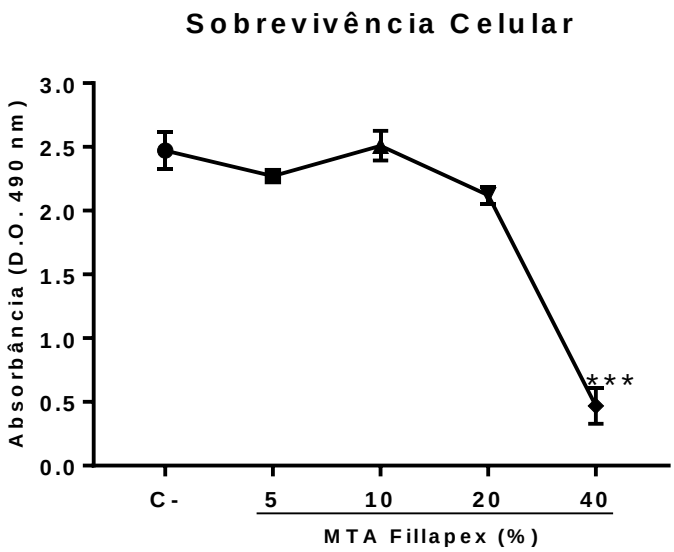


Figura 2: Viabilidade celular em cultura de fibroblastos gengivais humanos 5 dias após o tratamento com o cimento MTA Fillapex®. C-: controle negativo (células sem tratamento). *** $p < 0,001$ em relação ao C-. D.O.; Densidade óptica.

3.3 Citometria de fluxo

3.3.1 Ciclo celular

Os dados mostraram alteração na cinética do ciclo dos fibroblastos gengivais humanos expostos à concentração de 40% do MTA Fillapex em relação ao C-, em todas as fases (G1, S e G2), $p<0,05$. Houve diminuição da porcentagem de células em G1 e S e aumento da porcentagem de células em G2 (Figs. 3 e 4).

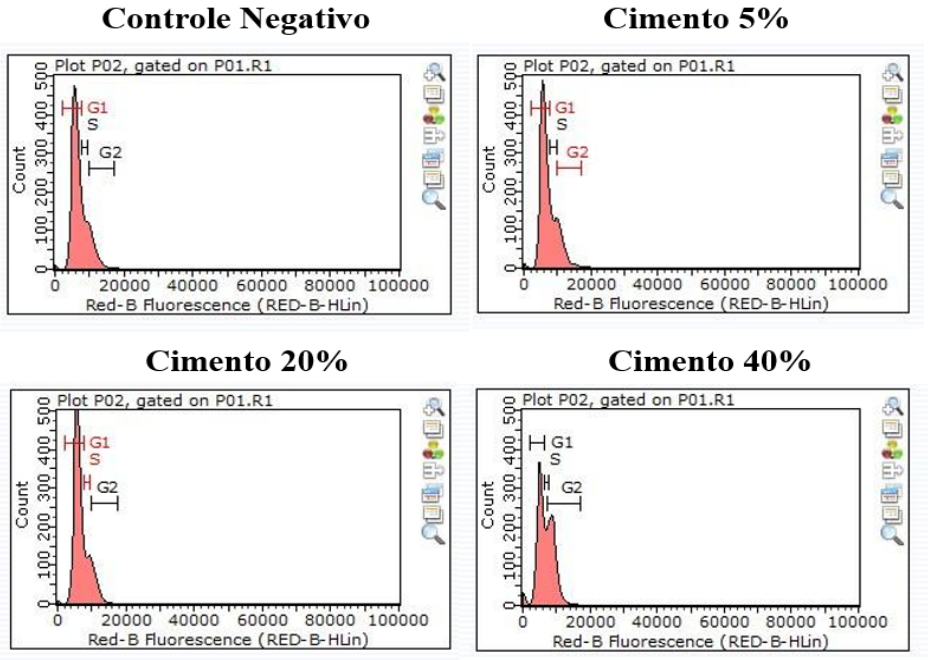


Figura 3: Ciclo celular de fibroblastos gengivais humanos tratados *in vitro* com o cimento MTA Fillapex®. Gráficos gerados por citometria de fluxo mostrando as fases G1, S e G2.

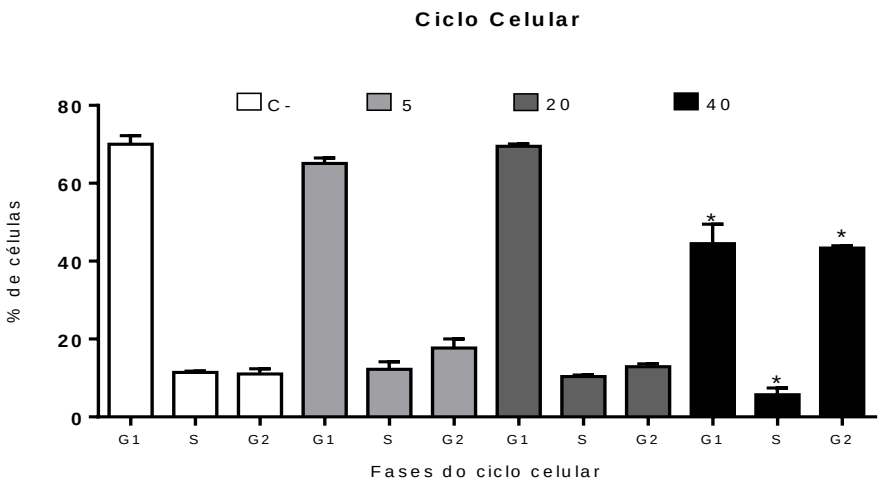


Figura 4: Frequência de fibroblastos gengivais humanos nas respectivas fases do ciclo celular após tratamento com o MTA Fillapex®. * p<0,001em relação ao controle negativo (C-).

3.3.2 Morte celular

Os dados obtidos por citometria de fluxo mostraram aumento significativo ($p<0,05$) na porcentagem de apoptose inicial em fibroblastos gengivais humanos expostos ao cimento MTA Fillapex® nas concentrações de 20% e 40%; aumento da porcentagem de células em apoptose tardia e necrose e redução de células viáveis na concentração de 40% (Figs. 5 e 6).

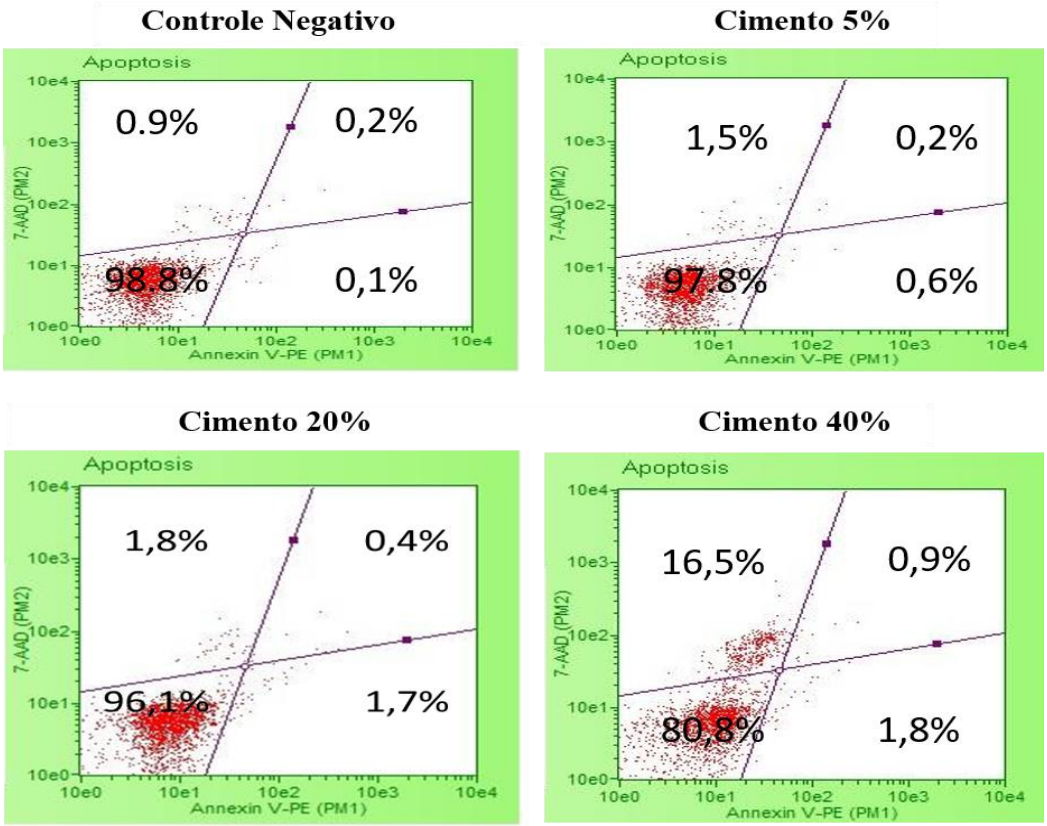


Figura 5: Porcentagem de células viáveis (quadrante inferior esquerdo), apoptose inicial (quadrante inferior direito), apoptose tardia (quadrante superior direito) e necrose (quadrante superior esquerdo) em cultura de fibroblastos gengivais humanos expostos ao cimento MTA Fillapex®. C-: controle negativo (células sem tratamento).

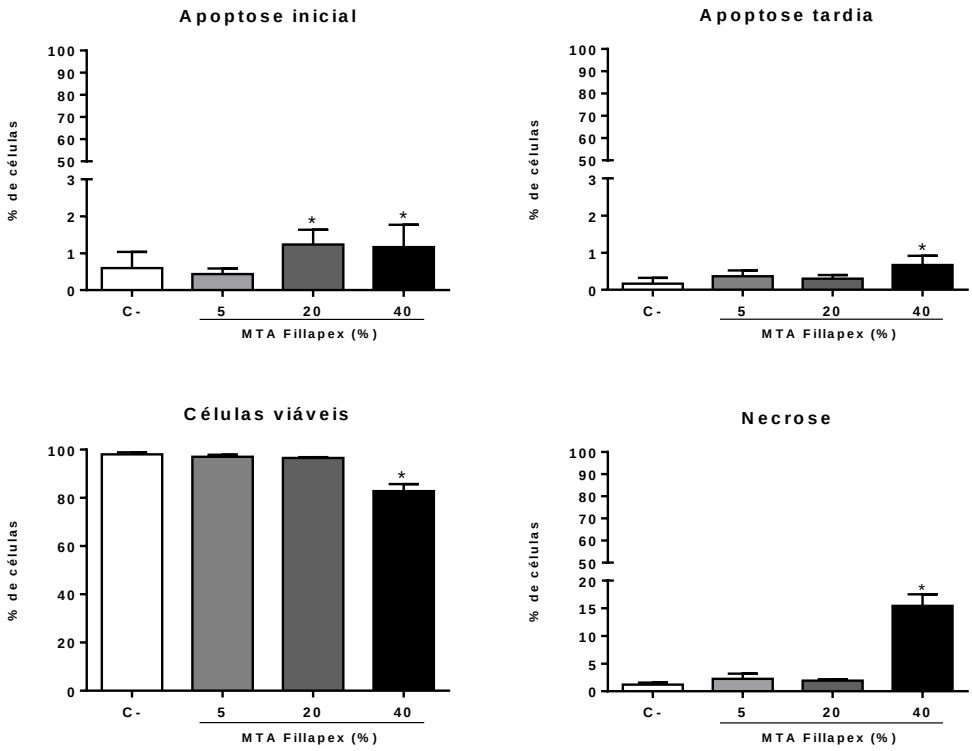


Figura 6: Porcentagem de células viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia e de necrose em cultura de fibroblastos gengivais humanos expostos ao cimento MTA Fillapex®. C-: controle negativo (células sem tratamento). * $p < 0,05$ em relação ao C-.

3.4 Genotoxicidade

Na Fig. 7 estão apresentados os níveis de danos no DNA de fibroblastos gengivais humanos tratados com o MTA Fillapex®. Houve aumento significativo ($p<0,05$) de danos nas células tratadas com o cimento nas concentrações de 5% e 20% em relação ao controle negativo. Não há resultado para a concentração de 40%, uma vez que a taxa de viabilidade celular recomendada para realização do teste do cometa atingiu nível menor que 70%.

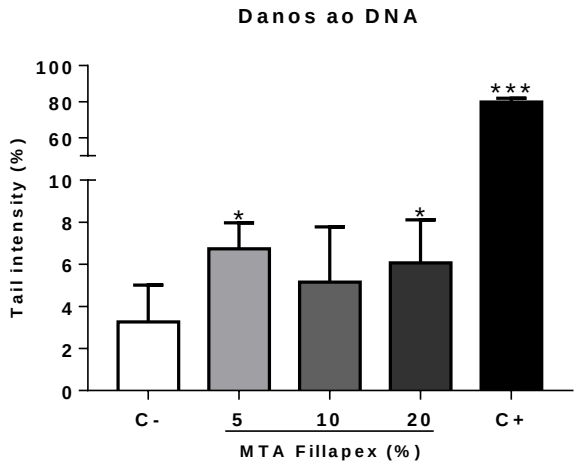


Figura 7: Danos no DNA (*tail intensity*) em fibroblastos gengivais humanos tratados com o cimento MTA Fillapex®. C-: controle negativo (células sem nenhum tratamento); C+: controle positivo (células tratadas com H_2O_2; 100µM). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (em relação ao controle negativo).

3.5 Expressão gênica

A análise de transcriptoma mostrou aumento significativo ($p<0,05$) da expressão dos genes *TP53*, *BAX* e *BCL-2* nos fibroblastos gengivais humanos tratados com o MTA Fillapex® na concentração de 20% em relação ao controle negativo (Fig. 8). A razão de expressão *BAX/BCL-2* (genes apoptótico/ anti-apoptótico) foi menor que 1 (RQ-8.384 *BAX*/RQ-11.099 *BCL-2* = 0.760). Foram considerados diferencialmente expressos apenas os genes com *fold change* maior que 2. Os valores do *fold change* com as respectivas diferenças estatísticas para cada gene em cada um dos tratamentos estão apresentados em Anexo.

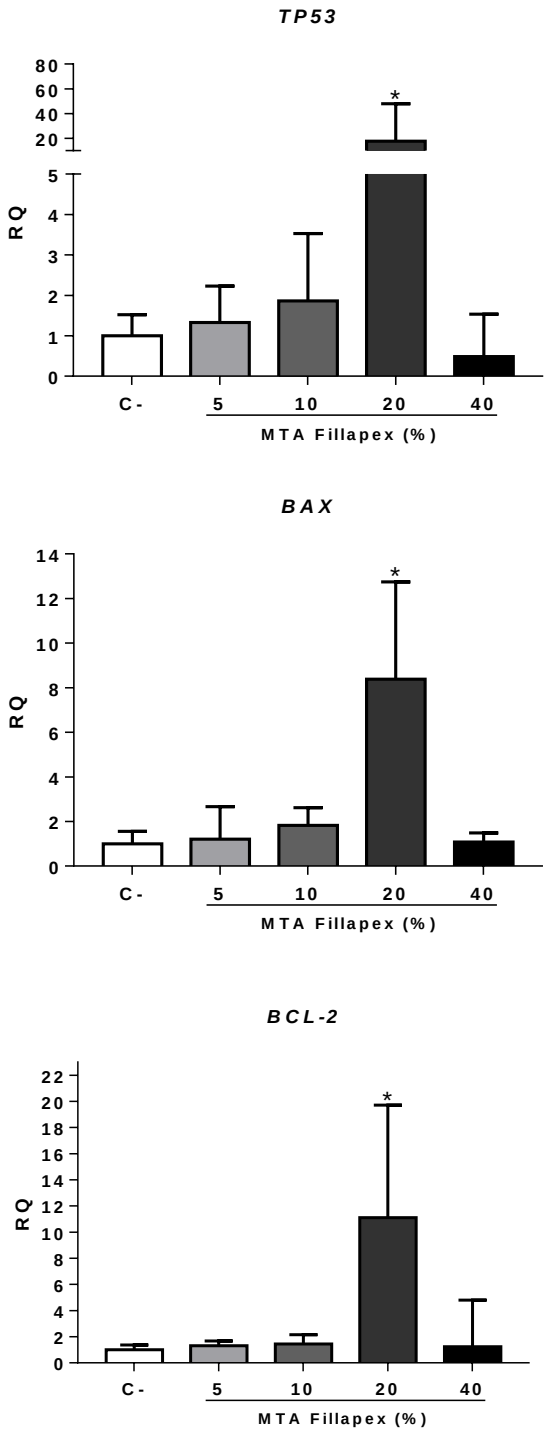


Figura 8: Níveis de expressão (RQ – quantificação relativa) dos genes *TP53, BAX* e *BCL-2* em fibroblastos gengivais humanos tratados com o cimento MTA Fillapex®. C-: controle negativo. * $p < 0,05$ (em relação ao C-).

4. DISCUSSÃO

A literatura tem mostrado efeitos biológicos nocivos de vários materiais odontológicos, entre os quais alguns cimentos endodônticos [19, 20, 21, 22]. Todavia, há cimentos como o MTA, o Bioaggregate e Biodentine (chamados bioativos) que apresentaram efeito benéfico sobre a diferenciação osteogênica em células tronco mesenquimais [23], e o cimento BioRoot RCS que apresentou baixo efeito citotóxico em fibroblastos do ligamento periodontal e alta secreção de fatores de crescimento osteogênico e angiogênico [24]. No presente estudo foi observado que o MTA Fillapex®, nas duas maiores concentrações testadas (20% e 40%), apresentou efeito citotóxico em fibroblastos humanos gengivais após tratamentos por 24h. A análise por citometria de fluxo confirmou tal achado, evidenciando o aumento de morte celular por apoptose nas duas concentrações e principalmente por necrose na concentração mais alta (40%). Da mesma forma, estudos anteriores mostraram que o MTA Fillapex® em altas concentrações, recém-espatulado e após o tempo de presa, apresentava elevada citotoxicidade em fibroblastos gengivais e periodontais humanos e que esta poderia estar relacionada ao elevado pH e a componentes da fórmula como a resina salicilato, resina diluente e sílica [25, 26]. Estudo semelhante realizado em fibroblastos do ligamento periodontal, demonstrou que a necrose seria a principal causa de morte celular após o tratamento com o MTA Fillapex®, e também atribuiu tal ação à presença de salicilato e sílica na constituição do cimento [27].

Sabe-se que a morte celular por necrose ocorre pelo comprometimento das membranas das organelas, fato que permite que enzimas proteolíticas sejam liberadas dos lisossomos para o citosol, causando a destruição da célula e podendo gerar reações inflamatórias [28, 29]. No presente estudo, morte celular preferencialmente por necrose ocorreu apenas na concentração mais alta (40%), que foi a única a também reduzir a capacidade das células em sobreviver cinco dias após o tratamento com o cimento (teste de sobrevivência celular) e a causar alteração na cinética do ciclo celular.

Provavelmente, os danos causados por altas concentrações do MTA Fillapex® foram mais agressivos que impossibilitaram os mecanismos regulares de defesa celular. Realmente, a realização do teste de genotoxicidade (teste do cometa) corroborou tal hipótese. Além de evidenciar o potencial genotóxico do MTA Fillapex® indicando a necessidade da célula em acionar mecanismos de reparo do DNA a fim de manter a integridade do genoma, o ensaio não pôde ser realizado com a concentração de 40%, uma vez que esse tratamento resultou em viabilidade celular inferior a 70%, fato que mascararia a mensuração de danos no DNA originados apenas pela ação do cimento [18, 30].

Apesar dos genes envolvidos na morte por apoptose terem sido modulados pelo tratamento com MTA Fillapex®, isso ocorreu apenas para a concentração de 20%, reforçando a ação de diferentes mecanismos de morte celular dependendo da concentração do cimento. Interessantemente, nossos dados mostraram que o aumento da expressão do *BCL-2* (anti-apoptótico) foi acompanhado do aumento da expressão do gene apoptótico *BAX*. Contudo, como a razão da expressão *BAX/BCL-*

2 foi menor que 1, pode-se sugerir que a ação do *BCL-2* tenha se sobreposto à do gene *BAX*. Estudos anteriores já haviam demonstrado a expressão de genes antagônicos frente a estresse induzido por agentes químicos [31, 32]. O gene *BCL-2* codifica a proteína BCL-2 que, localizada na membrana externa das mitocôndrias, controla sua permeabilidade e pode regular a morte celular por apoptose em alguns tipos de células que estão sob condição de estresse químico [33]. A proteína BAX, por sua vez, pode ser diretamente ativada pelo gene *TP53* [34], ou indiretamente por tBID (‘*BH3 only’*), forma clivada de BID pela caspase 8, a qual não somente liga-se à proteína BCL-2 inibindo-a, mas também a BAX ativando-a [35]. O aumento da expressão do gene *TP53*, também ocorrido após a exposição ao cimento à concentração de 20%, mas não à de 40%, evidenciou, mais uma vez, que os mecanismos de proteção celular não foram adequadamente ativados quando as células foram submetidas a altos níveis de estresse químico. Vale lembrar, que a proteína p53 responde a diversos estresses celulares podendo induzir a interrupção do ciclo, a apoptose, senescência, reparo do DNA ou alterações no metabolismo celular [36, 37].

5. CONCLUSÃO

Com base nos achados pode-se concluir que, nas condições utilizadas no presente estudo, o cimento MTA Fillapex® apresentou efeito citotóxico e toxicogenômico em fibroblastos gengivais humanos, *in vitro*. Portanto, sugere-se a

realização de outros testes, com diferentes desenhos experimentais, a fim de evitar riscos inerentes ao uso deste cimento na odontologia.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

[1] 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.

[2] Parirokh, M., Torabinejad, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review—part I: chemical, physical, and antibacterial. J Endod 2010; 36: 16–27.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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.

[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.

[8] 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.

[9]Al-Hiyasat, A.S., Tayyar, M., Darmani, H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. Int Endod J. 2010; 43:148-153.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 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.

[13] 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.

[14] 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.

[15] 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.

[16] Singh, N.P., Maccoy, M.T., Tice, R.R, Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experiment Cell Res 1988; 175:184-197.

[17] Tice, R.R., Andrews, P.W., Hirai, O., Singh, N.P. The single cell gel (SCG) assay: an electropheretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. Advances Experiment Med Bio 1991; 283: 57-64.

[18] 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.

[19] Michelsen, V.B., Lygre, H., Skålevik, R., Tveit, A.B., Solheim, E. Identification of organic eluates from four polymer-based dental filling materials. Euro J of Oral Sci 2003; 111: 263–271.

[20] Marchi, J., Ussui, V., Delfino, C.S., Bressiani, A.H.A., Marques, M.M. Analysis in vitro of the cytotoxicity of potential implant materials. I: Zirconia-titania sintered ceramics. J of Bio Mat Res Part B: Applied Biomaterials 2010; 94: 305–311.

[21] Karapınar-Kazandağ, M., Bayrak, Ö.F., Yalvaç, M.E., Ersev, H., Tanalp, J., Şahin, F., Bayırlı, G. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. Inter Endod J 2011; *44*: 626–634.

[22] Willershausen, I., Callaway, A., Briseño, B., Willershausen, B. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. H & F Med 2011; 7: 15.

[23] Lee, B.N., Lee, K.-N., Koh, J.T., Min, K.-S., Chang, H.S., Hwang, I.N., Hwang, Y.C., Oh, W.M. Effects of 3 Endodontic Bioactive Cements on Osteogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. J Endod 2014; 40: 1217–1222.

[24] Camps, J., Jeanneau, C., El Ayachi, I., Laurent, P., About, I. Bioactivity of a Calcium Silicate–based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. J Endod 2015; 41: 1469–1473.

[25] Zhou, H., Du, T., Shen, Y., Wang, Z., Zheng, Y., Haapasalo, M. In Vitro Cytotoxicity of Calcium Silicate–containing Endodontic Sealers. J Endod 2015; 41: 56–61.

[26] Shetty, R., Jagtap, P., Agarwalla, A., Wani, P., Bhargava, K., Martande, S. Comparative Evaluation of Cytotoxicity of Root Canal Sealers on Cultured Human Periodontal Fibroblasts: In vitro Study. The J of Conte Dent Prac 2018; 19:847–852.

[27] Szczurko, G., Pawińska, M., Łuczaj-Cepowicz, E., Kierklo, A., Marczuk-Kolada, G., Hołownia, A. Effect of root canal sealers on human periodontal ligament fibroblast viability: ex vivo study. Odont 2018; 106: 245–256.

[28] Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., Swanson, P.E. Cell Death. New Eng J of Med 2009; 361: 1570–1583.

[29] Wallach, D., Kang, T-B., Dilon, C.P., Green, D.R. Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. Sci 2016; 352: 1-8.

[30] 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 & Pharmaco 2015; 72: 74-82.

[31] Azimian, H., Bahreyni-Toossi, M.T., Rezaei, A.R., Rafatpanah, H., Hamzehloei, T., Fardid, R. Up-regulation of Bcl-2 expression in cultured human lymphocytes after exposure to low doses of gamma radiation. J Med Phys 2015; 40: 38–44.

[32] Aranda Salomão, P.M., de Oliveira, F.A., dos Santos, D.M.S., Domezi, J.P., Dionísio, T.J., de Oliveira, R.C., Magalhães, A.C. TiF4 and NaF varnishes induce low levels of apoptosis in murine and human fibroblasts through mitochondrial Bcl-2 family and death receptor signalling. Arc of Oral Bio 2019; 97: 245–252.

[33] Nuñez, G., London, L., Hockenbery, D., Alexander, M., McKearn, J.P., Korsmeyer, S.J. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. The J of Immunol 1990; 144: 3602–3610.

[34] Gavathiotis, E., Suzuki, M., Davis, M.L., Pitter, K., Bird, G.H., Katz, S.G., Tu, H.C., Kim, H., Cheng, E.H.Y., Tjandra, N., et al. BAX Activation is Initiated at a Novel Interaction Site. Nat 2008; 455:1076–1081.

[35] Delbridge, A.R.D., Grabow, S., Strasser, A., Vaux, D.L. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. Nat Rev Canc 2016; 16: 99.

[36] Kim, S., An, S.S.A. Role of p53 isoforms and aggregations in cancer. Med (Baltimore) 2016; 95.

[37] El-Hizawi, S., Lagowski, J.P., Kulesz-Martin, M., Albor, A. Induction of Gene Amplification as a Gain-of-Function Phenotype of Mutant p53 Proteins. Canc Res 2002; 62: 3264–3270.

ANEXO

Expressão dos genes de *TP53, BAX e BCL-2* em células gengivais humanas após tratamentos com o cimento MTA Fillapex® nas concentrações de 5%, 10%, 20% e 40%. C-: controle negativo.

TP53

Comparações	*Fold change*	*p*
20% vs C-	*17.666*	*0.0178444*
20% vs 5%	*13.296*	*0.0108168*
20% vs 10%	*9.499*	*0.0116968*
20% vs 40%	*36.403*	*0.0029428*
10% vs 40%	*1.702*	*0.0238332*

BAX

Comparações	*Fold change*	*p*
20% vs C-	*8.384*	*0.000577212*
20% vs 5%	*6.941*	*0.0125449*
20% vs 10%	*4.582*	*0.00164563*
20% vs 40%	*7.800*	*0.000565176*
10% vs C-	*1.830*	*0.028089*
10% vs 40%	*1.702*	*0.02383326*

BCL-2

Comparações	*Fold change*	*p*
20% vs C-	*11.099*	*0.00233792*
20% vs 5%	*8.491*	*0.0055791*
20% vs 10%	*7.635*	*0.0023149*
20% vs 40%	*8.916*	*0.0525144*