



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Odontologia de Araraquara**

**Programa de Pós-graduação em Odontologia**

**GUILHERME FERREIRA DA SILVA**

**Avaliação das propriedades físicas, químicas e  
biológicas do cimento Portland associado à  
radiopacificadores micro e nanoparticulados**

**Araraquara**

**2013**



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Faculdade de Odontologia de Araraquara**

**Programa de Pós-graduação em Odontologia**

**GUILHERME FERREIRA DA SILVA**

**Avaliação das propriedades físicas, químicas e biológicas  
do cimento Portland associado à radiopacificadores micro  
e nanoparticulados**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista para obtenção do Título de Doutor em Odontologia.

Orientador: *Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri*

Co-orientadora: *Profª. Drª. Juliane M. Guerreiro Tanomaru*

**Araraquara**

**2013**

Silva, Guilherme Ferreira da.

Avaliação das propriedades físicas, químicas e biológicas do cimento Portland associado à radiopacificadores micro e nanoparticulados/ Guilherme Ferreira da Silva . – Araraquara: [s.n.], 2013.

87 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientador : Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

1. Endodontia 2. Teste de materiais 3. Materiais dentários  
I. Título

**GUILHERME FERREIRA DA SILVA**

Avaliação das propriedades físicas, químicas e biológicas do  
cimento Portland associado à radiopacificadores micro e  
nanoparticulados

**Comissão Julgadora**

**TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR**

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

2º Examinador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raquel Assed Bezerra da Silva

3º Examinador: Prof. Dr. Giulio Gavini

4º Examinador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gisele Faria

5º Examinador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

Araraquara, 27 de março de 2013

# Dados Curriculares

*Guilherme Ferreira da Silva*

- Nascimento: 13 de janeiro de 1981 em Bauru-SP
- Filiação
  - Jose Rui Ferreira da Silva
  - Marcirene Gabriel da Silva
- 2000-2003: Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara.
- 2006-2008: Mestrado em Odontologia, área de concentração em Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara.
- 2009-2013: Doutorado em Odontologia, área de concentração em Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara.

## ***Dedicatória***

À minha família:

***Esta conquista também é de vocês!***

Aos meus queridos pais, **José Rui e Marcirene**, exemplos de luta, dignidade e honestidade.

Pais dedicados e presentes em todos os momentos da minha vida que sempre sacrificaram suas vidas pela minha formação moral e profissional.

Obrigado pela confiança e apoio em todas as minhas decisões.

À minha irmã, **Helena**, pela convivência todos esses anos e que mesmo à distância sempre me ajudou e torceu por mim.

À minha esposa, **Ana Carolina**. Obrigado pelo carinho, atenção, por suportar e saber entender minha ausência e por estar ao meu lado em todos os momentos. Por todo o apoio, paciência e conselhos. Acima de tudo por ser minha amiga em quem confio e que admiro.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**

Profissional dedicado e responsável. Exemplo de professor que tive a honra de conviver durante esses anos. Obrigado pela amizade, sinceridade, ensinamentos, paciência, por saber compreender minhas dificuldades e, acima de tudo, pela total dedicação na elaboração desta tese. Um exemplo profissional no qual me espelho!

## ***Agradecimentos Especiais***

À minha co-orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliane M.G. Tanomaru**

Obrigado pelos ensinamentos e convívio durante toda a pós-graduação e pela ajuda fundamental durante os experimentos com os animais. Por estar sempre pronta a me atender e por confiar em mim. Pelo apoio, amizade e respeito com que sempre me tratou.

Ao **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho**

Professor que admiro e que me serve como exemplo profissional, pela sua honestidade, responsabilidade, humildade e por sua dedicação. Obrigado pelas oportunidades, por sempre ter confiado no meu trabalho e por despertar em mim o desejo científico. Professor que tenho orgulho em poder chamar de amigo.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Estela Sasso Cerri,**

Pela contribuição, orientação e sugestões durante a elaboração de toda esta tese. Pelo convívio e amizade durante toda a minha pós-graduação.



## ***Agradecimentos***

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas da **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréia Affonso Barretto Montandon** (Diretora) e da **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elaine Maria Sgavioli Massucato** (Vice-Diretora).

Aos professores do Departamento de Endodontia desta Instituição: **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gisele Faria, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**. Meu respeito pelo aprendizado e pelas lições transmitidas, tanto durante a graduação quanto na pós-graduação.

Por terem despertado em mim a paixão pela Endodontia. Obrigado pela oportunidade de convívio, pelo companheirismo, amizade e pela contribuição na minha formação profissional.

Aos colegas do curso de doutorado, **Adriana S. Guinesi, Érica G. Jorge, Norberto B. Faria Junior e Rodrigo R. Vivan** pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas **Rafael Vicente Ferino e Roberta Bosso** pela ajuda fundamental na realização de todo este trabalho.

À **Luis Antônio Potenza e Pedro Sergio Simões**, pela amizade e pelos ensinamentos laboratoriais. Pela dedicação e capricho durante todo o processamento histológico.

Aos colegas **Breno Canegum, Flávia Beltrame, Priscila Oliveira e Tiago Fonseca** pela boa convivência no Departamento de Histologia e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara** e **Alexandre**, pelo profissionalismo e pela ajuda sempre que preciso.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara por toda ajuda e atenção que sempre colocaram à disposição.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram na elaboração e na melhora desta tese, contribuindo para que eu atingisse esta meta.

Silva GF. Avaliação das propriedades físicas, químicas e biológicas do cimento Portland associado à radiopacificadores micro e nanoparticulados [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

## Resumo

**Objetivo:** Avaliar as propriedades físicas, químicas e biológicas do cimento Portland (CP) associado a diferentes radiopacificadores (óxido de zircônio - OZr e óxido de nióbio - ONb) micro e nanoparticulados. **Metodologia:** Para isso, os grupos experimentais foram divididos em: *Capítulo 1* - CP, CP+20% de óxido de bismuto (OB), CP+30% OZrmicro e CP+30% OZrnano; *Capítulo 2* - CP+30% ONbmicro, CP+30% ONbnano e MTA-Angelus. Todos os materiais foram submetidos aos testes de radiopacidade, tempo de presa, pH e liberação de íons cálcio. Além disso, nos materiais do capítulo 1 foi realizado o teste de resistência à compressão após 24 horas e 21 dias. A reação tecidual provocada pelos materiais foi investigada por meio de análises morfológica, morfométrica (densidade numérica de células inflamatórias, CI) e imuno-histoquímica (número de células imunopositivas à interleucina-6, IL-6) da cápsula formada após 7, 15, 30 e 60 dias de implantação no subcutâneo dorsal. O método von Kossa, para detecção de estruturas calcificadas, também foi realizado. **Resultados:** *Capítulo 1* – Os materiais testados apresentaram pH alcalino e liberação de íons cálcio após 1, 7, 14 e 28 dias. Os materiais CP+OB, CP+OZrmicro e CP+OZrnano apresentaram valores de radiopacidade estatisticamente superiores ao CP e similares entre si. O CP+OZr micro e o CP+OZr nano exibiram tempos de presa maiores do que CP ( $p \leq 0,05$ ). O CP apresentou valor de resistência à compressão, após 24 horas e 21 dias, maior do que os materiais, porém, a adição de OZr promoveu médias estatisticamente superiores quando comparado ao CP+OB. Em todos os grupos, verificou-se redução significativa no número de CI e de células imunopositivas à IL-6 aos 15, 30 e 60 dias em comparação à 7 dias. O número de CI e de células imunomarcadas à IL-6 nos materiais contendo OZr foi significativamente menor do que o CP+OB em todos os períodos experimentais. Estruturas von Kossa positivas foram observadas na cápsula adjacente aos materiais implantados em todos os períodos. *Capítulo 2* - O MTA apresentou maior radiopacidade quando comparado aos grupos com ONb. O ONb aumentou o tempo de presa inicial dos materiais se comparados ao MTA. Os materiais avaliados apresentaram pH alcalino e liberaram íons cálcio. Em todos os grupos, foi verificada uma redução gradativa e significativa no número de CI e IL-6 a partir dos 7 dias. Aos 7 e 60 dias, o CP+ONb micro apresentou as menores médias para o número de CI e células imunopositivas à IL-6. Em

todos os períodos, as cápsulas formadas em resposta aos cimentos CP+ONb micro e o CP+ONb nano exibiram médias de densidade numérica de células inflamatórias e de células IL-6 positivas inferiores ou similares ao MTA. Estruturas von Kossa positivas foram observadas na cápsula adjacente aos materiais implantados em todos os períodos. **Conclusão:** *Capítulo 1* - Os resultados mostraram que o óxido de zircônio microparticulado e nanoparticulado favorece as propriedades físicas, químicas e biológicas do CP em comparação ao óxido de bismuto. *Capítulo 2* - O CP+ONbmicro e o CP+ONbnano são materiais biocompatíveis com propriedades físicas e químicas adequadas, similares ao MTA-Angelus.

**Palavras-chave:** endodontia; testes de materiais; materiais dentários.

Silva GF. Evaluation of physicochemical and biological properties of Portland cement associated to micro e nanoparticulated radiopacifiers [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2013.

## Abstract

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the effect of different micro e nanoparticulated radiopacifiers (zirconium oxide – ZrO and niobium oxide - NbO) on the physicochemical and biological properties of Portland cement (PC). **Methods:** The experimental groups were divided in: *Chapter 1* - PC, PC+20% bismuth oxide (BO), PC+30% ZrOmicro e PC+30% ZrOnano; *Chapter 2* - PC+30% NbOmicro, PC+30% NbOnano and MTA-Angelus. All materials were submitted to the tests of radiopacity, setting time, pH and calcium ion release. Besides, in the materials of chapter 1, the test of compressive strength after 24 hours and 21 days was performed. Moreover, tissue reaction promoted by all materials was evaluated in rat subcutaneous. In each rat, two polyethylene tubes filled with materials were implanted into dorsal subcutaneous. Empty tubes were used as control. After 7, 15, 30 and 60 days, the specimens were fixed and embedded in paraffin. In the HE-stained sections, the number of inflammatory cells (IC) in the capsule was obtained. Moreover, detection of interleukin-6 (IL-6) by immunohistochemistry and number of IL-6 immunolabeled cells were carried out. The von Kossa method was also performed. The differences among the groups were subjected to ANOVA with a significance level of 5%. **Results:** *Chapter 1* – All materials presented an alkaline pH and released calcium ions after 1, 7, 14 and 28 days. The PC+BO, PC+ZrOmicro and PC+ZrOnano exhibited radiopacity values statistically superior than PC. The PC+ZrOmicro and PC+ZrOnano presented setting times higher than PC ( $p \leq 0.05$ ). After 24 hours and 21 days, the PC showed compressive strength value significantly superior to the other materials. A higher compressive strength in the PC+ZrO (micro and nano) was found compared to PC+BO. In all groups, significant reduction in the number of IC and IL-6 immunolabeled cells was verified from 7 days. Furthermore, the number of IC and IL-6 positive cells in the CP+ZrO was significantly reduced in comparison to PC+BO in all periods. von Kossa-positive structures were observed in the capsule adjacent to implanted materials. *Chapter 2* - The MTA presented superior radiopacity when compared to the groups with NbO. The NbO increased the initial setting time of the materials in comparison to the MTA. The evaluated materials showed alkaline pH and were able to release calcium ion. In all groups, a significant and gradual reduction in the number of IC and IL-6 immunopositive cells was

verified from 7 to 15, 30 and 60 days. At 7 and 60 days, the PC+NbOmicro presented number of IC and of IL-6 immunopositive cells inferior than the other materials. In all periods, the capsules adjacent to the MTA exhibited number of IC and of IL-6 immunopositive cells similar or superior than PC+NbOmicro and PC+NbOnano. von Kossa-positives structures were seen in the capsule adjacent to the implanted materials in all periods. **Conclusion:** *Chapter 1* – The results revealed that ZrO microparticulated and nanoparticulated exhibits better physicochemical and biological properties in comparison to BO. *Chapter 2* – The PC+NbOmicro and PC+NbO presented satisfactory physicochemical and biological properties, similar to the MTA.

**Key words:** endodontics; test of materials; dental materials.

# Sumário

Introdução .....	15
Objetivo .....	20
Capítulo 1 .....	22
Capítulo 2 .....	47
Conclusão .....	71
Referências .....	73
Anexo .....	94

*Introdução*



## Introdução

A obturação retrógrada é uma das etapas da cirurgia pararendodôntica cujo objetivo é promover o selamento do canal radicular, após a apicectomia, com um material que apresente características físicas, químicas e biológicas adequadas. O material retro-obturador ideal deve prevenir a infiltração de micro-organismos, possuir estabilidade dimensional, ser insolúvel, não sofrer influência da umidade, ser de fácil manipulação e manuseio, possuir radiopacidade e, em contato com os tecidos apicais e periapicais, deve apresentar biocompatibilidade<sup>67</sup>.

Ao longo dos anos, diversos materiais têm sido estudados e indicados para serem utilizados no preenchimento de cavidades retrógradas. O amálgama foi utilizado amplamente, porém, em virtude do alto índice de insucesso clínico, quando utilizado como material retro-obturador, este produto não tem sido mais recomendado<sup>29</sup>. As desvantagens, frequentemente atribuídas ao amálgama incluem falhas na adaptação marginal, contaminação por mercúrio e estanho, sensibilidade à umidade e citotoxicidade<sup>4,68</sup>. Assim, o amálgama foi sendo substituído, no selamento de cavidades retrógradas, pelos materiais à base de óxido de zinco e eugenol como, por exemplo, o Intermediate Restorative Material (IRM) e o Super EBA por estes apresentarem biocompatibilidade e selamento marginal superiores ao amálgama<sup>3,67</sup>. Além disso, tanto o IRM quanto o Super EBA apresentam um valor de radiopacidade satisfatório<sup>64</sup>, superior ao mínimo recomendado pela norma da ISO para materiais endodônticos<sup>36</sup>.

Alguns cimentos endodônticos utilizados na obturação do canal radicular também são propostos como material retro-obturador. Dentre eles, o Diaket, um cimento à base de resina epóxica, o qual possibilita um selamento apical satisfatório quando usado no preenchimento de cavidades retrógradas<sup>30</sup>. O Sealer 26 é outro tipo de cimento à base de resina epóxica que, em uma consistência mais espessa, com maior quantidade de pó em relação à resina, também tem sido proposto como material retro-obturador. Já foi demonstrado que o Sealer 26 nesta consistência apresenta selamento marginal superior ao IRM<sup>62</sup> e radiopacidade de, aproximadamente, 6 mm Al<sup>64</sup>. Tanomaru-Filho et al.<sup>63</sup> (2006) verificaram que, após a obturação retrógrada, o Sealer 26 promoveu o reparo periapical, induzindo a formação de cemento e osso alveolar em dentes de cães com lesão periapical. O Sealapex, por sua vez, é um cimento endodôntico que apresenta excelente biocompatibilidade e que, adicionado ao óxido de zinco, pode ser utilizado como material retro-obturador por resultar em um produto com consistência adequada para ser aplicado clinicamente e por promover o reparo apical e periapical<sup>63</sup>.

Atualmente, o Mineral Trióxido Agregado (MTA), por proporcionar bom selamento marginal, mesmo na presença de umidade, e apresentar biocompatibilidade, tem sido considerado o material de escolha em casos de retro-obturaçã<sup>5,33,34,69,70</sup>. Estudos in vivo mostraram que o MTA é capaz de induzir a formação de osso, dentina e cimento<sup>5,60</sup>. Além disso, quando comparado ao amálgama e ao Super EBA como material retro-obturador, o MTA favorece a reparação dos tecidos periapicais, incluindo ligamento periodontal, cimento e osso alveolar<sup>70</sup>.

O MTA é essencialmente composto por cimento Portland (CP) acrescido de óxido de bismuto (OB), utilizado como radiopacificador, em uma proporção de 4:1, respectivamente<sup>26,66,76</sup>. A partir da constatação de que o MTA e o cimento Portland possuem composições semelhantes, estudos têm sido realizados comparando as propriedades físicas, químicas e biológicas destes materiais<sup>26,33,76</sup>. Estrela et al.<sup>26</sup> (2000) demonstraram que o MTA e o cimento Portland apresentam atividade antimicrobiana semelhantes. Além disso, estudos recentes observaram que cimento Portland é um material biocompatível, ou seja, não é genotóxico e não induz morte celular<sup>53</sup>. Além disso, o cimento Portland possui baixa citotoxicidade<sup>38</sup> e permite a proliferação e adesão celular<sup>44</sup>. Este material também é capaz de estimular a formação de tecido mineralizado<sup>55</sup> e, em tecido subcutâneo de ratos, provoca reação inflamatória suave, semelhante ao MTA<sup>33,73</sup>.

Apesar de o MTA apresentar vantagens em relação a outros tipos de materiais utilizados no preenchimento de cavidades retrógradas, estudos demonstram que o óxido de bismuto prejudica algumas propriedades do CP, tais como, a resistência à compressão<sup>15,21,65</sup> e a biocompatibilidade<sup>18,38,45</sup>. O óxido de bismuto não faz parte da reação de presa do MTA<sup>14</sup>, além disso, sua presença aumenta a porosidade do CP o que pode ocasionar um aumento na sua solubilidade e desintegração, diminuindo, assim, a resistência deste cimento<sup>21,65</sup>. Em relação à biocompatibilidade, o OB não permite a adesão celular e inibe o crescimento de osteoblastos<sup>18</sup>. O CP, por sua vez, quando comparado ao CP adicionado ao OB, permite maior crescimento e proliferação celular em contato com células pulpares humanas<sup>38,44,45</sup>. Assim, a utilização de outros tipos de radiopacificadores em associação ao CP vêm sendo sugerida<sup>9,16,24</sup>.

A associação do óxido de zircônio ao CP apresenta radiopacidade satisfatória<sup>9,24</sup> e não causa danos no DNA de fibroblastos<sup>52</sup>. Um estudo realizado com cultura de células do ligamento periodontal revelou que o óxido de zircônio associado ao CP não apresenta citotoxicidade<sup>32</sup>. Camilleri et al.<sup>17</sup> (2011) demonstrou que 30% de OZr adicionado

ao CP não interfere no mecanismo de hidratação deste cimento, proporcionando a liberação de íons cálcio e, portanto, resultando em um material bioativo<sup>17</sup>. Tem sido demonstrado que o óxido de zircônio associado ao cimento Portland fornece um material com boas propriedades físicas e químicas, comparáveis às do MTA<sup>22</sup>. Além disso, a adição do óxido de zircônio ao CP apresenta um pH alcalino, proporciona a liberação de íons cálcio e exibe baixa solubilidade<sup>25</sup>.

O Nióbio, por sua vez, é um metal utilizado largamente na indústria aeroespacial, naval e siderúrgica; o uso deste metal deve-se ao fato de ser um eficiente agente anti-corrosivo e resistente aos ácidos mais agressivos. Na Odontologia, o nióbio tem sido indicado no tratamento de superfícies de implantes por ser um material biocompatível que favorece a osseointegração<sup>37,49</sup>. Além disso, estudos mostraram que o óxido de nióbio adicionado à cultura de osteoblastos não impediu a proliferação celular e, portanto, foi considerado não citotóxico<sup>50,71</sup>.

Além da interferência do radiopacificador, a dificuldade de manipulação e inserção na cavidade, devido a sua consistência arenosa, e o longo tempo de presa são outras desvantagens, frequentemente, associadas ao MTA<sup>1,19,39</sup>. Há algumas evidências de que o tamanho das partículas dos materiais que compõem o MTA interfere em suas propriedades físicas e químicas bem como com a sua biocompatibilidade. Assim, têm sido demonstrado que quanto menor forem as partículas do MTA e do cimento Portland, mais homogênea é a microestrutura destes materiais o que pode favorecer a hidratação, diminuindo a porosidade e facilitando o manuseio destes produtos<sup>8,41</sup>. Recentemente, foi observado que uma nova versão do MTA (Nano Endodontic Cement) exibiu tempo de presa reduzido e aumento na microdureza em comparação ao ProRoot MTA® branco<sup>54</sup>. Desta maneira, pesquisas com alterações na formulação do MTA têm sido realizadas na tentativa de melhorar as suas propriedades físicas e químicas sem prejudicar a sua biocompatibilidade.

Para o desenvolvimento de novos materiais retrobturadores é etapa fundamental o estudo das propriedades físicas, químicas e biológicas do produto. Um material retrobturador ideal deve possuir radiopacidade suficiente para ser visualizado na radiografia e ser distinguido das estruturas anatômicas adjacentes, tais como dentina e osso alveolar<sup>67</sup>. A radiopacidade estabelecida para materiais endodônticos dever ser de, no mínimo, 3 mm Al<sup>36</sup>. Além disso, estes materiais têm que apresentar um valor de radiopacidade 2 mm Al superior ao da dentina e osso<sup>2</sup>.

Outra propriedade que deve ser avaliada é o tempo de presa destes materiais. Tem sido relatado que cimentos com tempo de presa prolongado são mais susceptíveis a dissolução durante a cirurgia parodontal. Em contrapartida, aqueles com tempo de presa extremamente curto podem dificultar sua aplicação clínica<sup>10,72</sup>. Além disso, os materiais devem apresentar resistência à compressão adequada, de maneira que suporte as forças resultantes dos esforços mastigatórios, evitando sua deterioração e o deslocamento da cavidade<sup>23</sup>.

Um material retro-obturador também deve ser biocompatível, ou seja, em contato com os tecidos apicais e periapicais, deve induzir o processo de reparo<sup>67</sup>. As propriedades biológicas do MTA tem sido atribuídas ao seu pH alcalino e sua capacidade de liberação de íons cálcio<sup>43,56</sup>. Inicialmente, ocorre uma agressão ao tecido em contato com o material causando a migração de diversas células inflamatórias. Tem sido relatado que a intensidade e a progressão do processo inflamatório são influenciadas por diversos fatores locais e sistêmicos. Além disso, o processo inflamatório envolve vários eventos moleculares e celulares que resultam na produção e liberação de citocinas, que são os moduladores da inflamação, tais como interleucina 1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e prostaglandinas – PGE<sub>2</sub><sup>35,48,58</sup>. Dentre estes moduladores, esta a IL-6 a qual é uma citocina inflamatória secretada por células T, monócitos e macrófagos em resposta a um antígeno ou outra citocinas, tais como, IL-1 e TNF<sup>48</sup>. Além disso, esta citocina é encontrada em grande número em inflamações da polpa e dos tecidos periapicais<sup>6</sup> e parece ser importante na modulação da extensão das lesões periapicais por estimular a diferenciação e o recrutamento de osteoclastos<sup>28</sup>.

O MTA, inicialmente, promove o recrutamento, proliferação e diferenciação de células inflamatórias causando um processo inflamatório no tecido em contato com este material<sup>59,60,73,74</sup>. Esta reação inflamatória induzida pelo MTA pode ser atribuída ao alto pH e ao calor produzido durante a presa do MTA<sup>59</sup>. Além disso, estudos mostraram que o MTA estimula a produção de citocinas moduladoras da inflamação como, por exemplo, IL-1 e IL-6<sup>40,61,31</sup>. Subseqüentemente, há uma redução significativa do número de células inflamatórias em contato com o MTA<sup>60,73</sup> o que deve ocorrer devido a uma queda na expressão das citocinas pró-inflamatórias, contribuindo, assim, para o reparo do tecido<sup>61</sup>.

O reparo dos tecidos é um processo complexo envolvendo uma série de eventos celulares que incluem inflamação, formação de tecido de granulação, remodelação e a liberação de vários mediadores químicos. Dentre os mediadores químicos, estão os fatores

de crescimento que são peptídeos liberados por diversas células e fazem parte de uma superfamília de citocinas. Estes fatores estimulam a proliferação, a migração, a diferenciação e a atividade celular<sup>20</sup>. Um dos fatores de crescimento envolvidos no processo de reparação é o FGF (fator de crescimento de fibroblastos) o qual é produzido por queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células musculares, condrócitos, monócitos, macrófagos e mastócitos<sup>7,75,77</sup>.

O FGF promove a proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares<sup>13</sup>, atuando como um potente agente mitogênico e quimiotático para células endoteliais e fibroblastos<sup>12,27,51</sup>. Estudos demonstraram que o FGF acelera a formação do tecido de granulação<sup>46</sup>, estimula a angiogênese<sup>47</sup> e parece exercer um papel decisivo na remodelação do colágeno por estimular os fibroblastos a produzirem colagenase<sup>42,57</sup>, etapas importantes na reparação tecidual. Além disso, um dos 22 tipos de FGF existentes, o FGF-1, é abundantemente encontrado em locais de inflamação crônica, contribuindo para a ativação de linfócitos e plasmócitos<sup>11</sup>.

Diante destas considerações, torna-se oportuno avaliar a influência de dois diferentes radiopacificadores, óxido de zircônio e óxido de nióbio, na forma microparticulada e nanoparticulada, sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas do cimento Portland e que possam ser utilizados como alternativas ao óxido de bismuto.

*Objetiva*

## Objetivo

### Objetivo geral

O presente estudo foi dividido em dois capítulos de acordo com os materiais avaliados. No Capítulo 1, foram avaliadas as propriedades físicas, químicas e biológicas do cimento Portland (CP) associado ao óxido de zircônio (OZr) microparticulado e nanoparticulado, comparando-os ao CP puro e ao CP associado ao óxido de bismuto (OB). No Capítulo 2, o CP associado ao óxido de nióbio (ONb) micro e nanoparticulado teve suas propriedades comparadas ao MTA-Angelus®.

### Objetivos específicos

- Verificar o pH, liberação de íons cálcio, resistência à compressão, radiopacidade e tempo de presa do cimento Portland associado ao óxido de zircônio micro e nanoparticulado.
- Avaliar o pH, liberação de íons cálcio, radiopacidade e tempo de presa do cimento Portland (CP) em associação ao óxido de nióbio micro e nanoparticulado.
- Investigar a reação tecidual provocada pelos diferentes materiais em subcutâneo de ratos. Para isso, foram feitas análises morfológica, morfométrica e imuno-histoquímica da cápsula formada adjacente aos implantes contendo os materiais, verificando:
  - A intensidade do processo inflamatório na cápsula adjacente aos materiais implantados por meio de análise morfológica e morfométrica;
  - A imunoexpressão da interleucina-6, uma citocina pró-inflamatória, no tecido em contato com os diferentes materiais;
  - A possível formação de estruturas calcificadas na cápsula adjacente aos implantes, usando o método histoquímico de von Kossa.

# *Capítulo 1*



## Capítulo 1

### Effect of microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide on the physicochemical and biological properties of white Portland cement\*

#### Abstract

**Objectives:** Evaluate the physicochemical properties and the tissue reaction promoted by Portland cement (PC) associated to microparticulated (mi) or nanoparticulated (na) zirconium oxide (ZrO) compared to PC and bismuth oxide (BO) with PC. **Methods:** All materials were submitted to tests of pH, calcium ion release, compressive strength, radiopacity and setting time. In each rat, two polyethylene tubes filled with materials were implanted into dorsal subcutaneous. Empty tubes were used as control. After 7, 15, 30 and 60 days, the specimens were fixed and embedded in paraffin. In the HE-stained sections, the numerical density of inflammatory cells (IC) in the capsule was obtained. Moreover, detection of interleukin-6 (IL-6) by immunohistochemistry and numerical density of IL-6 immunolabeled cells were carried out. The von Kossa method was also performed. The differences among the groups were subjected to ANOVA with a significance level of 5%. **Results:** All materials presented an alkaline pH and released calcium ions. The addition of radiopacifiers increased setting time and radiopacity of PC. A higher compressive strength in the PC+ZrO (micro and nano) was found compared to PC+BO. In all groups, significant reduction in the number of IC and IL-6 was verified from 7 days. The number of IC and IL-6 in the materials with ZrO was significantly reduced in comparison to PC+BO in all periods. von Kossa-positive structures were observed in the capsule adjacent to implanted materials in all periods. **Significance:** ZrOmicro and ZrOnano can be considered as a potential radiopacifier to be used in substitution to BO.

**Key Words:** MTA, Portland cement, physicochemical properties, biocompatibility, radiopacifying agents

\* Artigo submetido ao periódico *Dental Materials* (ver Anexo 2)

## Introduction

MTA (Mineral Trioxide Aggregate) has been widely used in Endodontics as a root-end filling material and also to seal root perforations due to its marginal adaptation and biocompatibility [1,2]. This material is basically composed by Portland cement (PC) added to a radiopacifying agent, bismuth oxide (BO), in a 4:1 proportion [3,4].

Studies have been demonstrated that the addition of 20% BO to PC confers high radiopacity [5-7] but interferes in some properties of the PC [8-10]. Evidence suggests that bismuth oxide interferes with the hydration mechanism of MTA and precipitation of calcium hydroxide in the hydrated paste [9]. Furthermore, the association of BO promotes flaws in the microstructure of PC and, consequently, increases the porosity and solubility of the Portland cement culminating in the reduction of its resistance [8-10,11]. Regarding the biocompatibility, it has been shown that BO interferes with cell growth [12] and, in human dental pulp cell cultures, increases the cytotoxicity of Portland cement [13].

So, other high molecular mass materials have been studied as alternative radiopacifier agent [5-7, 14]. One of these materials is the zirconium oxide (ZrO) that was initially introduced as a biomaterial in orthopedic surgery due to its hardness, high density and good wear resistance. More recently, it has been related that zirconium oxide added to Portland cement in a 1:4 ratio provides an adequate radiopacity to the Portland cement, i.e. superior to the recommended by the International Standards for dental root canal sealing materials [5,6]. There is evidence that this mixture releases calcium ions and provides to the microenvironment an alkaline pH [7]. Moreover, studies have been shown that the addition of 30% ZrO does not affect the hydration reaction of Portland and originates a bioactive cement [15] with comparable properties to MTA [14].

It has been suggested that the reduction in the material particle size could improve the physicochemical properties of the Portland cement [16] and MTA [17] due to its rapid hydration and, consequently, reduction in the porosity of the material [16]. More recently, it has been reported that MTA-based material composed by smaller particles exhibited reduced setting time and increased microhardness [18].

Thus, the aim of this study was to evaluate some physicochemical properties such as pH, ions calcium release, radiopacity, setting time and compression strength of Portland cement associated to 30% microparticulated or nanoparticulated zirconium oxide in comparison to Portland cement and Portland cement added to bismuth oxide. Furthermore, the

tissue reaction promoted by these materials in the rat subcutaneous was investigated by morphological, immunohistochemical and quantitative analyses.

## **Material and Methods**

In this study, the following materials were tested: white Portland cement (Portland Cement; CPB-40; Votorantin cimentos, Camargo Correa S.A., Pedro Leopoldo, MG, Brazil), PC group; white Portland cement with bismuth oxide (Sigma Aldrich, St Louis, MO), PC+BO group; white Portland cement with microparticulated zirconium oxide (Sigma Aldrich, St Louis, MO), PC+ZrOmi group and white Portland cement with nanoparticulated zirconium oxide, PC+ZrOnano group. A ratio of 20%  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  and 80% PC and 30% ZrO and 70% PC by weight were used for analyses. The materials were mixed at a ratio of 1 g powder of cement per 0.3 mL liquid (distilled water). It has been demonstrated that this mixture provides a material with comparable properties to MTA [14] and did not interfere in the hydration reaction of Portland cement [15]. Moreover the PC+ZrOnano was prepared using a powder:liquid mixing ratio of 1g:0.33 mL, standardized in pilot tests, because it provided an adequate handling and consistency characteristics for a cement intended for use as a root-end filling material. Nanoparticulated ZrO was performed by polymeric precursor method at Institute of Physics of São Carlos (University of São Paulo, São Carlos, Brazil); the particle size obtained was 74nm which was confirmed by Brunauer-Emmett-Teller (BET) surface area analysis.

### **Analyses of the pH and calcium release**

For the pH and calcium release tests, 10 polyethylene tubes (Embramed Ind. Com., Sao Paulo, SP, Brazil) measuring 10.0 mm length and 1.6 mm diameter were filled with freshly prepared samples of each material, sealed in flasks containing 10 mL of distilled water, and stored at 37° C. After 1 day of immersion, the tubes were carefully removed and placed into new flasks with an equal amount of distilled water, and this procedure was repeated after every predetermined periods of 7, 14 and 28 days. The pH of the solutions was analyzed at each period using a previously calibrated digital pHmeter (Ultrabasic; Denver Instrument Company, Arvada, CO). The same solutions used to test pH were used to test for calcium ion release. At the same periods, after the tubes were transferred to a new flask, the calcium ions released in the distilled water was measured using an atomic absorption spectrophotometer (H1170 Hilger & Watts; Rank Precision Industries Ltd. Analytical

Division, London, UK). The concentration of calcium ions released from the materials was quantified using a calcium hollow cathode lamp (422.7-nm wavelength and 0.7-nm window) operated at 20 mA. The readings of calcium ion release were compared with a standard curve obtained from multiple dilutions of pure calcium in ultrapure water.

### **Radiopacity**

Five specimens, measuring 10 mm diameter by 1.0 mm thickness, were made for each tested material. The specimens were stored at 37°C for 24 h and subsequently they were positioned on five occlusal radiographic films (Insight-Kodak Comp, Rochester, NY, USA) and exposed, along with an aluminum stepwedge with variable thickness (from 2 to 16 mm, in 2-mm increments). A GE-1000 X-ray unit (General Electric, Milwaukee, WI, USA) operating at 50 kVp, 10 mA, 18 pulses/s, and focus-film distance of 33.5 cm was used. The films were processed in a standard automatic processor (Dent-X 9000, Dent-X, Elmsford, USA). Radiographs were digitized using a desktop scanner (SnapScan 1236-Agfa, Deutschland) and the digitized images were imported to the Image Tool 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, Texas, USA); an equal-density tool was used to identify equal-density areas in the radiographic images according to the methodology previously described [6].

### **Setting time**

This test was carried out as determined by #57 of American Dental Association (ADA) [19] and C266-03 of American Society for Testing and Materials (ASTM) [20]. Six specimens measuring 10mm diameter and 2mm in height were made per each material. The initial and final setting times of the materials were determined using the Gilmore needles weighing 100 g and 456 g, respectively, according to the methodology previously described [21]. The initial and final setting times were determined by the arithmetic mean of six repetitions of the test for each group.

### **Compression Strength**

To test the compression strength, specimens measuring 12mm in height by 6mm in diameter were made according to previous study [10]. Six specimens were used in each group; these specimens were maintained at 37 °C under 100% relative humidity until the tests were performed. The specimens were subjected to testing at 24 hours and at 21 after-manipulation of the cements using a universal testing machine (EMIC DL 2000, Curitiba, PR,

Brazil), at a speed of 0.5 mm/min and load of 5 kN. All measurements were recorded in kg and converted to megapascal (MPa).

### **Tissue reaction**

The research protocol on animal use of this study was authorized by the Ethical Committee for Animal Research of the São Paulo State University, Brazil (CEUA n° 26/2010-Araraquara Dental School-UNESP). Fifty two male Holtzman rats (*Rattus norvegicus albinus*), weighing  $250 \pm 10$  g were used. The rats were maintained in individual stainless steel cages under 12:12 light-dark cycle at controlled temperature ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $55 \pm 10\%$ ), with food and water provided *ad libitum*.

The animals were distributed into four groups according the tested materials. The polyethylene tubes (Embramed Ind. Com., Sao Paulo, SP, Brazil) with 10.0 mm length and 1.6 mm diameter, previously sterilized with ethylene oxide, were filled with white Portland cement (PC group), white Portland cement with bismuth oxide (PC+BO group), white Portland cement with microparticulated zirconium oxide (PC+ZrOmicro group) and white Portland cement with nanoparticulated zirconium oxide (PC+ZrOnano group); the cements were prepared as described above and the polyethylene tubes were immediately implanted into the dorsal subcutaneous connective tissue. The empty tubes were used as control (control group).

The animals were anaesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (80 mg/kg of body weight) combined with xylazine (4 mg/kg of body weight). The dorsal skin was shaved and disinfected with 5% iodine solution. Subsequently, a 20 mm-long incision was made using a scalpel (n° 15, Fibra Cirurgica, Joinville, SC, Brazil) and two polyethylene tubes filled with different materials were placed into the subcutaneous pocket. After 7, 15, 30, and 60 days of implantation, the tubes surrounded by connective tissue were removed and the specimens were processed for paraffin embedding.

### **Histological procedures**

The specimens containing the implanted polyethylene tubes were fixed in 4% formaldehyde (prepared from paraformaldehyde) buffered at pH 7.2 with 0.1M sodium phosphate for 48 h at room temperature. Subsequently, the specimens were dehydrated and embedded in paraffin. Sagittal sections, 6  $\mu\text{m}$  thick, were stained with hematoxylin & eosin (H&E) for morphological analysis. HE-stained sections were also used to estimate the number of inflammatory cells in the capsule. Sections were submitted to the von Kossa histochemical method, for detection of calcified structures in the connective tissue adjacent to

the implanted materials. Sections were also adhered to silanized slides for immunohistochemical detection of interleukin-6 (IL-6).

**- Numerical density of inflammatory cells**

The numerical density of inflammatory cells (IC) was undertaken using a light microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan) and an image analysis system (Image Pro-Express 6.0, Olympus) as previously described [22]. From each implant, three H&E-stained sections of the connective tissue (capsule) in close juxtaposition to the opening of the implanted tube were used. The shortest distance between the sections was 100  $\mu\text{m}$ . In each section, a standardized field of 0.09  $\text{mm}^2$  of the capsule adjacent to the opening of the tube implanted was analyzed, totaling 0.27  $\text{mm}^2$  per implant. In each area, the total number of IC was counted using the image analysis system at 695x magnification; in each implant, the values were divided by the total area, and then, the number of inflammatory cells/ $\text{mm}^2$  was obtained.

**- Interleukin-6 immunohistochemistry**

For antigen retrieval, deparaffinized sections were immersed in 0.001 M sodium citrate buffer pH 6.0 and submitted to microwave oven cycles for 20 min at 90-94 °C. After a cooling-off period, the sections were washed and the endogenous peroxidase was blocked with 5% hydrogen peroxide for 20 min. After washings in 0.1M sodium phosphate buffer (PBS) pH 7.2, the sections were incubated with 2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Chemie, Germany) for 30 min at room temperature. Subsequently, the sections were incubated overnight at 4 °C with goat primary anti-IL-6 antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA), diluted 1:400. After washings in PBS, the immunoreaction was detected by the Labelled StreptAvidin-Biotin system (LSAB-plus Kit; Dako, USA). After incubation for 20 min at room temperature with multi-link solution containing biotinylated mouse/rabbit/goat antibodies, the sections were washed in PBS and subsequently were incubated with streptavidin-peroxidase complex for 20 min at room temperature. Peroxidase activity was revealed by Betazoid DAB (Biocare Medical, USA) for 3 min; the sections were counterstained with Carazzi's hematoxylin. As negative controls, the primary antibody was replaced by non-immune serum.

**- Numerical density of IL-6-immunolabeled cells**

The number of IL-6-immunolabeled cells per  $\text{mm}^2$  of the connective tissue adjacent to the opening of the tube implanted was obtained. The number of IL-6-immunolabeled cells in the capsule was counted at 695x using an image analysis system

(Image Pro-Express 6.0, Olympus). For each tube implanted, the IL-6 positive cells were counted in a standardized area ( $0.09 \text{ mm}^2$ ); in each group ( $n=5$ ), the values were divided by the total area, and then, the number of IL-6/ $\text{mm}^2$  was obtained.

#### ***- von Kossa histochemical reaction***

The von Kossa method was used for detection of calcified structures [22-24] in the capsule formed on the opening tube. Three sections per implant were selected at intervals of at least  $100 \mu\text{m}$ . Deparaffinized sections were immersed in 5% silver nitrate solution for 1 h; the sections were washed in distilled water and subsequently were immersed in 5% sodium thiosulfate during 5 min. After washings the sections were stained by picrosirius method for 1 h and mounted in resinous medium. Some sections were immersed in 10% EDTA solution and subsequently submitted to the von Kossa method. As positive control, the sections of tibiae of young rats were used.

#### **Statistical analysis**

The differences between the groups were statistically analyzed by the SigmaStat 2.0 software (Jandel Scientific, Sausalito, CA). The data of all physiochemical tests and of the morphometrical findings were submitted to ANOVA and Tukey test. The significance level accepted was  $p \leq 0.05$ .

### **Results**

#### **Analyses of the pH and calcium release**

The solutions of the materials evaluated were alkaline and the pH varied from 9.32 to 10.41 in all periods. In the period of 1 day, statistical differences were not found among materials. On the other hand, the pH of solution containing PC+BO was significantly smaller in comparison to other groups at 7, 14 and 28 days (Table 1).

According to Table 2, small amount of calcium ions released by materials was verified in the period of 1 day; statistical significant differences were not detected among the materials. From the 7 to 14 days, a significant increase in the amount of calcium released was verified in all materials. However, the amount of calcium released by PC+BO was significantly lower in comparison to other materials at 7, 14 and 28 days.

**TABLE 1** - Means and standard deviations of pH values for the different materials in the evaluation periods

	PC	PC+BO	PC+ZrO micro	PC+ZrO nano
<b>1 d</b>	10.36 (0.32) <sup>a</sup>	10.31 (0.29) <sup>a</sup>	10.41 (0.33) <sup>a</sup>	10.38 (0.35) <sup>a</sup>
<b>7 d</b>	10.29 (0.09) <sup>a</sup>	9.66 (0.53) <sup>b</sup>	10.15 (0.39) <sup>a</sup>	10.24 (0.21) <sup>a</sup>
<b>14 d</b>	9.88 (0.17) <sup>a</sup>	9.53 (0.41) <sup>b</sup>	9.84 (0.29) <sup>a</sup>	9.94 (0.22) <sup>a</sup>
<b>28 d</b>	9.88 (0.06) <sup>a</sup>	9.32 (0.21) <sup>b</sup>	9.72 (0.28) <sup>a</sup>	9.97 (0.35) <sup>a</sup>

\*mean (standard deviation)

The same letters superscripts in the lines indicate statistically similar results for the materials ( $p>0.05$ ).

**TABLE 2** - Means and standard deviations of calcium ion release (mg/L) of the materials in the periods evaluated

	PC	PC+BO	PC+ZrO micro	PC+ZrO nano
<b>1d</b>	3.13 (1.47) <sup>a</sup>	2.73 (0.70) <sup>a</sup>	2.44 (0.43) <sup>a</sup>	2.45 (0.49) <sup>a</sup>
<b>7d</b>	11.92 (0.83) <sup>a</sup>	7.74 (1.01) <sup>b</sup>	11.00 (1.46) <sup>a</sup>	10.61 (1.26) <sup>a</sup>
<b>14 d</b>	10.90 (1.83) <sup>a</sup>	9.12 (0.90) <sup>b</sup>	12.74 (2.10) <sup>a</sup>	11.77 (2.03) <sup>a</sup>
<b>28 d</b>	11.61 (3.26) <sup>a</sup>	8.06 (1.32) <sup>b</sup>	9.19 (1.07) <sup>a</sup>	9.11 (1.20) <sup>a</sup>

\*mean (standard deviation)

The different letters in the lines indicate significant differences among materials ( $p\leq 0.05$ ).

### Radiopacity

The radiopacity of PC was significantly lower than the other materials. Statistical differences were not detected among PC+OB, PC+ZrOmicro and PC+ZrOnano materials (Table 3).

**Table 3** - Means and standard deviations of radiopacity (mm Al) of the materials

Materials	Radiopacity
PC	1.32 (0.09) <sup>a</sup>
PC+BO	4.45 (0.37) <sup>b</sup>
PC+ZrOmicro	4.12 (0.34) <sup>b</sup>
PC+ZrOnano	4.12 (0.23) <sup>b</sup>

\*mean (standard deviation)

Different letters indicate statistically significant differences ( $p<0.05$ ).



## Setting time

Portland cement presented a significantly shorter initial and final setting times in comparison to other materials. Statistical significant differences in the initial and final setting times were not found among PC+ZrOmicro, PC+ZrOnano and PC+OB (Table 4).

**TABLE 4** - Means and standard deviations for the initial and final setting times (in minutes) for each material

	PC	PC+BO	PC+ZrO micro	PC+ZrO nano
<b>Initial</b>	31.0 (3.2) <sup>a</sup>	38.5 (4.3) <sup>b</sup>	45.5 (3.3) <sup>b</sup>	48.8 (5.7) <sup>b</sup>
<b>Final</b>	120.2 (2.4) <sup>a</sup>	167.8 (4.9) <sup>b</sup>	175.8 (7.0) <sup>b</sup>	169.0 (9.0) <sup>b</sup>

\*mean (standard deviation)

Different superscript letters (a, b, and c) indicate a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

## Compression Strength

After 24 hours and 21 days, the PC exhibited the highest compression strength values compared with other groups. On the other hand, the lowest compression strength mean was verified in the PC+BO. Statistical differences were not detected between PC+ZrOmicro and PC+ZrOnano groups. Moreover, an increase in the compression strength mean values was seen in the period of 21 days in comparison to 24 hours in all materials (Table 5).

**Table 5** - Means and standard deviations for compressive strength values (in MPa) at 24 hours and at 21 days after manipulation of each material

	PC	PC+BO	PC+ZrO micro	PC+ZrO nano
<b>24h</b>	41.22±3.40 <sup>a</sup>	10.96±1.53 <sup>b</sup>	34.23±3.47 <sup>c</sup>	31.50±4.23 <sup>c</sup>
<b>21d</b>	63.29±4.90 <sup>a</sup>	21.82±3.29 <sup>b</sup>	48.93±4.33 <sup>c</sup>	50.44±5.49 <sup>c</sup>

\*mean (standard deviation)

Different superscript letters (a, b, and c) indicate a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

## Tissue reaction

### *-Morphological findings and numerical density of inflammatory cells*

At 7 days, a moderate inflammatory process in the capsule juxtaposed to the tubes filled with PC, PC+BO, PC+ZrOmicro or PC+ZrOnano (Figs. 1A-1D) as well as adjacent to the opening of the empty tubes implanted in the subcutaneous tissue (control group) was seen. The inflammatory process contained mainly lymphocytes and macrophages which were present by throughout the capsule as well as several blood vessels (Figs. 1A-1D).

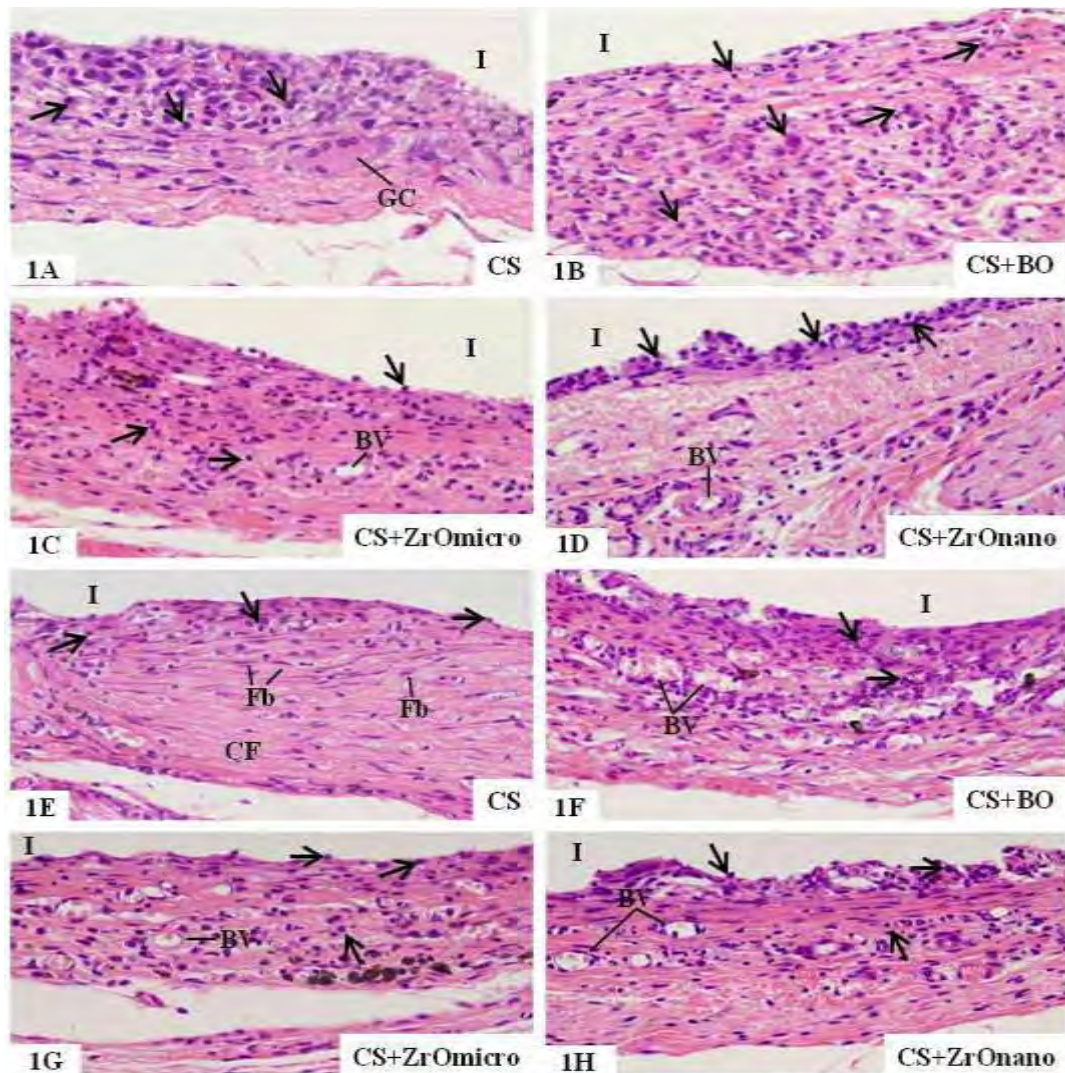
Occasionally, some multinucleated giant cells amongst inflammatory cells were also observed in the capsules (Figs. 1A and 1C). At 7 days, the highest numerical density of inflammatory cells was verified in the capsules of all groups; a gradual and significant reduction in the number of inflammatory cells was verified in the subsequent periods (Table 6).

At 15 days, the inflammatory cells were present in close juxtaposition to the materials implanted and next to the blood vessels, except in the PC+BO group; in this group, numerous inflammatory cells were still seen dispersed by capsule (Figs. 1E-1H). Some multinucleated giant cells were observed in the innermost portion of the capsules, i.e., in close contact to the materials (Figs. 1F and 1H).

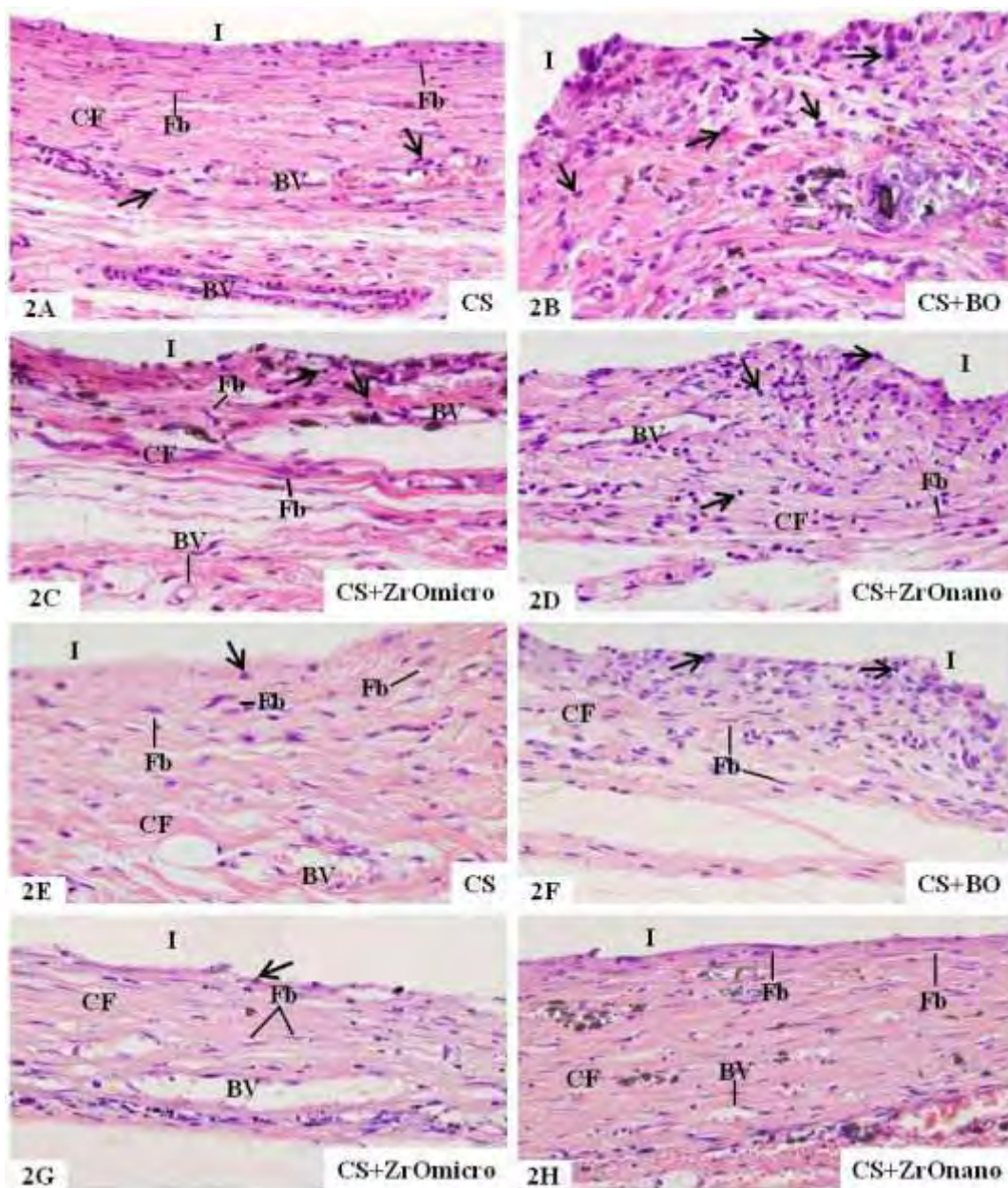
On 30 day, the capsule adjacent to PC exhibited well-defined bundles of collagen fibers amongst the fibroblasts; few inflammatory cells were present (Fig. 2A). Statistical difference in the number of inflammatory cells was not verified between PC and control groups (Table 6). Otherwise, several macrophages and plasma cells were present in the capsule of the PC+BO implants (Fig. 2B). Although the number of inflammatory cells was significantly lower in the capsules of PC+ZrOmicro and PC+ZrOnano groups in comparison to PC+BO group (Table 6), these capsules did not exhibit collagen fibers so well-arranged as observed in PC group (Figs. 2A, 2C and 2D).

Usually, the capsules exhibited typical bundles of collagen fibers amongst fibroblasts at 60 days (Figs. 2E-2H). In the PC+BO group, the inflammatory cells were present mainly in the innermost portion of the capsule (Fig. 2F). Some small material particles were occasionally seen dispersed amongst fibroblasts and collagen fibers in the capsules of PC+ZrOmicro and PC+ZrOnano groups (Figs. 2G and 2H).

According to Table 6, the highest numerical density of inflammatory cells was verified in the capsule adjacent to PC+BO in all periods. The capsule adjacent to PC exhibited a significant reduction in the number of inflammatory cells in comparison to the PC+ZrOmicro and PC+ZrOnano groups. At 30 and 60 days, statistical differences in the number of inflammatory cells were not verified between the PC and control groups. In all periods, statistical differences in the number of inflammatory cells were not detected between the PC+ZrOmicro and PC+ZrOnano groups.



**Figures 1A-1H** – Light micrographs of sections showing portions of capsule adjacent to the opening of the tubes implanted (I) in the subcutaneous tissue of the CS (1A and 1E), CS+BO (1B and 1F), CS+ZrOmicro (1C and 1G) and CS+ZrOnano (1D and 1H) groups at 7 days (A-D) and 15 days (E-H). **Fig. 1A** (CS) – several inflammatory cells (arrows) are seen, mainly, in the inner portion of the capsule adjacent to CS. GC, giant cell. 200x. **Fig. 1B** (CS+BO) – numerous inflammatory cells (arrows) are distributed by throughout capsule. 200x. **Figs. 1C** (CS+ZrOmicro) and **1D** (CS+ZrOnano) – the capsules show several inflammatory cells (arrows) amongst blood vessels (BV). Note that in the CS+ZrOnano group, the inflammatory cells (IC) are present, mainly, in the inner portion of the capsule in close juxtaposition to material. 190x; 190x. **Fig. 1E** (CS) – the capsule is composed by fibroblasts (Fb) amongst the collagen fibers (CF); the inflammatory cells (arrows) are seen adjacent to CS. 190x. **Figs. 1F** (CS+BO), **1G** (CS+ZrOmicro), **1H** (CS+ZrOnano) – the capsules exhibit several inflammatory cells (arrows) and various blood vessels (BV) distributed by the connective tissue. 190x; 190x; 190x; 190x; 200x; 200x. H&E.



**Figures 2A-2H** - Light micrographs of sections showing portions of capsule adjacent to the opening of the tubes implanted (I) in the subcutaneous tissue of the PC (2A and 2E), PC+BO (2B and 2F), PC+ZrOmicro (2C and 2G) and PC+ZrOnano (2D and 2H) groups at 30 days (A-D) and 60 days (E-H). **Fig. 2A (PC)** – the capsule contains various fibroblasts (Fb) amongst the collagen fiber bundles (CF); the inflammatory cells (arrows) are mainly observed next to the blood vessels (BV). 190x. **Fig. 2B (PC+BO)** – numerous inflammatory cells (arrows) are presented by throughout of the thick capsule. 200x. **Figs. 2C (PC+ZrOmicro) and 2D (PC+ZrOnano)** – the inner portion of the capsule exhibits some collagen fiber bundles (CF) amongst the fibroblasts (Fb); inflammatory cells (arrows) are seen adjacent to the materials implanted and near to the blood vessels (BV). 200x; 180x. **Figs. 2E-2H** – the capsules adjacent to the materials implanted exhibit several fibroblasts (Fb) amongst the collagen fiber bundles (CF); blood vessels (BV) are also present in the connective tissue. Note that evidente presence of inflammatory cells (arrows) in the capsule adjacent to PC+BO. 210x; 190x; 190x. H&E.

### - Numerical density of IL-6-immunolabeled cells

Sections submitted to immunohistochemistry for IL-6 detection showed positive immunolabeling (brown-yellow color) in the cytoplasm of some cells in the capsule adjacent to tubes implanted in all periods (Figs. 3A-3H). According to Table 6, the number of IL-6 immunolabeled cells was statistically higher at 7 days and, subsequently, a significant and gradual reduction was verified at 15, 30 and 60 days. In all periods, the number of IL-6 positive cells was significantly reduced in the capsule of control group in comparison to the materials implanted, except in the PC; in this group, the number of immunolabeled cells was similar to the control group in the periods of 15 and 30 days. On the other hand, the highest numerical density of IL-6 positive cells was verified in the capsule of PC+BO group, in all periods. At 15 and 60 days, the number of immunolabeled cells in the capsule adjacent to PC+ZrOmicro was statistically lower than in the PC+ZrOnano group; significant difference was not verified in the periods of 7 and 30 days. Moreover, no statistical difference was detected among PC, PC+ZrOmicro and PC+ZrOnano groups in the period of 7 days. In all groups, scarce cells immunolabeled were present in the capsules after 60 days of implantation (Figs. 3E-3H). Immunoreaction for IL-6 was not observed in the negative control sections (data not shown).

**TABLE 6** – Numerical density of inflammatory cells (IC) and number of IL-6 immunolabeled cells per mm<sup>2</sup> in the capsule adjacent to the different materials and control group

	PC	PC+BO	PC+ZrOmicro	PC+ZrOnano	Control
<b>7 days</b>					
IC	531.3 (19.1) <sup>a,1</sup>	699.6 (6.0) <sup>b,1</sup>	621.0 (17.1) <sup>c,1</sup>	626.1 (12.5) <sup>c,1</sup>	453.9 <sup>d,1</sup> ± 7.2
IL-6	404.4 (6.0) <sup>a,1</sup>	491.1 (9.2) <sup>b,1</sup>	408.8 (14.4) <sup>a,1</sup>	413.3 (14.4) <sup>a,1</sup>	371.1 <sup>c,1</sup> ± 23.0
<b>15 days</b>					
IC	409.8 (3.3) <sup>a,2</sup>	563.4 (6.1) <sup>b,2</sup>	515.7 (11.1) <sup>c,2</sup>	514.5 (9.9) <sup>c,2</sup>	389.4 <sup>d,2</sup> ± 12.4
IL-6	148.8 (20.1) <sup>a,2</sup>	200.0 (11.1) <sup>b,2</sup>	168.8 (9.2) <sup>c,2</sup>	191.1 (9.2) <sup>b,2</sup>	151.1 <sup>a,2</sup> ± 18.5
<b>30 days</b>					
IC	374.7 (6.6) <sup>a,3</sup>	463.5 (17.7) <sup>b,3</sup>	416.4 (22.2) <sup>c,3</sup>	425.1 (26.4) <sup>c,3</sup>	368.4 <sup>a,3</sup> ± 13.7
IL-6	84.4 (6.0) <sup>a,3</sup>	135.5 (14.4) <sup>b,3</sup>	102.2 (9.2) <sup>c,3</sup>	106.6 (6.0) <sup>c,3</sup>	84.4 <sup>a,3</sup> ± 6.0
<b>60 days</b>					
IC	197.4 (13.2) <sup>a,4</sup>	272.1 (8.1) <sup>b,4</sup>	225.3 (9.0) <sup>c,4</sup>	229.8 (10.2) <sup>c,4</sup>	194.7 <sup>a,4</sup> ± 16.4
IL-6	62.2 (2.8) <sup>a,4</sup>	91.1 (3.1) <sup>b,4</sup>	62.2 (2.0) <sup>a,4</sup>	82.2 (0.2) <sup>c,4</sup>	53.3 <sup>d,4</sup> ± 5.4

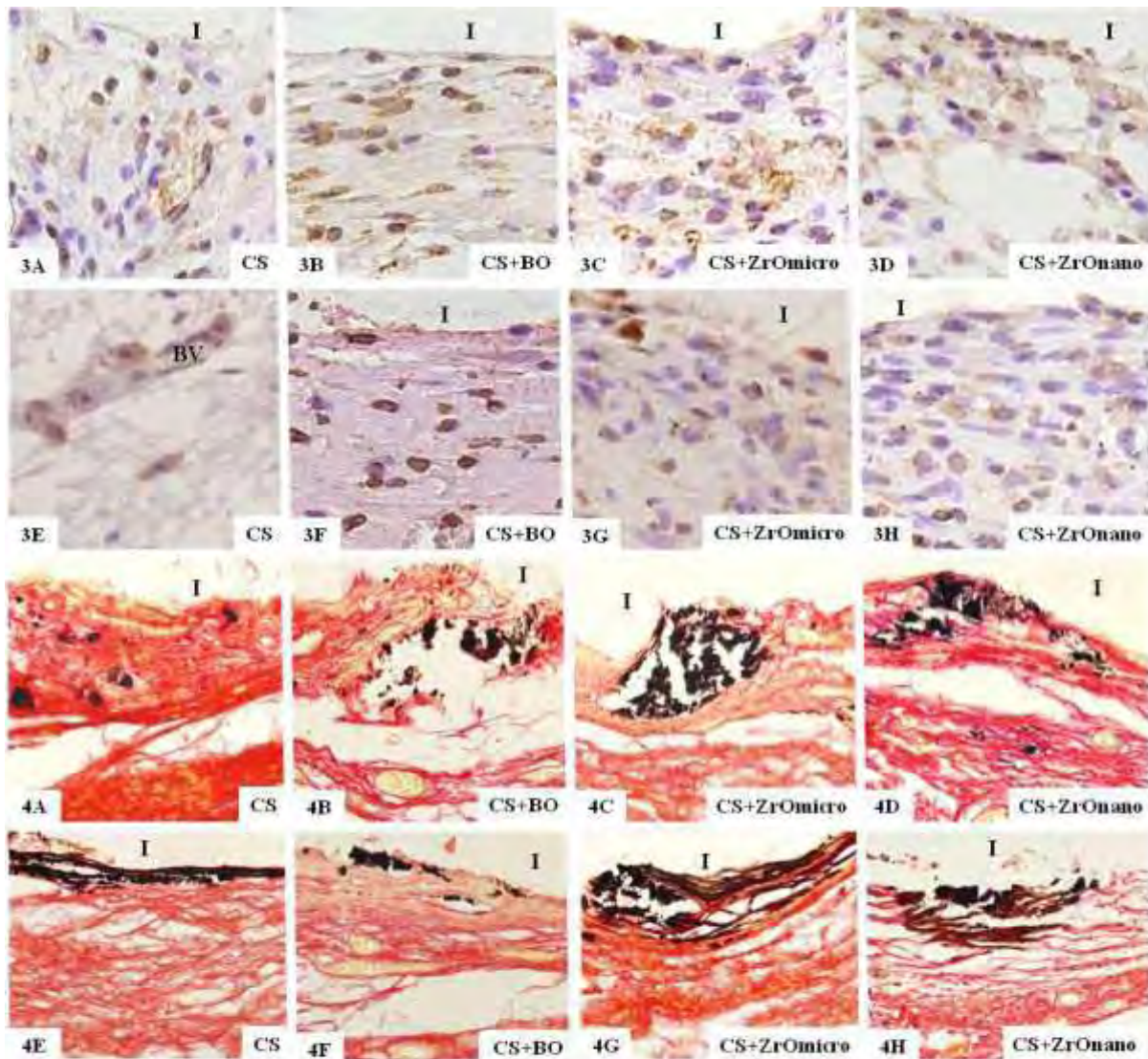
\*mean (standard deviation)

The comparison amongst periods (p<0.05) is indicated by number superscripts in the various columns.

The comparison amongst groups (p<0.05) is indicated by different superscript (a, b, c) in the various lines.

***-von Kossa histochemical method***

Examination of sections submitted to von Kossa method revealed black stained structures in the capsule juxtaposed to the materials implanted, in all experimental periods. Dense structures strongly von Kossa positive were often observed in the innermost portion of the capsule (Figs. 4B, 4C, 4E-4H); small and black structures dispersed by throughout capsule were also found (Figs. 4A and 4D). Sections of developing long bone, used as positive control, exhibited black bone trabeculae in the diaphysis. Moreover, no von Kossa-positive structure was found in the capsule of control group (data not shown).



**Figures 3A-3H** - Light micrographs of sections showing portions of capsule adjacent to the opening of the tubes implanted in the subcutaneous tissue at 7 days (Figs. 3A-3D) and at 60 days (Figs. 3E-3H). The sections were submitted to immunohistochemistry for detection of IL-6 (brown-yellow color) and counterstained by hematoxylin. IL6-immunolabeling (arrows) is observed in the cells of the capsule adjacent to the different materials implanted. 500x.

**Figures 4A-4H** - Light micrographs of sections showing portions of capsule adjacent to the opening of the tubes implanted in the subcutaneous tissue at 7 days (Figs. 4A-4D) and 60 days (Figs. 4E-4H). The sections were submitted to the von Kossa reaction and counterstained by picosirius. Small and dense von Kossa-positive structures (black color) are dispersed by throughout capsule (Fig. 4A and Fig. 4D). Structures von Kossa-positives with irregular-shaped are in the inner portion of the capsules (Figs. 4B-4D, 4G and 4H). Fig. 4E - a continuous layer strongly von Kossa-positive is observed in close contact with material. Fig. 4F - small and dense structures von Kossa-positive are present in the capsule surface. 220x.

## Discussion

MTA is composed by 20% of bismuth oxide (BO) used as radiopacifier to allow that this material is easily distinguishable from anatomical structures on a radiograph [3,4]. Although BO confers a good radiopacity to MTA, this radiopacifier interferes in some properties of Portland cement [8,11,12]. So, other radiopaque materials, such as zirconium oxide (ZrO), have been evaluated in association to PC. Studies have been reported that zirconium oxide provides an adequate radiopacity [5,6] as well as promotes the release of calcium ions and an alkaline pH [7]. In the present study, we investigated some physicochemical properties, such as pH, release of calcium ions, radiopacity, setting time and compressive strength, and the biocompatibility of PC added to 30% of ZrO microparticulated and nanoparticulated.

### *- Physicochemical analyses*

Our results clearly indicated that zirconium oxide microparticulated or nanoparticulated provides satisfactory physicochemical properties when added to the Portland cement. Moreover, the zirconium oxide improved the compressive strength of the mixture when compared to BO.

The tested materials with addition of BO or ZrO exhibited radiopacity significantly higher than Portland cement and superior to the minimum value recommended by the ISO [25]. Moreover, all materials were able to release calcium ions mainly after 7, 14 and 28 days. However, the means values of the PC+ZrOmicro and PC+ZrOnano were statistically similar to PC indicating that the addition of 30% micro or nanoparticulated ZrO to PC does not affect the calcium ion release. Evidence suggests that ZrO does not react with Portland cement and, consequently, there is no interference with the calcium ions [15]. On the other hand, the bismuth oxide (BO) binds to calcium ions of the Portland cement forming part of the structure of the calcium silicate hydrate [9]. Therefore, it is conceivable to suggest that the amount of available calcium ions may be reduced due to this reaction. This hypothesis could explain, at least in part, the amount significantly lower of calcium ions released from PC+BO group in comparison to PC, PC+ZrOmicro and PC+ZrOnano groups found at 7, 14 and 28 days. In these periods, the analysis of PC+BO solution exhibited a significantly lower pH in comparison to other groups reinforcing the idea, therefore, that bismuth oxide interferes with chemical properties of Portland cement. Considering that BO reacts with Portland cement forming a calcium silicate hydrate gel, it has been suggested that BO might also reduce the precipitation of calcium hydroxide resulting in lower alkalinity of



the PC+BO solutions [9]. In contrast, the PC+ZrO solutions exhibited pH similar to the PC solution indicating that zirconium oxide does not react with the PC [15] and, thereby, does not interfere in the free ions release by PC. In fact, there is evidence that zirconium oxide is more stable than bismuth oxide acting as an inert filler material, i.e., does not interfere with reaction of Portland cement [15].

The addition of radiopacifiers increased the setting time of PC, as observed in other studies [7,14,26]. It is possible that the increase in the setting time around 30% caused by zirconium oxide (microparticulated and nanoparticulated) and bismuth oxide added to Portland cement may be due to the presence of smaller amount of cement in these mixtures [9,14]. It has been reported that root-end filling materials with long setting time are more prone to dissolution during and after endodontic surgery, whereas those with extremely short setting time might show technical difficulties during clinical application [7,27]. All materials exhibited higher resistance to compression at 21 days in comparison to 24 hours after their manipulation. It has been suggested that this increase occurs due to the final setting time that provides stability over time to the material [28]. Although significant reduction in the resistance to compression was promoted by ZrO and BO associated to Portland cement, the loss of compressive strength caused by zirconium oxide was around 20% while of the bismuth oxide was around 65% in comparison to pure Portland cement. In accordance to previous studies, our findings showed clearly that the bismuth oxide reduces the compressive strength of the Portland cement [8,10,11] reinforcing the idea, therefore, that bismuth oxide interferes in the Portland cement reaction [9,11]. It has been demonstrated that bismuth oxide does not participate in the hydration reaction of Portland cement [9] resulting in the porosity increase and high solubility of this material. Thus, the bismuth oxide promotes flaws in the Portland cement matrix formation and, consequently, reduces the mechanical strength of the cement [8]. In the present study, loss in the compressive strength was also verified in the Portland cement associated to 30% zirconium oxide. However, no interference in the compressive strength was observed in the addition of 20% zirconium oxide to Portland cement [10]. Considering that Portland cement provides resistance to the material [8], it is conceivable to suggest that higher amount of PC present in the mixture could explain these controversial findings. On the other hand, a similar mixture to that used in the present study (30% ZrO+PC) did not affect the compressive strength of the Portland cement [14] suggesting that the trademark of the PC and ZrO may also interfere in the reaction mechanism.

### **- Tissue reaction**

Our morphological and morphometrical findings clearly showed that zirconium oxide is a radiopacifier agent which induces lower reaction inflammatory than bismuth oxide. In all periods analyzed, a significant reduction in the number of inflammatory cells in the capsule juxtaposed to Portland cement associated to zirconium oxide was observed in comparison to Portland cement with bismuth oxide. In addition, the zirconium oxide promoted a reduced immunoexpression for IL-6, a proinflammatory cytokine, by cells of the capsule surrounding the tubes implanted with PC+ZrO in comparison to PC+BO.

Considering that the empty polyethylene tubes implanted in the subcutaneous induced a moderate inflammatory reaction, it is possible to establish that, at least in part, the traumatic injury may be responsible by recruitment of inflammatory cells observed in the capsule. However, the tubes filled with materials promoted a higher recruitment of inflammatory cells indicating, therefore, that these materials may release some substances which stimulate the migration and differentiation of these cells such as macrophages and plasma cells, observed often in the capsule of the all materials. Thus, the reaction products of the materials may be responsible by significant increase in the number of inflammatory cells in the capsule adjacent to the materials in comparison to empty tubes (control group) verified mainly in the initial periods (7 and 15 days). In addition, no significant difference in the inflammatory reaction was detected in the Portland cement and control groups, in the periods of 30 and 60 days, reinforcing the idea that the Portland cement is a biocompatible material [13,22,29].

During the reaction of Portland cement, occurs release of hydroxil (OH<sup>-</sup>) promoting, in the microenvironment, an increase in the pH (pH around 10). There are evidence that alkaline pH may stimulate the recruitment of inflammatory cells and the production of inflammatory cytokines and chemokines [30] which promote enhancement of leucocyte adhesion to endothelial walls, potentiation of neutrophilis and differentiation of plasma cell [30,31]. Thus, it is possible that the elevated pH exhibited by Portland cement may be responsible, at least in part, for the high number of inflammatory cells observed in the period of 7 days.

It has been reported that intensity and progression of the inflammatory process is influenced by several systemic, local and environmental factors. In addition, the inflammatory process involves a complex and coordinated cascade of cellular and molecular events that culminate with production and released of several cytokines [32-34]. Among these cytokines, interleukin-6 (IL-6) is a proinflammatory cytokine that can activate and

modulate specific cells and, therefore, exerts an important role in the inflammatory reaction [34]. Thus, IL-6 has been associated with inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis [35], periodontal diseases [36] and endodontic lesions [37-39]. A high IL-6 level has been shown in periapical lesions [37] and in dental granulomas [39]. In IL-6 knock-out mice, an increase in the periapical bone resorption has been demonstrated [38] reinforcing, therefore, the idea that IL-6 is involved in the periodontal inflammatory process. Additionally, it is known that IL-6 stimulates the osteoclast formation, differentiation and activity [40] and, consequently, high levels of this interleukin can stimulate bone resorption.

In fact, our immunohistochemical findings revealed cells of the capsule strongly immunolabeled for IL-6 in all periods. However, the pattern of IL-6 immunolabeling varied among the groups. Usually, a significantly lower number of IL-6 immunolabeled cells was verified in the capsule of control group, whereas an increase was seen in the capsule adjacent to the Portland cement associated with radiopacifier agents (PC+BO and PC+ZrO). There is strong evidence that IL-6 may stimulate the production of metalloproteinases leading to tissue degradation [41]. Thus, the gradual and significant reduction in the IL-6 immunolabeled cells suggests that the capsule adjacent to the tubes implanted is undergoing an intense remodelling process in the initial periods. In addition, the significant reduction in the numerical density of inflammatory cells and the presence of well-oriented collagen fibers bundles in the capsule indicates that initial inflammatory reaction was almost totally replaced, in the period of 60 days, by a dense connective tissue.

Considering that biocompatibility of the materials depends on the components released and our results revealed that bismuth oxide associated to Portland cement promoted the highest inflammatory reaction and IL-6 immunolabeled cells, it is possible that the bismuth oxide may be released and acts as an irritant substance. It has been demonstrated that bismuth oxide does not take part in the hydration reaction of Portland cement leading to formation of flaws in the cement [8,15]. Additionally the bismuth oxide increases the solubility of the Portland cement [7,27]. Our results showed that bismuth oxide significantly increase the final setting time of the Portland cement, suggesting that the irritant substances can be released for longer time, in comparison to Portland pure.

The sections submitted to von Kossa histochemical method exhibited black structures in the capsule adjacent to the tubes filled with Portland cements, with pattern similar to von Kossa-positive calcified structures described by other authors [42,22,23]. In addition, the sections of long bone from newborn rats used as positive control showed typical trabeculae bone positive to von Kossa, i.e., in black color. Thus these black structures present

in close juxtaposition to the materials as well as free in the connective tissue of the capsule may constitute globules containing calcium that were possibly released by Portland cements. Moreover, von Kossa positive structures were never seen in the capsule adjacent to the empty tubes (Control Group) reinforcing this idea that the Portland cement is responsible for formation of this von Kossa positive structures. The deposition of von-Kossa-positive calcified structures has been reported in response to Portland cement and MTA implanted in the subcutaneous tissue [22-24]. It is known that the reaction of Portland-based cements give rise to the calcium silicate hydrated gel and calcium hydroxide [9,29]. Thus, likewise calcium hydroxide, the Portland cement can release calcium ions as shown in the present study. The calcium ions can react with carbonate dioxide in the tissues giving rise to calcite crystals [43,44]. The calcite crystals act as a calcification nucleus and, therefore, could facilitate the mineralization process [43,44]. In fact, MTA induced bone-like tissue formation in perforation of pulp chamber floor experimentally created in rat molars [2]. Moreover, osteopontin was detected in the fibroblasts of the capsule surrounding the MTA and PC implanted in the subcutaneous [22]. Considering that osteopontin is a glycoprotein highly expressed in the mineralized tissues as well as pathologic calcification sites of soft tissues [31,45,46], it has been suggested that the MTA and PC could stimulate mesenchymal cells of subcutaneous tissue to express the osteoblast-like phenotype [22].

## **Conclusion**

In conclusion, our findings indicate that the association of microparticulated or nanoparticulated zirconium oxide provides satisfactory physicochemical and biological properties to the Portland cement. The similar tissue reaction promoted by microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide reinforces the idea that ZrO may not interfere in the hydration reaction of Portland cement. The ZrO may be a good alternative for use as radiopacifying agent in substitution to bismuth oxide since PC+ZrOmicro and PC+ZrOnano exhibited better compressive strength and biological behavior than PC+BO.

## **Acknowledgments**

The authors thank Mr. Luis Antônio Potenza and Mr. Pedro Sérgio Simões for technical support. This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP-01054/11-DFP), Brazil.

## References\*

- [1] Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of Endodontics* 1993;19:541-4.
- [2] Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *International Endodontic Journal* 2011;44:100-10.
- [3] Torabinejad M, White DJ, inventors. Tooth filling material and use. Loma Linda University; US patent 5 769 638. May 16, 1995.
- [4] Wucherpfennig AL, Green DB. Mineral trioxide vs Portland cement; two biocompatible filling materials. *Journal of Endodontics* 1999;25:308, Abstr. No. 40.
- [5] Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Duarte MAH. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2009;108:628-32.
- [6] Duarte MAH, El Kadre GDO, Vivian RR, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, de Moraes IG. Radiopacity of Portland Cement Associated With Different Radiopacifying Agents. *Journal of Endodontics* 2009;35:737-40.
- [7] Duarte MAH, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru-Filho M, et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics* 2012;38:394-7.
- [8] Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *Journal of Endodontics* 2007;33:295-8.
- [9] Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal* 2007;40:462-70.
- [10] Tanomaru-Filho M, Morales V, Silva GF, Bosso R, Reis JMSN, Duarte MAH, et al. Compressive strength and setting time of MTA and Portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dentistry* 2012;1-4.
- [11] Camilleri J. The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. *International Endodontic Journal* 2008;41:151-7.
- [12] Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal* 2004;37:699-704.

\* De acordo com as normas do periódico *Dental Materials*

- [13] Min KS, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU, Kim EC. Human pulp cells response to Portland cement in vitro. *Journal of Endodontics* 2007;33:163-6.
- [14] Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dental Materials* 2011;27:879-91.
- [15] Camilleri J, Cuttajar A, Mallia B. Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dental Materials* 2011;27:845-54.
- [16] Tennis P, Jennings HM. A model for two types of calcium silicate hydrate in the microstructure of Portland cement pastes. *Cement and Concrete Research* 2000;6:855-63.
- [17] Komabayashi T, Spangberg L. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyzer. *Journal of Endodontics* 2008;34:94-8.
- [18] Saghiri MA, Asgar K, Lofti M, Garcia-Godoy F. Nanomodification of mineral trioxide aggregate for enhanced physiochemical properties. *International Endodontic Journal* 2012;45:979-88.
- [19] American National Standard. American Dental Association Specification n° 57 for endodontic filling materials. Chicago: ADA; 1984.
- [20] American Society for Testing and Materials. Standard test method for time and setting of hydraulic-cement paste by Gillmore needles, ASTM C266-03. Philadelphia: ASTM; 2000.
- [21] Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru-Filho M, Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of Mineral Trioxide Aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *Journal of Endodontic* 2009;35:550-4.
- [22] Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Morphological and morphometric analysis of the biocompatibility of an experimental MTA Sealer. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* 2012;100B: 1773-81.
- [23] Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabe PFE, Costa MTM. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *Journal of Endodontics* 2009;35:256-60.
- [24] Danesh F, Tootian Z, Jahanbani J, Rabiee M, Fazelpour S, Taghva O, et al. Biocompatibility and mineralization activity of fresh or set white mineral trioxide aggregate, biomimetic carbonated apatite, and synthetic hydroxyapatite. *Journal of Endodontics* 2010;36:1036-41.

- [25] International Organization for Standardization. ISO 6876: dental root sealing materials. Geneva: The Organization; 2001.
- [26] Camilleri J. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *International Endodontic Journal* 2010;43:231-40.
- [27] Vivian RR, Ordinola-Zapata R, Zeferino MA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, et al. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 2010;110:250–6.
- [28] Islam I, Chng HK, Yap AUJ. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. *Journal of Endodontics* 2006;32:193-7.
- [29] Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Brazilian Dental Journal* 2001;12:3-8.
- [30] Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Mokhtari H, Roshangar L, Abasi MM, et al. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. *Journal of Endodontics* 2010;36:899-903.
- [31] Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Ali Saghiri M, et al. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. *Journal of Endodontics* 2008;34:715-7.
- [32] Schroder AK, Ohe M, Kolling U, Alstaedt J, Uciechowski P, Fleischer D, et al. Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. *Immunology* 2006;119:317–27.
- [33] Hrabak A, Bajor T, Csuka I. The effect of various inflammatory agents on the phagocytosis and cytokine profile of mouse and rat macrophages. *Inflammation Research* 2008;57:75–83
- [34] Nibali L, Fedele S, D’Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Disease* 2012;18:236-46.
- [35] Patel AM, Moreland MW. Interleukin-6 inhibition for treatment of rheumatoid arthritis: a review of tocilizumab therapy. *Drug Design, Development Therapy* 2010;1:236-78.

- [36] Shimada Y, Komatsu Y, Ikezawa-Suzuki I, Tai H, Sugita N, Yoshie H. The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. *Journal of Periodontology* 2010;81:1118–23.
- [37] Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endodontic and Dental Traumatology* 1999;15:26–7.
- [38] Balto K, Sasaki H, Stashenko P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infection and Immunity* 2001;69:744–50.
- [39] De Sa AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO, et al. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *International Endodontic Journal* 2007;40:563–72.
- [40] Phan TC, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histology and Histopathology* 2004;19:1325–44.
- [41] Wisithphrom K, Windsor LJ. The effects of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, and transforming growth factor-beta 1 on pulp fibroblast mediated collagen degradation. *Journal of Endodontics* 2006;32:853–61.
- [42] Katchburian E, Antoniazzi MM, Jared C, Faria FP, Souza Santos H, Freymüller E. Mineralized dermal layer of the Brazilian tree-frog *Corythomantis greeningi*. *Journal of Morphology* 2001;248:56-63.
- [43] Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of calcium hydroxide cement. *Archives of Oral Biology* 1991;36:117–28.
- [44] Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* 2005;31:97–100.
- [45] Bronckers AL, Farach-Carson MC, Van Waveren E, Butler WT. Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in the rat. *Journal of Bone and Mineral Research* 1994;9:833–41.
- [46] Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 2000;11:279–303.



# Capítulo 2

## Capítulo 2

# Óxido de nióbio microparticulado e nanoparticulado adicionado ao cimento Portland: avaliação de propriedades físicas, químicas e de biocompatibilidade

### Resumo

**Introdução:** O objetivo deste estudo foi avaliar algumas propriedades físicas e químicas e a reação tecidual promovida pelo cimento Portland branco (CP) associado ao óxido de nióbio (ONb) microparticulado ou nanoparticulado, comparando-os ao MTA.

**Métodos:** Os materiais foram submetidos aos testes de radiopacidade, tempo de presa, pH e liberação de íons cálcio. Além disso, foram implantados no subcutâneo dorsal de 30 ratos dois tubos de polietileno. Após 7, 15, 30 e 60 dias, os espécimes foram removidos, fixados e incluídos em parafina. Os cortes corados com HE foram utilizados para análise morfológica e quantificação de células inflamatórias (CI). A reação imuno-histoquímica para interleucina-6 (IL-6) foi realizada e o número de células IL-6 positivas obtido. O método von Kossa também foi realizado. A diferença entre os grupos foi analisada pela ANOVA com  $p \leq 0,05$ .

**Resultados:** O MTA apresentou maior radiopacidade enquanto que o ONb proporcionou maior tempo de presa inicial. Todos os materiais apresentaram pH alcalino e liberação de íons cálcio, sem diferenças significantes entre os grupos. Os materiais implantados induziram a formação de um processo inflamatório moderado e um maior número de células IL-6 positivas aos 7 dias sendo que houve uma redução significativa e gradual nos demais períodos. Um valor significativamente maior de CI e IL-6 positivas foi detectado adjacente ao MTA em comparação ao CP+ONb (micro e nano) em todos os períodos. O CP+ONbmicro apresentou números menores de CI e IL-6 aos 7 e 60 dias ( $p \leq 0,05$ ). Estruturas von Kossa positivas foram observadas em todos os períodos. **Conclusões:** O CP associado ao ONb (micro e nano) apresenta propriedades físicas, químicas e biológicas adequadas.

**Palavras-chave:** Mineral trióxido agregado, cimento Portland, biocompatibilidade, propriedades físicas e químicas, radiopacificadores

## Introdução

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) surgiu no início dos anos 90 com o objetivo inicial de selar comunicações entre a superfície externa do dente e o canal radicular (1). Considerando que o MTA proporciona bom selamento marginal (1,2) e apresenta biocompatibilidade (3,4), este material tem sido indicado, principalmente, como material retrobturador e no selamento de perfurações.

O bismuto, um metal pesado, é utilizado na forma de óxido de bismuto (OBi) no MTA com o objetivo de conferir radiopacidade a este material. O cimento Portland (CP), principal componente do MTA, não possui radiopacidade suficiente para ser distinguido das estruturas anatômicas adjacentes, tais como, dentina e osso alveolar, porém, a adição de 20% de OBi fornece radiopacidade suficiente ao produto. Tem sido demonstrado que o MTA disponível comercialmente apresenta um valor de radiopacidade variando de 6 a 8 mm de Al (5-7), portanto, superior ao mínimo recomendado pela ISO para materiais retrobturadores que é de 3 mm de Al (8).

Apesar de conferir radiopacidade ao MTA, há evidências de que adição de OBi diminui a resistência a compressão do material (9,10), isto porque, este radiopacificador interfere na reação de presa do CP, produzindo falhas em sua estrutura (11). Além disso, estudos demonstraram percentual de solubilidade acima do recomendado pela especificação da ANSI/ADA para materiais retrobturadores (12) no MTA disponível comercialmente (13). Duarte et al. (14), em estudo semelhante, apesar de observarem que o MTA apresenta um percentual de solubilidade dentro dos padrões estabelecidos pela ANSI/ADA (12), verificaram um valor superior em comparação ao CP adicionado ao óxido de zircônio ou ao tungstato de cálcio. Outra desvantagem frequentemente associada ao OBi está relacionada a sua biocompatibilidade; tem sido reportado que o óxido de bismuto inibe o crescimento e proliferação de células da polpa dental (15) e do ligamento periodontal (6) e também pode induzir a morte celular (16).

Assim, outros tipos de materiais com alto número atômico têm sido investigados para serem associados ao CP em substituição ao óxido de bismuto. Há evidências de que as misturas do óxido de zircônio ou do tungstato de cálcio fornecem ao cimento Portland índices de liberação de cálcio e pH semelhantes ao do MTA-Angelus; no entanto, a solubilidade do CP adicionado a estes agentes é inferior em comparação a do MTA-Angelus® (14). Já foi demonstrado que 30% de óxido de zircônio adicionado ao CP não interfere no mecanismo de hidratação deste cimento, proporcionando a liberação de íons

cálcio (17) e resultando em um material com propriedades semelhantes ao ProRoot MTA® (7).

O óxido de nióbio (ONb) tem sido utilizado na Odontologia em ligas de titânio de implantes osseointegrados devido a sua excelente biocompatibilidade e resistência a corrosão e desintegração (18,19). Além disso, foi demonstrado que o ONb tem a capacidade de promover a formação de hidroxiapatita e, portanto, constituindo-se num material bioativo (20). Tendo em vista seu número atômico de 41, superior ao zircônio, espera-se que o nióbio também apresente radiopacidade suficiente, na forma de óxido de nióbio, em associação ao CP.

Além da substituição do óxido de bismuto, estudos mostraram que a incorporação de nanopartículas melhora as propriedades físicas e químicas do MTA (21,22). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar algumas propriedades físicas, químicas e biológicas da adição do óxido de nióbio na forma microparticulada ou nanoparticulada ao cimento Portland e compará-las ao MTA.

## **Materiais e método**

No presente estudo, os materiais avaliados foram o cimento Portland branco (CP; CPB-40; Votorantin cimentos, Camargo Correa S.A., Pedro Leopoldo, MG, Brasil) associado ao óxido de nióbio (ONb) microparticulado ou nanoparticulado em uma proporção de 70% de CP e 30% de ONb. O MTA (MTA branco; Angelus, Londrina, Brasil) foi utilizado como controle. O MTA e o CP+ONb microparticulado foram manipulados utilizando 1g do pó para 0,30 mL do líquido (água destilada). O CP+ONb nanoparticulado foi manipulado utilizando-se a proporção pó/líquido de 1g/0,33mL, determinada a partir de testes realizados no Laboratório da Disciplina de Endodontia. O ONb nanoparticulado foi processado no Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil) obtendo-se um tamanho de partícula de 83 nm.

## **Radiopacidade**

Cinco espécimes, medindo 10 mm de diâmetro e 1,0 mm de espessura, foram confeccionados para cada material testado, sendo os mesmos armazenados a 37°C por 24 h. Subseqüentemente, os espécimes foram posicionados sobre cinco filmes radiográficos oclusais (Insight-Kodak Comp, Rochester, NY, EUA) e radiografados juntamente com uma escala de alumínio com espessura variável (de 2 a 16 mm, em incrementos de 2-mm). Um

aparelho de raio-X, GE-1000 (General Electric, Milwaukee, WI, EUA) operando a 50 kvp, 10 mA, 18 pulsos/s e distância foco-filme de 33,5 cm, foi utilizado. Os filmes foram processados em uma processadora automática (Dent-X 9000, Dent-X, Elmsford, EUA) e as radiografias obtidas foram digitalizadas com o auxílio de um scanner (SnapScan 1236-Agfa, Alemanha). As imagens digitalizadas foram importadas para o programa de análise de imagens Image Tool 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, Texas, EUA) onde uma ferramenta de comparação específica foi utilizada para identificar áreas de densidades iguais nas imagens radiográficas, seguindo a metodologia de Duarte et al. (23).

### **Tempo de presa**

Os testes para determinação dos tempos de presa inicial e final dos diferentes materiais foram realizados de acordo com as especificações 57 da ADA (12) e C266-03 da AST (24). Foram confeccionados seis espécimes, medindo 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, para cada material testado. Os tempos de presa inicial e final dos materiais foram determinados utilizando agulhas de Gilmore pesando, aproximadamente, 100 g e 456 g, respectivamente, seguindo a metodologia descrita por Bortoluzzi et al. (25). Os tempos de presa inicial e final foram obtidos pela média aritmética de seis repetições do teste para cada material avaliado.

### **Análise do pH e da liberação de íons cálcio**

Para os testes do pH e da liberação de cálcio, 10 tubos de polietileno, medindo 1,5 mm de diâmetro interno, foram preenchidos com os diferentes materiais imediatamente após a manipulação, colocados em frascos contendo 10 mL de água destilada e armazenados a 37° C. Após 24 horas, os tubos foram removidos e colocados em novos frascos e a água destilada foi trocada. Este procedimento foi repetido depois de cada período pré-determinado de 7, 14 e 21 dias. O pH das soluções foi analisado, em cada período, com o auxílio de um pHmetro digital previamente calibrado (Ultrabasic; Denver Instrument Company, Arvada, EUA). As mesmas soluções utilizadas para o teste do pH foram usadas no teste da liberação de íons cálcio. Nos mesmos períodos estabelecidos para o teste do pH, após os tubos terem sido transferidos para um novo frasco, a liberação de íons cálcio na água destilada foi mensurada utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica (H1170 Hilger & Watts; Rank Precision Industries Ltd. Analytical Division, London, UK). A concentração de íons cálcio liberada pelos materiais foi quantificada usando uma lâmpada de cátodo oco específica para comprimento de onda de 422,7 nm e janela de 0,7 nm, operada a 20 mA. As leituras de

cálcio foram comparadas com uma curva padrão, obtida a partir de múltiplas diluições de cálcio P.A. em água ultra pura.

### **Reação Tecidual**

O protocolo de pesquisa na experimentação animal foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista, Brasil (CEUA nº 26/2010-Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, Anexo-1). Foram utilizados 30 ratos machos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*), pesando em média 250 g, os quais foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura controlada ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e fotoperíodo de 12 horas, com ração e água *ad libitum*. Os animais foram divididos em grupos de acordo com o material testado e o período experimental. Os materiais foram manipulados e inseridos em tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro interno, previamente esterilizados com óxido de etileno. Após o preenchimento dos tubos com os materiais, estes foram imediatamente implantados no tecido conjuntivo subcutâneo dorsal.

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg de peso corpóreo) associada com xilazina (4 mg/kg de peso corpóreo). Após a tricotomia e assepsia com solução de iodo a 5% da região dorsal do animal, realizou-se uma incisão de 2 cm com uma lâmina de bisturi (nº 15, Fibra Cirurgica, Joinvile, SC, Brasil). O tecido foi divulsionado e, posteriormente, os dois tubos de polietileno preenchidos com material foram implantados, sendo um em uma posição ventral e o outro caudal. Após os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias, os tubos foram removidos juntamente com o tecido conjuntivo adjacente e preparados para análise ao microscópio de luz.

### **Processamento histológico**

Os espécimes contendo os tubos de polietileno implantados foram fixados em formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2 por 48 h em temperatura ambiente. Posteriormente, os espécimes foram desidratados e embebidos em parafina. Cortes longitudinais com espessura de 6  $\mu\text{m}$  foram aderidos as lâminas de vidro e corados com hematoxilina & eosina (H&E) para realização das análises morfológica e obtenção da densidade numérica de células inflamatórias na cápsula; cortes dos implantes foram também submetidos ao método histoquímico de von Kossa. Alguns cortes foram aderidos à lâminas silanzadas para detecção imuno-histoquímica de interleucina-6 (IL-6).

#### **- Densidade numérica de células inflamatórias**

A densidade numérica de células inflamatórias (CI) na cápsula adjacente aos materiais implantados foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz (BX51,

Olympus, Tokyo, Japão) e um sistema de análise de imagens (Image Pro-Express 6.0, Olympus), como descrito previamente (4). Em cada implante, três cortes corados com H&E foram selecionados em intervalos de, no mínimo, 100  $\mu\text{m}$ . Em cada corte, uma área padrão de 0,09  $\text{mm}^2$  do tecido conjuntivo adjacente à abertura do tubo foi capturada com a objetiva de 40x. Em cada área, o número total de CI foi quantificado utilizando o sistema de análise de imagens. Assim, o número de células inflamatórias foi computado numa total de 0,27  $\text{mm}^2$  de cápsula/implante; em cada implante, os valores foram divididos pela área total obtendo-se, assim, o número de CI/ $\text{mm}^2$  da cápsula.

#### **- Reação imuno-histoquímica para detecção de interleucina-6**

Para a detecção de interleucina-6 foi utilizado o anticorpo primário anti-IL-6 produzido em cabra (anti-IL-6, Santa Cruz®, EUA). Após desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001M (pH 6,0) e submetidos ao tratamento com micro-ondas, durante 30 minutos a temperatura de 90-94 °C. Após o resfriamento e inativação da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3%, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-IL-6 (titulação 1:400) em câmara úmida a 4° C durante 16 horas. Após a lavagem em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo/rato/cabra biotilado (Kit Dako LSAB+ System-HRP, Dako, USA) por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-peroxidase durante 30 minutos. Subsequentemente, os cortes foram lavados com tampão Tris-HCl, a atividade da peroxidase foi revelada com solução de 3,3-diaminobenzidina (Betazoid DAB Chromogen Kit – Biocare Medical, USA) durante 2-3 minutos. Após a lavagem em água corrente e água destilada, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Carazzi. No controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por soro não imune.

#### **Densidade numérica de células IL-6 positivas**

A fim de verificar se há diferenças entre os grupos nos períodos analisados, foi realizada a quantificação de células imunomarcadas a IL-6. Com auxílio de uma câmera (DP-71, Olympus – Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus, modelo BX-51), em aumento de 40x, imagens da cápsula adjacente aos implantes foram capturadas. Posteriormente, com um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus – Japão), as células imunopositivas, em cada área teste de aproximadamente 0,09 $\text{mm}^2$  da cápsula, foram computadas obtendo-se, assim, um valor de células imunopositivas/ $\text{mm}^2$ . Ao

final, foi estabelecida uma média para cada grupo experimental de acordo com o período experimental e o material estudado.

### **- Reação histoquímica von Kossa**

O método de von Kossa foi utilizado para a detecção de estruturas calcificadas na cápsula adjacente à extremidade dos tubos implantados (4,26). Foram selecionados dois cortes de cada implante contendo os diferentes materiais com intervalo mínimo de 100 µm. Os cortes desparafinizados foram incubados em solução aquosa contendo 5% de nitrato de prata por 1 h; após lavagens em água destilada, os cortes foram imersos em 5% de tiosulfato de sódio durante 5 min. Subsequentemente, os cortes foram lavados e corados pelo método picrosírius por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, os corte foram lavados, desidratados em concentrações crescentes de álcool e montados em meio resinoso para análise em microscópio de luz.

### **Análise estatística**

As diferenças entre os grupos foram estatisticamente analisadas no programa SigmaStat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA). Os dados de todos os testes realizados no presente estudo foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey e o nível de significância considerado foi de 5%.

## **Resultados**

### **Radiopacidade**

A radiopacidade do MTA foi estatisticamente superior às associações do CP ao ONbmicro e ONbnano. O CP+ONbmicro e o CP+ONbnano apresentaram valores de radiopacidade estatisticamente semelhantes e superiores ao mínimo recomendado pela norma da ISO/ADA (Tabela 1).

**Tabela 1.** Médias e desvio padrão da radiopacidade (mm Al) dos diferentes materiais

<b>Materiais</b>	<b>Radiopacidade</b>
MTA	4,73±0.44 <sup>a</sup>
CP+ONb micro	3,52±0.12 <sup>b</sup>
CP+ONb nano	3,75±0,17 <sup>b</sup>

M±D.P (média±desvio padrão)

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes ( $p \leq 0,05$ ).



### Tempo de presa

De acordo com a Tabela 2, os materiais CP+ONbmicro e o CP+ONbnano apresentaram médias para o tempo de presa inicial estatisticamente similares entre si, porém, significativamente superiores ao MTA. Apesar disso, os valores observados para o tempo de presa final de cada material analisado foram semelhantes ( $p>0,05$ ).

**Tabela 2.** Médias e desvio padrão dos tempos de presa inicial e final (em minutos) para cada material

	MTA	CP+ONb micro	CP+ONb nano
<b>Inicial</b>	24,7±4,3 <sup>a</sup>	45,8±3,8 <sup>b</sup>	47,4±4,8 <sup>b</sup>
<b>Final</b>	161,9±6,4 <sup>a</sup>	158,8±10,4 <sup>a</sup>	152,3±7,3 <sup>a</sup>

M±D.P (média±desvio padrão)

Diferentes letras sobrescritas (a, b, c) indicam diferença estatisticamente significativa ( $p\leq 0,05$ ).

### Análise do pH e da liberação de íons cálcio

A água destilada dos frascos contendo os materiais avaliados apresentou pH alcalino nos diferentes períodos. Nos períodos de 1 dia e 28 dias, não foram verificadas diferenças entre os valores do pH para os materiais analisados. Em todos os períodos, o MTA e o CP+ONbmicro apresentaram valores de pH similares estatisticamente. Entretanto, aos 7 dias, a média do CP+ONbnano foi estatisticamente inferior a observada no MTA e no CP+ONbmicro. Em contrapartida, o CP+ONbnano apresentou um valor de pH significativamente maior ( $p\leq 0,05$ ) em comparação ao MTA e ao CP+ONbmicro, no período de 14 dias (Tabela 3).

Em relação à liberação de íons cálcio, todos os materiais foram capazes de liberar cálcio nos períodos avaliados, porém as maiores médias foram observadas após o período inicial de 1 dia. O MTA apresentou uma maior liberação de íons cálcio em todos os períodos analisados quando comparado aos materiais contendo Nb, exceto aos 14 dias, em que as médias do MTA e do CP+ONbnano foram estatisticamente semelhantes. Após 1 dia e 28 dias, a valor de cálcio liberado foi similar entre o CP+ONbmicro e o CP+ONbnano, porém, aos 7 dias, a média no CP+ONbmicro foi significativamente menor do que o CP+ONbnano (Tabela 4).

**Tabela 3.** Médias e desvio padrão dos valores do pH para os diferentes materiais nos períodos avaliados

	MTA	CP+ONb micro	CP+ONb nano
<b>1 d</b>	10,34±0,23 <sup>a</sup>	10,42±0,10 <sup>a</sup>	10,42±0,10 <sup>a</sup>
<b>7d</b>	10,22±0,10 <sup>a</sup>	10,09±0,29 <sup>a</sup>	9,87±0,19 <sup>b</sup>
<b>14 d</b>	9,96±0,13 <sup>a</sup>	9,90±0,17 <sup>a</sup>	10,50±0,23 <sup>b</sup>
<b>28 d</b>	9,69±0,18 <sup>a</sup>	9,59±0,45 <sup>a</sup>	9,57±0,23 <sup>a</sup>

M±D.P (média±desvio padrão)

Letras diferentes indicam resultados estatisticamente significantes para os diferentes materiais em um mesmo período ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 4.** Médias e desvio padrão da liberação de íons cálcio (mg/L) para os diferentes materiais nos períodos avaliados

	MTA	CP+ONb micro	CP+ONb nano
<b>1d</b>	5,54±1,47 <sup>a</sup>	1,87±0,85 <sup>b</sup>	2,56±0,71 <sup>b</sup>
<b>7d</b>	18,84±0,82 <sup>a</sup>	4,53±0,59 <sup>b</sup>	14,56±3,77 <sup>c</sup>
<b>14 d</b>	15,64±1,63 <sup>a</sup>	8,33±1,43 <sup>b</sup>	15,66±2,22 <sup>a</sup>
<b>28 d</b>	14,53±3,36 <sup>a</sup>	10,68±2,43 <sup>b</sup>	7,79±3,37 <sup>b</sup>

M±D.P (média±desvio padrão)

Letras diferentes indicam resultados estatisticamente significantes para os diferentes materiais em um mesmo período ( $p \leq 0,05$ ).

## Reação tecidual

### - *Análise morfológica e densidade numérica de células inflamatórias*

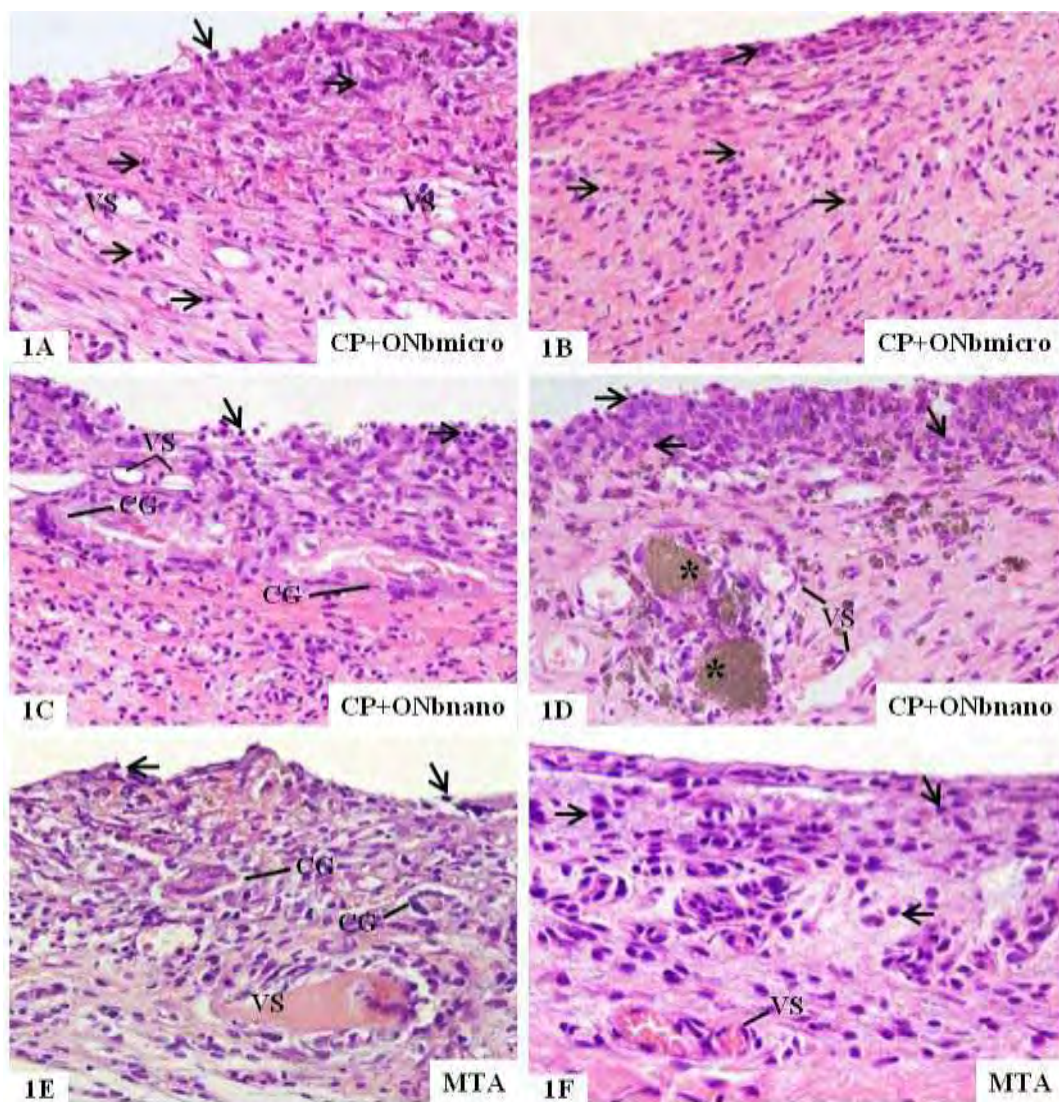
Os materiais analisados induziram um processo inflamatório no tecido conjuntivo adjacente aos implantes em todos os períodos (Fig. 1 e tabela 5). O número de células inflamatórias/mm<sup>2</sup>, em todos os grupos, foi significativamente maior aos 7 dias; após este período, uma diminuição gradativa e significativa foi verificada em todos os grupos (tabela 5).

Aos 7 dias, foi verificado um processo inflamatório moderado contendo, principalmente, por neutrófilos e linfócitos, no tecido conjuntivo adjacente aos diferentes materiais (Figs. 1A, 1C e 1E). Ocasionalmente, algumas células gigantes foram observadas na cápsula adjacente aos implantes dos materiais (Figs. 1C e 1E). Neste período, a densidade numérica de células no CP+ONbmicro foi estatisticamente menor em comparação ao CP+ONbnano e MTA (Tabela 5).

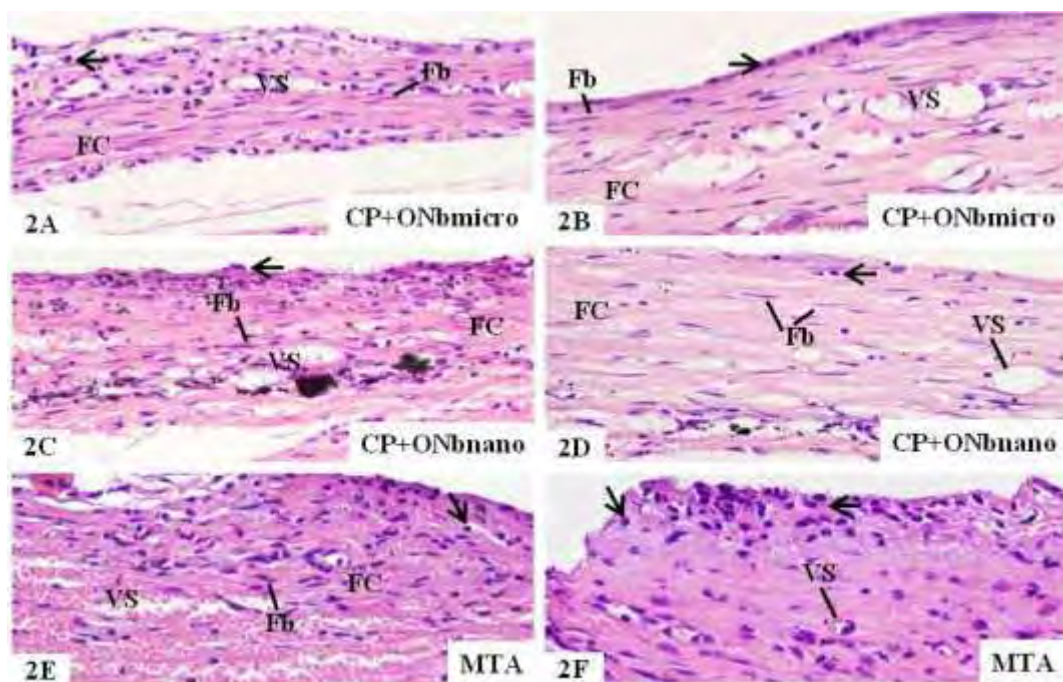
No período de 15 dias, a densidade numérica de células inflamatórias foi estatisticamente semelhante nas cápsulas adjacentes aos diferentes materiais (Tabela 5). No entanto, nos grupos CP+ONbmicro e MTA as células inflamatórias estavam dispersas por toda a cápsula (Figs. 1B e 1F). Em contrapartida, no grupo CP+ONbnano as células inflamatórias estavam situadas, principalmente, na porção mais interna da cápsula, ou seja, em íntimo contato com o material; partículas de material foram frequentemente observadas no tecido conjuntivo (Fig. 1D).

As cápsulas adjacentes aos diferentes materiais exibiram, aos 30 dias, feixes de fibras colágenas e típicos fibroblastos (Figs. 2A, 2C e 2E). No entanto, algumas células inflamatórias, principalmente linfócitos, plasmócitos e macrófagos, foram ainda observados (Figs. 2A, 2C e 2E). De acordo com a Tabela 5, neste período, o número de células inflamatórias foi significativamente menor nas cápsulas adjacentes ao CP+ONbmicro e o CP+ONbnano em comparação ao verificado no MTA.

Significante redução no número de células inflamatórias foi verificada aos 60 dias, em todos os grupos; no entanto, diferenças estatisticamente significantes não foram detectadas entre os grupos neste período (Tabela 5). Geralmente, os escassos linfócitos e macrófagos estavam situados na superfície da cápsula em íntimo contato com o material implantado. A cápsula exibia típicos feixes de fibras colágenas entre fibroblastos e fibrócitos (Figs. 2B, 2D e 2F).



**Figura 1 (1A-1F)** - Fotomicrografias mostrando porções de cortes de cápsulas adjacentes aos materiais após 7 dias (Figs. 1A, 1C, 1E) e 15 dias (Figs. 1B, 1D, 1F) ao implante no subcutâneo. **Fig. 1A (CP+ONbmicro 7 dias)** – diversas células inflamatórias (setas) e vasos sanguíneos (VS) estão presentes por toda extensão da espessa cápsula. 200x. **Fig. 1B (CP+ONbmicro 15 dias)** – células inflamatórias (setas) estão situadas por toda a extensão da cápsula. 190x. **Fig. 1C (CP+ONbnano, 7 dias)** – por toda a extensão da cápsula são observadas inúmeras células inflamatórias (setas) e diversos vasos sanguíneos (VS). Células gigantes multinucleadas, CG. 200x. **Fig. 1D (CP+ONbnano, 15 dias)** – células inflamatórias (setas) estão presentes, principalmente, na porção da cápsula em contato com o CP+ONbnano; partículas de material (asteriscos) estão dispersas entre as CI e os vasos sanguíneos (VS). 200x. **Fig. 1E (MTA, 7 dias)** – a cápsula adjacente ao MTA contém diversas células inflamatórias (setas), algumas células gigantes multinucleadas (CG) e vasos sanguíneos (VS). 190x. **Fig. 1F (MTA, 15 dias)** – células inflamatórias (setas), principalmente plasmócitos e macrófagos, são observadas em toda a extensão da cápsula. VS, vasos sanguíneos. 200x.



**Figura 2 (2A-2F)** - Fotomicrografias mostrando porções de cortes de cápsulas adjacentes aos materiais após 30 dias (**Figs. 2A, 2C, 2E**) e 60 dias (**Figs. 2B, 2D, 2F**) ao implante no subcutâneo. **Figs. 2A (CP+ONbmicro), 2C (CP+ONbnano) e 2E (MTA)** – A porção mais interna da cápsula exibe alguns feixes de fibras colágenas (FC) entre fibroblastos (Fb); células inflamatórias (setas) são observadas, principalmente, na superfície da cápsula em contato com os materiais e nas áreas adjacentes aos vasos sanguíneos (VS). 180x; 180x; 190x. **Figs. 2B (CP+ONbmicro), 2D (CP+ONbnano) e 2F (MTA)** – as cápsulas exibem diversos fibroblastos e fibrócitos (Fb) dispostos entre os feixes de fibras colágenas (FC). Note que a presença de alguns macrófagos e linfócitos (setas) está restrita à superfície da cápsula adjacente aos materiais. VS, vasos sanguíneos. 200x; 200x; 190x.

**- Número de células imunopositivas à IL-6**

Células imunopositivas à IL-6 no tecido adjacente aos diferentes materiais foram observadas em todos os períodos (Figs 3A-3F). De acordo com a Tabela 5, o número de células imunomarcadas à IL-6 foi maior aos 7 dias, sendo que, após este período, ocorreu uma diminuição gradativa e significativa. Aos 7 e 60 dias, o número de células IL-6 positivas foi estatisticamente menor na cápsula dos implantes de CP+ONbmicro em comparação aos implantes MTA e CP+ONbnano. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes entre os materiais nos períodos de 15 e 30 dias. No período de 60 dias, escassas células exibindo positividade ao IL-6 foram observadas na cápsula adjacente aos implantes (Figs. 3D-3F).

**Tabela 5** – Densidade numérica de CI e número de células IL-6 imuno-positivas por mm<sup>2</sup> na capsula adjacente aos diferentes materiais

	MTA	CP+ONb micro	CP+ONb nano
<b>7 dias</b>			
CI	663,3 <sup>a,1</sup> ± 35,8	605,1 <sup>b,1</sup> ± 30,6	687,9 <sup>a,1</sup> ± 19,2
IL-6	488,8 <sup>a,1</sup> ± 11,1	453,3 <sup>b,1</sup> ± 14,0	488,8 <sup>a,1</sup> ± 7,8
<b>15 dias</b>			
CI	576,0 <sup>a,2</sup> ± 21,3	578,4 <sup>a,2</sup> ± 20,1	586,5 <sup>a,2</sup> ± 17,8
IL-6	200,0 <sup>a,2</sup> ± 11,1	193,3 <sup>a,2</sup> ± 6,0	197,7 <sup>a,2</sup> ± 9,2
<b>30 dias</b>			
CI	452,4 <sup>a,3</sup> ± 15,3	418,2 <sup>b,3</sup> ± 12,3	398,4 <sup>b,3</sup> ± 20,7
IL-6	131,5 <sup>a,3</sup> ± 9,4	124,4 <sup>a,3</sup> ± 9,9	128,8 <sup>a,3</sup> ± 9,2
<b>60 dias</b>			
CI	212,3 <sup>a,4</sup> ± 10,2	216,0 <sup>a,4</sup> ± 3,3	216,4 <sup>a,4</sup> ± 4,5
IL-6	89,4 <sup>a,4</sup> ± 2,2	48,8 <sup>b,4</sup> ± 7,3	82,2 <sup>a,4</sup> ± 8,5

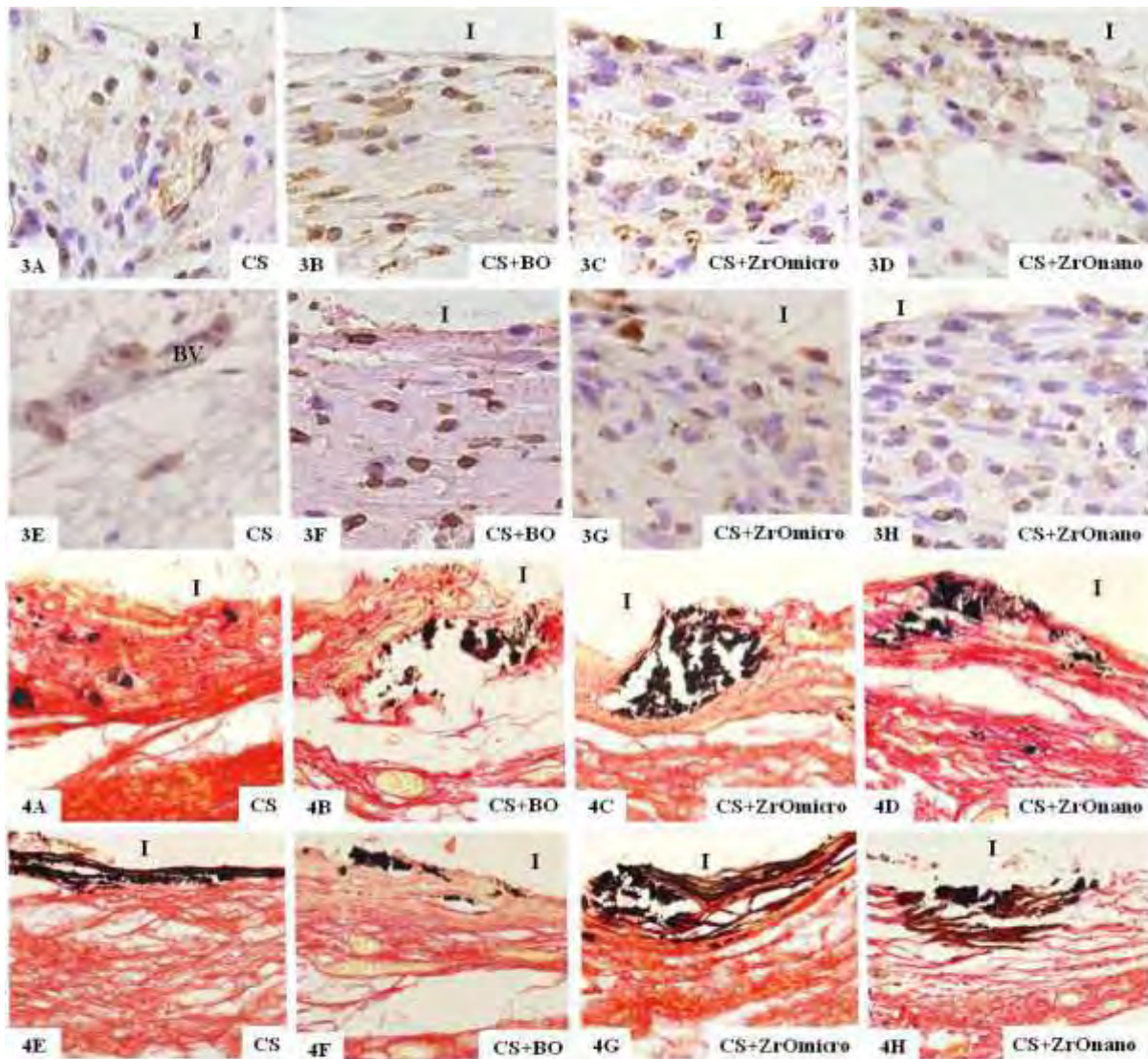
M±D.P (média±desvio padrão)

A comparação entre os períodos (p≤0,05) esta indicada por números sobrescritos nas varias colunas.

A comparação entre os grupos (p≤0,05) esta indicada por diferentes letras sobrescritas (a, b, c) nas varias linhas

**- Reação histoquímica von Kossa**

Estruturas von Kossa-positivas (em preto) foram observadas na cápsula adjacente a todos os materiais, em todos os períodos. Estas estruturas, exibindo tamanho variado, foram observadas dispersas pela cápsula bem como restritas à superfície, em íntima justaposição aos materiais (Figs. 4A-4F). Estas estruturas não foram encontradas nos cortes imersos no meio de incubação sem o nitrato de prata, usado como controle negativo (dados não ilustrados).



**Figures 3A-3H** - Light micrographs of sections showing portions of capsule adjacent to the opening of the tubes implanted in the subcutaneous tissue at 7 days (Figs. 3A-3D) and at 60 days (Figs. 3E-3H). The sections were submitted to immunohistochemistry for detection of IL-6 (brown-yellow color) and counterstained by hematoxylin. IL6-immunolabeling (arrows) is observed in the cells of the capsule adjacent to the different materials implanted. 500x.

**Figures 4A-4H** - Light micrographs of sections showing portions of capsule adjacent to the opening of the tubes implanted in the subcutaneous tissue at 7 days (Figs. 4A-4D) and 60 days (Figs. 4E-4H). The sections were submitted to the von Kossa reaction and counterstained by picosirius. Small and dense von Kossa-positive structures (black color) are dispersed by throughout capsule (Fig. 4A and Fig. 4D). Structures von Kossa-positives with irregular-shaped are in the inner portion of the capsules (Figs. 4B-4D, 4G and 4H). Fig. 4E - a continuous layer strongly von Kossa-positive is observed in close contact with material. Fig. 4F - small and dense structures von Kossa-positive are present in the capsule surface. 220x.



## Discussão

O MTA tem sido considerado o material de escolha em casos de retro-obturação por apresentar selamento marginal e biocompatibilidade superior aos demais produtos existentes (1-3). No entanto, diversos estudos têm sido realizados propondo modificações em sua formulação, principalmente, relacionados à substituição do óxido de bismuto, seu radiopacificador. Há evidências de que o OBi prejudica algumas propriedades do MTA, tais como a resistência a compressão (9,10) e a biocompatibilidade (15,16). O cimento Portland (CP), principal componente do MTA, não possui radiopacidade suficiente para ser distinguido das estruturas anatômicas adjacentes (7,23). Assim, alguns materiais com alto número atômico têm sido testados em associação com o CP com o objetivo de substituir o óxido de bismuto.

Há evidências de que óxido de nióbio (ONb), investigado no presente estudo como agente radiopacificador, é biocompatível e apresenta resistência à corrosão quando utilizado no tratamento de superfícies de implantes (18-20). Assim, foi avaliada a radiopacidade, tempo de presa, o pH, a liberação de íons cálcio e a reação tecidual no subcutâneo de ratos provocada pelo ONb microparticulado e pelo ONb nanoparticulado associados ao CP, comparando-os ao MTA.

Nossos resultados mostraram que o CP+ONbmicro e o CP+ONbnano apresentaram radiopacidade estatisticamente inferior ao MTA. O bismuto apresenta um número atômico de 83, proporcionando uma boa radiopacidade ao MTA (5). Em contrapartida, o nióbio possui um número atômico de 41 e, portanto, aproximadamente 50% inferior ao Bi. No presente estudo, foi acrescida uma maior quantidade de óxido de nióbio (30%) ao CP, quando comparada a proporção de 20% do OBi contido no MTA, com o objetivo de equilibrar os valores de radiopacidade entre os materiais. Com esta quantidade maior de radiopacificador em suas composições, o CP+ONbmicro e o CP+ONbnano obtiveram valores superiores aos estabelecidos pela ISO para materiais retrobturadores, porém, estes apresentaram-se próximos ao mínimo recomendado de 3 mm Al. O MTA apresentou uma média de 4,73 mm Al, valor este diferente de outros encontrados na literatura em que foi verificado radiopacidade variando de 6-8 mm Al (6,7). Esta diferença nos resultados possivelmente seja devido à marca comercial do MTA e a metodologia usada para determinação da radiopacidade.

A adição de ONb tanto micro quanto nanoparticulado ao CP proporcionou um tempo de presa inicial significativamente superior ao MTA, porém, o tempo de presa final foi semelhante entre os materiais testados. Estes resultados são semelhantes aos encontrados para

os tempos de presa inicial e final do ProRoot MTA, entre 40 e 140 minutos respectivamente (27). Estes valores foram superiores aos obtidos para o MTA Angelus (13,25) o qual também foi utilizado no presente estudo. Esta diferença entre o ProRoot MTA e o MTA Angelus é atribuída a presença do sulfato de cálcio na composição do ProRoot MTA que aumenta significativamente o tempo de presa do material (13,25). Tem sido relatado que cimentos com tempo de presa estendido são mais susceptíveis a dissolução durante a cirurgia parodontica, embora aqueles com tempo de presa extremamente curto impõem dificuldades técnicas durante sua inserção na cavidade retrograda (14).

Os resultados indicaram que todos os materiais apresentaram pH alcalino em todos os períodos analisados. Esta alcalinidade pode ser atribuída à formação de hidróxido de cálcio durante a hidratação do cimento Portland (11), considerando que o CP é o principal constituinte dos materiais avaliados. Desta maneira, o CP+ONbmicro, o CP+ONbnano e MTA, quando hidratados, originam o hidróxido de cálcio, como um produto da reação. Posteriormente, o hidróxido de cálcio formado dissocia-se em íons hidroxila (28), aumentando, portanto, o pH na solução. Estes valores de pH mantiveram-se, praticamente, estáveis ao longo dos períodos, variando entre 9,5-11,0 o que está de acordo com resultados obtidos previamente tanto para o CP quanto para o MTA (14,17)

O mecanismo de formação de hidróxido de cálcio, a partir da hidratação do CP, também pode, em parte, explicar os resultados obtidos com a análise da liberação de íons cálcio. Isto porque, todos os materiais avaliados foram capazes de promover a liberação de cálcio, principalmente, após 7, 14 e 28 dias. Apesar de serem capazes de promover a liberação de íons cálcio, os materiais contendo ONb apresentaram médias inferiores as verificadas para o MTA. Sabe-se que o radiopacificador do MTA é o OBi e que, por interferir na reação de hidratação do cimento, este radiopacificador cria falhas na estrutura, aumentando a desintegração e a solubilidade do MTA (11). Esta hipótese pode ser reforçada por trabalho de Duarte et al. (14) que demonstraram que o MTA, de mesma marca comercial a utilizada no presente estudo, apresentou um percentual de solubilidade significativamente superior ao CP puro e o CP associado ao tungstato de cálcio ou ao óxido de zircônio. Assim, provavelmente, houve uma maior quantidade de cálcio presente na solução de água destilada em que estavam imersos os espécimes do grupo MTA, devido a maior solubilidade deste material em relação ao CP+ONbmicro e CP+ONbnano, e nas quais, posteriormente, foram realizadas as leituras.

Os nossos achados morfológicos e a quantificação de células inflamatórias na cápsula revelaram que a associação do ONb microparticulado ou nanoparticulado ao CP

induziu uma reação inflamatória moderada na cápsula adjacente aos implantes, similarmente ao MTA. Em todos os grupos, foi observada uma maior número de células inflamatórias no tecido conjuntivo aos 7 dias, sendo que, após este período, houve uma diminuição gradativa e significativa nas médias até 60 dias. A reação inflamatória inicial pode ser atribuída, pelo menos em parte, devido ao pH alcalino dos materiais (29). Deve-se considerar que os materiais podem liberar substâncias que estimulam a migração e a diferenciação das células inflamatórias, induzindo também a produção de citocinas moduladoras da inflamação como, por exemplo, a IL-6. Esta citocina é capaz de ativar e modular células específicas, exercendo um papel fundamental sobre o processo inflamatório (30).

O MTA promove o recrutamento, proliferação e diferenciação de células inflamatórias ocorrendo, inicialmente, um evidente processo inflamatório no tecido em contato com este material (3,4,29,31). Além disso, estudos mostraram que o MTA estimula a produção de citocinas moduladoras da inflamação como, por exemplo, IL-1 e IL-6 (26,32). Posteriormente, há uma redução significativa do número de células inflamatórias em contato com o MTA o que, segundo Silva et al. (32), pode ser atribuído a uma queda na expressão destas citocinas, contribuindo para o reparo do tecido. Assim, os produtos liberados pelos diferentes materiais podem ser responsáveis pelo maior número de CI e de células imunopositivas à IL-6 apresentado pelo MTA e pelo CP+ONbnano em comparação ao CP+ONbmicro no período de 7 dias, no presente estudo. À medida que ocorre a remoção de partículas de material e restos celulares remanescentes da fase aguda do processo inflamatório, este, geralmente, é reduzido (4). Os nossos achados mostraram que a redução do processo inflamatório ocorreu paralelamente à redução da imunoposição da interleucina-6. Além disso, o processo inflamatório foi substituído por feixes de fibras colágenas bem definidos e típicos fibroblastos e fibrócitos, caracterizando a formação de uma cápsula de tecido conjuntivo denso e, dessa forma, refletindo a biocompatibilidade dos materiais testados.

Os materiais induziram a precipitação de estruturas calcificadas no subcutâneo, evidenciadas pelo método histoquímico de von Kossa. Estas estruturas calcificadas apresentaram características semelhantes às observadas para o MTA (4,26) e para o cimento Portland (4). Acredita-se que estas estruturas são originadas à partir do óxido de cálcio (CaO), um dos principais componentes do cimento Portland (26). Durante a hidratação do cimento Portland, o CaO é convertido em  $\text{Ca(OH)}_2$  (11) e, posteriormente, dissocia-se em íons cálcio e hidroxila. O cálcio liberado reage com o gás carbônico dos tecidos, formando cristais de carbonato de cálcio o qual serve de núcleo para a calcificação

(34). A reação de von Kossa marca, em preto, carbonatos presentes no tecido, dentre eles, o carbonato de cálcio (35). Nossos resultados mostraram que o MTA, o CP+ONbmicro e o CP+ONbnano promoveram a liberação de íons cálcio, reforçando a ideia de que a liberação destes íons é fundamental para o surgimento de estruturas von Kossa.

Nossos resultados indicam que a associação do óxido de nióbio microparticulado ou nanoparticulado ao cimento Portland apresenta propriedades físicas, químicas e biológicas adequadas. Portanto, a utilização do óxido de nióbio como radiopacificador pode ser considerado como uma alternativa à utilização do óxido de bismuto. No entanto, futuros estudos devem ser realizados buscando proporcionar melhor radiopacidade ao cimento Portland bem como possibilitar melhor compreensão da interação das partículas de óxido de nióbio com o este material. Além disso, há necessidade de novas pesquisas para entendimento da reação das partículas nanoparticuladas com o cimento Portland, uma vez que, dentro das limitações do nosso estudo, o óxido de nióbio nanoparticulado não apresentou propriedades superiores ao microparticulado.

## Referências\*

1. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;19:541-4.
2. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 1995;21:295-9.
3. Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J* 2011;44:100-10.
4. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Morphological and morphometric analysis of the biocompatibility of an experimental MTA Sealer. *J Biomed Mat Res Part B, Appl Biomat* 2012;100B:1773-81.
5. Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MAH, Gonçalves M, Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity evaluation of root-end filling materials by digitization of images. *J Appl Oral Sci* 2008;16:376-9.
6. Kim EC, Lee BC, Chang HS, Lee W, Hong CU, Min KS. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. *J Endod* 2008;105:e54-e57.
7. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mat* 2011;27:879-91.
8. International Organization for Standardization. ISO 6876: dental root sealing materials. Geneva: The Organization; 2001.

\* De acordo com as normas do periódico *Journal of Endodontics* ao qual esse artigo será submetido posteriormente

9. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod* 2007;33:295-8.
10. Tanomaru-Filho M, Morales V, Silva GF, et al. Compressive strength and setting time of MTA and Portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dent* 2012;2012:898051.
11. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2007;40:462-70.
12. American National Standard. American Dental Association Specification n° 57 for endodontic filling materials. Chicago: ADA; 1984.
13. Vivan RR, Zapata RO, Zeferino MA, et al. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:250-6.
14. Duarte MAH, Minotti PG, Rodrigues CT, et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 2012;38:394-7.
15. Min KS, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU, Kim EC. Human pulp cells response to Portland cement in vitro. *J Endod* 2007;33:163-6.
16. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2004;37:699-704.
17. Camilleri J, Cuttajar A, Mallia B. Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dent Mater* 2011;27:845-54.
18. Denry IL, Holloway JA, Nakkula RJ, Walters JD. Effect of niobium content on the microstructure and thermal properties of fluorapatite glass-ceramics. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2005;75B:18-24.

19. Nickenig HJ, Schlegel KA, Wichmann M, Eitner S. Expression of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in soft tissue over ceramic and metal implant materials before uncovering: a clinical pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2012;27:671-6.
20. Karlinsey RL, Hara AT, Yi K, Duhn CW. Bioactivity of novel self-assembled crystalline Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> microstructures in simulated and human salivas. *Biomed Mater* 2006;1:16–23.
21. Komabayashi T, Spangberg L. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyzer. *J Endod* 2008;34:94-8.
22. Saghiri MA, Asgar K, Lofti M, Garcia-Godoy F. Nanomodification of mineral trioxide aggregate for enhanced physiochemical properties. *Int Endod J* 2012;45:979-88
23. Duarte MAH, El Kadre GDO, Vivan RR, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, de Moraes IG. Radiopacity of Portland Cement Associated With Different Radiopacifying Agents. *J Endod* 2009;35:737–40.
24. American Society for Testing and Materials. Standard test method for time and setting of hydraulic-cement paste by Gillmore needles, ASTM C266–03. Philadelphia: ASTM; 2000.
25. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru-Filho M, Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of Mineral Trioxide Aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod* 2009;35:550-4.
26. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabe PFE, Costa MTM. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod* 2009;35:256–60.
27. Islam I, Chng HK, Yap AUJ. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. *J Endod* 2006;32:193-7.
28. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995;6:85-90.

29. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, et al. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. *J Endod* 2010;36:899-903.
30. Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis* 2012;18:236-46.
31. Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, et al. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. *J Endod* 2008;34:715-7.
32. Silva MJB, Vieira LQ, Sobrinho APR. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:e70-e76.
33. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Penha Oliveira SH. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod* 2009;35:1577-9.
34. Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of calcium hydroxide cement. *Arch Oral Biol* 1991;36:117-28.
35. Meloan SN, Puchtler H. Chemical mechanisms of staining methods. Von Kossa technique: what von Kossa really wrote and a modified reaction for selective demonstration of inorganic phosphates. *J Histotechnol* 1985;1:11-3.



*Conclusão*

## Conclusão

Nas condições experimentais em que esta pesquisa foi desenvolvida e com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- O óxido de zircônio (OZr) tanto micro quanto nanoparticulado, apresenta propriedades físicas e químicas mais favoráveis do que o OB quando associado ao CP. Isto porque, apesar de possuírem radiopacidade semelhante ao CP+OB, o CP+OZr<sub>micro</sub> e o CP+OZr<sub>nano</sub> mantêm o pH alcalino e a liberação de íons cálcio apresentados pelo CP e aumentam significativamente a resistência à compressão em comparação ao CP+OB;
- A associação de OZr micro e nanoparticulado ao CP resulta em materiais com melhor comportamento biológico do que o CP+OB, evidenciado pelo menor processo inflamatório e menor imunoposição à IL-6 exibida pelas células da cápsula aos implantes de CP+OZr (micro e nano);
- O óxido de nióbio tanto micro quanto nanoparticulado, quando associado ao CP, apresentou propriedades físicas e químicas adequadas.
- A diminuição do processo inflamatório, principalmente aos 60 dias, comprovado pelo menor número de células inflamatórias e de células imunopositivas à IL-6 na cápsula adjacente aos implantes do CP+ONb<sub>micro</sub> e do CP+ONb<sub>nano</sub> evidenciam que estes materiais apresentam biocompatibilidade;
- Todos os materiais testados são capazes de induzir a formação de estruturas calcificadas, uma vez que, em todos os períodos, foram constatadas estruturas von Kossa positivas na cápsula formada justaposta aos implantes no subcutâneo;
- A associação de OZr e de ONb nanoparticulados ao CP não apresentou propriedades físicas, químicas e biológicas superiores em comparação a forma microparticulada destes mesmos radiopacificadores.

# *Referências*

## Referências\*

1. Abdullah R, PittFord TR, Papaioannou S, Nicholson J, McDonald F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. *Biomaterials*. 2002; 23(19): 4001-10.
2. American Dental Association. Specification No. 57 for endodontic filling materials. *J Am Dent Assoc*. 1984; 108(1): 88.
3. Aqrabawi J. Sealing ability of amalgam, super EBA cement, and MTA when used as retrograde filling materials. *Br Dent J*. 2000; 188(5):266-8.
4. Badr AE. Marginal adaptation and cytotoxicity of bone cement compared with amalgam and Mineral Trioxide Aggregate as root-end filling materials. *J Endod*. 2012; 36(6): 1056-60.
5. Baek SH, Plenk H Jr, Kim S. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA, and MTA as root-end filling materials. *J Endod*. 2005; 31(6): 444-9.
6. Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*. 1999; 15(1): 26–7.
7. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585-601.
8. Bentz DP, Garboczi EJ, Haecker CJ, Jensen OM. Effects of cement particle size distribution on performance properties of Portland cement-based materials. *Cem Concr Res*. 1999; 29(10): 1663–71.
9. Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Duarte MAH. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108(4): 628-32.

---

\*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

10. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod.* 2006; 32 (9): 897-900.
11. Byrd VM, Ballard DW, Miller GG, Thomas JW. Fibroblast growth factor-1 (FGF-1) enhances IL-2 production and nuclear translocation of NF-kappaB in FGF receptor-bearing Jurkat T cells. *J Immunol.* 1999;162(10):5853-9.
12. Broadley KN, Aquino AM, Hicks B, et al. Growth factors bFGF and TGF-b accelerate the rate of wound repair in normal and in diabetic rats. *Int J Tissue React.* 1988; 10(6): 345–53.
13. Burgess WH, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem.* 1989; 58: 575– 606.
14. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2007; 40(6): 462-70.
15. Camilleri J. The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J.* 2008; 41(2): 151-7.
16. Camilleri J. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *Int Endod J.* 2010; 43(3): 231-40.
17. Camilleri J, Cuttajar A, Mallia B. Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dent Mater.* 2011; 27(8): 845-54.
18. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2004; 37(10): 699-704.
19. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater.* 2005; 21(4): 297-303.

20. Consolaro A. *Inflamação e reparo*. São Paulo: Dental Press; 2009.
21. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod*. 2007; 33(3): 295-8.
22. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mat*. 2011; 27(9): 879-91.
23. Dietschi D, Duc O, Krejci I, Sadan A. Biomechanical considerations for the restoration of endodontically treated teeth: a systematic review of the literature-Part 1. Composition and micro- and macrostructure alterations. *Quintessence Int*. 2007; 38(9): 733-43.
24. Duarte MAH, El Kadre GDO, Vivian RR, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, de Moraes IG. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod*. 2009; 35(5): 737-40.
25. Duarte MAH, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru-Filho M et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. 2012; 38(3): 394-7.
26. Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J*. 2000; 11(1): 3-9.
27. Finklestein SP, Apostolides PJ, Caday CG, et al. Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) immunoreactivity at the site of focal brain wounds. *Brain Res*. 1988; 460(2): 253-9.
28. Fouad AF, Acosta AW. Periapical lesion progression and cytokine expression in an LPS hyporesponsive model. *Int Endod J*. 2001; 34(7): 506-13.

29. Frank LA, Glick DH, Patterson SS, Weine FS. Long term evaluation of surgically placed amalgam fillings. *J Endod.* 1992; 18(8): 391-8.
30. Gerhards F, Wagner W. Sealing ability of five different retrograde filling materials. *J Endod.* 1996; 22(9): 463-6.
31. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Penha Oliveira SH. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod.* 2009; 35(11): 1577-9.
32. Gomes Cornelio AL, Salles LP, Paz MC, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod.* 2011; 37(2): 203-10.
33. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J.* 2001; 12(1): 3-8.
34. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J.* 2002; 13(1): 23-6.
35. Hrabak A, Bajor T, Csuka I. The effect of various inflammatory agents on the phagocytosis and cytokine profile of mouse and rat macrophages. *Inflamm Res.* 2008;57(2):75–83
36. International Organization for Standardization. ISO 6876: dental root sealing materials. Geneva: ISO; 2001.
37. Jokinen M, Pätsi M, Rahiala H, Peltola T, Ritala M, Rosenholm JB. Influence of sol and surface properties on in vitro bioactivity of sol-gel-derived TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> films deposited by dip-coating method. *J Biomed Mater Res.* 1998; 42(2): 295-302.

38. Kim EC, Lee BC, Chang HS, Lee W, Hong CU, Min KS. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. *J Endod.* 2008; 105(1): e54-e57.
39. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod.* 2006; 32(6): 569-72.
40. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1998; 24(8): 543-7.
41. Komabayashi T, Spangberg L. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and portland cement: a study with a flow particle image analyzer. *J Endod.* 2008; 34(1): 94-8.
42. Lazarou SA, Efron JE, Shaw T, Wasserkrug HL, Barbul A. Fibroblast growth factor inhibits wound collagen synthesis. *Surg Forum.* 1989(1); 40: 627-9.
43. Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MAH, Grizzo LT, Buzalaf MAR et al. pH, calcium ion release and setting time of an experimental mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. *J Endod.* 2011; 37(6): 844-6.
44. Min KS, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU, Kim EC. Human pulp cells response to Portland cement in vitro. *J Endod.* 2007; 33(2): 163-6.
45. Min KS, Chang HS, Bae JM, Park SH, Hong CU, Kim EC. The induction of heme oxygenase-1 modulates bismuth oxide-induced cytotoxicity in human dental pulp cells. *J Endod.* 2007; 33(11): 1342-6.
46. Moldauer I, Velez I, Kuttler S. Upregulation of basic fibroblast growth factor in human periapical lesions. *J Endod.* 2006; 32(5): 408-11.
47. Mullane EM, Dong Z, Sedgley CM, Hu JCC, Botero TM, Holland GR, Nör JE. Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *J Dent Res.* 2008; 87(12): 1144-8.



48. Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis.* 2012;18(3):236-46.
49. Nickenig HJ, Schlegel KA, Wichmann M, Eitner S. Expression of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in soft tissue over ceramic and metal implant materials before uncovering: a clinical pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2012; 27(3): 671-6.
50. Oxsenbein A, Chai F, Winter S, Traisnel M, Breme J, Hildebrand HF. Osteoblast responses to different oxide coatings produced by the sol-gel process on titanium substrates. *Acta Biomater.* 2008; 4(5): 1506-17.
51. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Citokine Growth Factor Rev.* 2005;16(2):159-78.
52. Ribeiro DA, Carlin V, Fracassoli ACC, Oyama LM. Radiopacifiers do not induce genetic damage in murine fibroblasts: an in vitro study. *Int Endod J.* 2009; 42(11): 987-91.
53. Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MAH, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(2): 258-61.
54. Saghiri MA, Asgar K, Lofti M, Garcia-Godoy F. Nanomodification of mineral trioxide aggregate for enhanced physiochemical properties. *Int Endod J.* 2012; 45(11): 979-88.
55. Saidon J, Jianing H, Zhu Q, Safavi K, Spangberg L. Cell and tissue reactions to mineral aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95(4): 483-9.
56. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2005; 31(2): 97-100.

57. Sasaki T. The effects of basic fibroblast growth factor and doxorubicin on cultured human skin fibroblasts: relevance to wound healing. *J Dermatol.* 1992; 19(11) :664–6.
58. Schroder AK, von der Ohe M, Kolling U, Alstaedt J, Uciechowski P, Fleischer D et al. Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. *Immunology.* 2006;119(3):317–27.
59. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Mokhtari H, Roshangar L, Abasi MM et al. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. *J Endod.* 2010; 36(5): 899-903.
60. Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J.* 2011; 44(2):100-10.
61. Silva MJB, Vieira LQ, Sobrinho APR. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(5): e70-e76.
62. Siqueira JF Jr, Roças IN, Abad EC, Castro AJ, Gabyva SMM, Favieri A. Ability of three root end filling materials to prevent bacterial leakage. *J Endod.* 2001; 27(11): 673-5.
63. Tanomaru-Filho M, Luis MR, Leonardo MR, Tanomaru JMG, Silva LAB. Evaluation of periapical repair following retrograde filling with different root-end filling materials in dog teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(1): 127-32.
64. Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MAH, Gonçalves M, Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity evaluation of root-end filling materials by digitization of images. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16(6): 376-9.

65. Tanomaru-Filho M, Morales V, Silva GF, Bosso R, Reis JMSN, Duarte MAH, et al. Compressive strength and setting time of MTA and Portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dent*. 2012; 2012: 898051.
66. Torabinejad M, White DJ, inventors. Tooth filling material and use. United States US 5 769 638. 1995 May 16.
67. Torabinejad M, Pitt-Ford TR. Root end filling materials: a review. *Endod Dent Traumatol*. 1996; 12(4): 161-78.
68. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod*. 1993; 19(12): 591–5.
69. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod*. 1995; 21(6): 295-9.
70. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod*. 1997; 23(4): 225-8.
71. Velten D, Eisenbarth E, Schanne N, Breme J. Biocompatible Nb2O5 thin films prepared by means of the sol-gel process. *J Mater Sci Mater Med*. 2004; 15(4): 457-61.
72. Vivan RR, Zapata RO, Zeferino MA, Bramante CM, Bernardineli N, Garcia RB, et al. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 110(2): 250–6.
73. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Morphological and morphometric analysis of the biocompatibility of an experimental MTA Sealer. *J Biomed Dent Mat Res B Appl Biomater*. 2012; 100B(7): 1773-81.

74. Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Ali Saghiri M et al. Influence of White versus Gray Mineral Trioxide Aggregate on Inflammatory Cells. *J Endod.* 2008; 34(6): 715-7.
75. Wahl SM, Wong H, McCartney-Francis N. Role of growth factors in inflammation and repair. *J Cell Biochem.* 1989; 40(2): 193-9.
76. Wucherpfennig AL, Green DB. Mineral trioxide vs Portland cement; two biocompatible filling materials [abstract]. *J Endod.* 1999; 25: 308.
77. Zakrzewska M, Marcinkowska E, Wiedlocha A. FGF-1: From biology through engineering to potential medical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008; 45(1): 91-135.

*Anexo*

## Anexo

### Anexo 1 – confirmação de submissão de artigo

Submission Confirmation for your paper

**Assunto:** Submission Confirmation for your paper  
**De:** "Dental Materials" <dentistry.dentmatj@manchester.ac.uk>  
**Data:** 8 Feb 2013 19:36:44 +0000  
**Para:** pcerri@foar.unesp.br

Dear Paulo Cerri,

Your submission entitled "Effect of microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide on the physicochemical and biological properties of white Portland cement" has been received by Dental Materials

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/dema/>.

Your username is: [pcerri@foar.unesp.br](mailto:pcerri@foar.unesp.br)

If you need to retrieve password details, please go to:  
[http://ees.elsevier.com/dema/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/dema/automail_query.asp)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System  
Dental Materials

**Anexo 2 – certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais**

**unesp**  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



*Proc. CEEA nr. 26/2010*

Araraquara, 08 de Agosto de 2012

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA desta Faculdade reunida em 08/08/2012, após a avaliação do RELATÓRIO PARCIAL referente ao projeto do Proc. CEEA nr. 26/2010 *APROVOU a solicitação de alteração de metodologia e de prorrogação do prazo de entrega do Relatório Final para MARÇO/2013*, com a recomendação de que seja acertado o cronograma que foi impresso com data de 2012 em sua última coluna à direita.

Atenciosamente,

*Elisa Maria Aparecida Giro*

**Profa. Dra. ELISA MARIA APARECIDA GIRO**

1º Coordenador substituto no exercício da Coordenadoria da CEUA

Ilmº Sr.

**Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI**

DD. Pesquisador Responsável  
a/c Guilherme Ferreira da Silva  
Departamento de Morfologia

Autorizo a reprodução deste trabalho  
(Direitos de publicação reservados ao autor)  
Araraquara, 27 de março de 2013

Guilherme Ferreira da Silva