



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



ALINE SILVA ANDRADE

**BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DE CIMENTOS À BASE DE
SILICATO TRICÁLCICO: ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Araraquara

2016



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



ALINE SILVA ANDRADE

**BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DE CIMENTOS À BASE DE
SILICATO TRICÁLCICO: ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho**

Co-orientador: **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**

Araraquara

2016

Andrade, Aline Silva

Biocompatibilidade e bioatividade de cimentos à base de silicato tricálcio: estudo in vitro e in vivo / Aline Silva Andrade.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

75 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

1. Cimento de silicato 2. Técnicas in vitro 3. Inflamação
I. Título

ALINE SILVA ANDRADE

**BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DE CIMENTOS À BASE DE
SILICATO TRICÁLCICO: ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Comissão julgadora

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

2º Examinador: Prof.^a Dr.^a Gisele Faria

3º Examinador: Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte

Araraquara, 31 de março de 2016

DADOS CURRICULARES

ALINE SILVA ANDRADE

NASCIMENTO: 12 de agosto de 1989, Santo Antônio de Jesus, Bahia. Brasil.

FILIAÇÃO:

Luiz José de Andrade.

Sônia Maria Silva Andrade (*In memorian*).

2008 - 2013

Graduação em Odontologia.

Universidade Federal da Bahia - UFBA, Bahia.

2012 - 2013

Monitoria na disciplina de Endodontia

Universidade Federal da Bahia - UFBA, Bahia.

2014 - 2016

Especialização em Endodontia.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, São Paulo.

2014 - 2016

Mestrado em Odontologia- Área Endodontia (em andamento).

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, São Paulo.

Dedicatória

A Deus

Palavras me faltam para agradecer o quão importante é a tua presença viva.

Obrigada por interceder em minha vida de maneira cheia de luz.

Aos amores da minha vida

Meu pai, minha mãe e meu irmão, essa conquista é nossa!!! É por vocês que vou à luta e enfrento todos os obstáculos! Agradeço de coração o amor e o carinho! Minha maior alegria é saber que tenho vocês sempre ao meu lado.

Amo vocês!

A minha família

Queridos, obrigada por terem participado dessa trajetória e por cada palavra de conforto. Amo vocês!

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

Muito obrigada pelo acolhimento durante esta jornada. Orgulho-me por ter convivido durante estes dois anos com um grande profissional e ser humano. Vou levar seus conselhos, ensinamentos e amizade. Agradeço pela confiança depositada em mim. Minha eterna gratidão e amizade.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Agradeço imensamente todo apoio e dedicação destinados ao meu desenvolvimento profissional e pessoal. Exemplo de responsabilidade, dedicação e seriedade. Obrigada pela ajuda e apoio concedidos para o desenvolvimento desta dissertação. Meu muito obrigada!

À Prof^a. Dr^a. Julliane Maria Guerreiro Tanomaru

Agradeço pela disponibilidade e cuidado na realização da fase experimental. Sempre com alegria e disposição para nos ajudar.

À Universidade Estadual Paulista “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”, UNESP

Nas pessoas do Magnífico Reitor Prof. Dr. **Julio Cezar Durigan**, da Vice-Reitora Prof^a. Dr^a. **Marilza Vieira Cunha Rudge**, do Pró-Reitor de Pós-Graduação Prof. Dr. **Eduardo Kokubun**, e da Pró-Reitora de Pesquisa Prof^a. Dr^a. **Maria José Soares Mendes Giannini**.

À Faculdade De Odontologia De Araraquara, FOAr

Nas pessoas da Diretora Prof^a Dr^a **Andréia Affonso Barreto Montandon** e da Vice-Diretora Prof^a Dr^a **Elaine Maria Sgavioli Massucato**.

Ao Programa De Pós-Graduação Em Odontologia, FOAr/UNESP

Nas pessoas do Coordenador Prof. Dr. **Carlos Rossa Junior** e do Vice-Coordenador Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli**.

Aos Professores da Disciplina De Endodontia desta Faculdade: Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Vilella Berbert, Prof^a Dr^a Gisele Faria, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof^a. Dr^a. Juliane Maria Guerreiro Tanomraru, Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, Prof. Dr. Milton Carlos Kuga e Prof. Dr. Renato De Toledo Leonardo

Obrigada pelo prazer de conviver com profissionais dedicados. Grandes incentivadores!

À Ana Livia Gomes Cornélio e Elisandra Márcia Rodrigues

Agradeço pelo ensinamentos e confiança. Obrigada pela importante contribuição no desenvolvimento desta dissertação. Torço muito por vocês!

A Guilherme Ferreira da Silva

Obrigada pela orientação, disponibilidade e atenção. Sua contribuição foi valiosa no desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada!

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier

Obrigada pela disponibilidade e paciência.

**Aos funcionários do Departamento De Odontologia Restauradora, na
pessoa da Secretária Creusa Maria Hortenci**

Agradeço por nos receber com muita alegria.

Aos técnicos, Mário Sérgio Fantini e Vanderlei José Antônio da Silva

Obrigada por sempre estarem dispostos a ajudar com alegria e paciência.

**Aos técnicos do Laboratório de Histologia, Luis Antônio Potenza e Pedro
Sergio Simões**

Agradeço pela ajuda e dedicação durante os procedimentos laboratoriais.

Sempre educados e atenciosos comigo!

**À equipe de funcionários da BIBLIOTECA da Faculdade de Odontologia
de Araraquara**

Agradeço a ajuda durante a revisão deste trabalho.

**À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)-
Processo: 2014/13353-1**

Obrigada pelo apoio financeiro concedido ao desenvolvimento desta pesquisa,
como também, o auxílio financeiro em forma de bolsa de estudo.

À Prof^a. Dr^a. Fabíola Bastos de Carvalho

Agradeço hoje e sempre pelo carinho e atenção. Mesmo longe, manteve-se
presente nesses dois anos de Mestrado. Continua sendo um exemplo de
profissional e ser humano. Muito obrigada pela amizade. Minha eterna gratidão!

**Aos amigos do Departamento de Histologia e, em especial, Prof^a. Dr^a.
Estela Sasso Cerri**

Agradeço por terem me recebido de braços abertos no Departamento. Obrigada pelo convívio e aprendizado diário. Sempre alegres, fizeram com que a saudade de casa diminuísse.

Aos amigos do Pós-Graduação em Endodontia

Muito obrigada pela dedicação de cada um. Agradeço o convívio harmonioso e a disponibilidade em sempre ajudar.

Aos amigos do Mestrado

Deus é maravilhoso! Aqui, fiz amizades que vou levar eternamente. Vocês foram a minha família durante estes dois anos em Araraquara e tenho um carinho especial por cada um. Sentirei uma saudade enorme!

À Larissa

Muitíssimo obrigada! Lari, nossa amizade se inicia aqui e não terá fim. Deus, como sempre generoso, colocou no meu caminho uma pessoa muito atenciosa, prestativa e amiga. Tenho certeza que levaremos esse convívio diário para sempre. Aprendemos muito uma com a outra. Obrigada por ter sido meu “ombro amigo”.

A minha prima Leila

Obrigada! Esteve presente diariamente e sem o seu apoio não conseguiria chegar tão longe, os caminhos seriam mais complicados e menos divertidos. Nossas conversas trouxeram alegria e conforto, matando a saudade de casa.
Te amo, minha prima e irmã!

Às amigas de sempre

Adriana Borges, Dayane Melo, Emily Freitas, Herlya Campos, Livia Portella, obrigada! Sempre presentes! O incentivo e as nossas conversas foram de fundamental importância para amenizar a saudade. Orgulho de saber que a distância não consegue mudar o carinho e admiração que tenho por vocês.

Moram no meu coração!

Andrade AS. Biocompatibilidade e bioatividade de cimentos à base de silicato tricálcico: estudo *in vitro* e *in vivo* [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

Cimentos à base de silicato tricálcico são desenvolvidos como alternativa ao Mineral Trióxido Agregado (MTA). O objetivo do estudo foi avaliar a biocompatibilidade e bioatividade do cimento experimental silicato tricálcico com 20% de óxido de zircônio (ZrO_2) (STC) e MTA Plus (MTAP). **Capítulo 1-** Células humanas de osteoblastos (Saos-2) foram utilizadas para análise da viabilidade celular por meio dos ensaios de MTT e Vermelho Neutro (NR), da bioatividade pela atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) e da presença de área mineralizada pela coloração de Vermelho de Alizarina (ARS). Os dados obtidos para MTT, NR e ALP foram analisados por ANOVA e Bonferroni, e ARS, por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$). Nos ensaios de viabilidade celular, os materiais não foram citotóxicos. Maior atividade de ALP ocorreu aos 7 dias para todos materiais avaliados. Área mineralizada foi observada em todos os grupos, sendo menor para o grupo STC. Concluiu-se que o cimento experimental silicato tricálcico com 20% de óxido de zircônio e MTA Plus apresentam citocompatibilidade e potencial bioativo. **Capítulo 2-** A reação inflamatória induzida pelo STC e MTAP foi investigada em subcutâneo de ratos. Tubos de polietileno foram preenchidos com STC ($n= 20$) e MTAP ($n= 20$) e implantados no subcutâneo dorsal de quarenta ratos. No grupo controle (GC; $n= 20$), tubos vazios foram implantados. Após 7, 15, 30 e 60 dias, os tubos de polietileno com o tecido conjuntivo circundante foram fixados e embebidos em parafina. O número de células inflamatórias foi avaliado nos cortes corados em HE; e a densidade numérica de células para interleucina-6 (IL-6) após imunomarcação. Os dados obtidos foram analisados pelos Testes ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$). Elevado número de células inflamatórias e imunomarcadas para IL-6 foram observadas aos 7 dias, em todos os grupos; no entanto, o número de células inflamatórias foi significativamente maior para os grupos STC e MTAP. Diferenças significantes não foram detectadas em relação ao número de células imunomarcadas para IL-6 nas cápsulas entre os grupos GSTC, GMTAP e GC, em cada período. Uma redução gradativa e significativa da reação inflamatória e imunomarcação para IL-6 foi observada, em todos os grupos. Aos 60 dias, as cápsulas de tecido conjuntivo denso exibiram diversos fibroblastos e feixes organizados de fibras colágenas. Concluiu-se que o cimento experimental silicato tricálcico com 20% de óxido de zircônio e MTA Plus são materiais biocompatíveis.

Palavras-chave: Cimento de silicato. Técnicas *in vitro*. Inflamação.

Andrade AS. Biocompatibility and bioactivity of tricalcium silicate- based cements: in vitro and in vivo studies. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Tricalcium silicate- based cements have been developed as an alternative to Mineral Trióxido Agregado (MTA). The aim of the study was to evaluate biocompatibility and bioactivity of the tricalcium silicate cement replaced with 20% zirconium oxide (STC) e MTA Plus (MTAP). **Chapter 1-** Human osteoblastic cells (Saos-2) were exposed to test materials and assessed for viability, MTT and Neutral Red (NR) assay, and bioactivity for ALP activity assay and alizarin red staining (ARS). Unexposed cells acted as the control group. Statistical analysis was performed using ANOVA and the Bonferroni post- test ($P < 0.05$) to MTT, NR and ALP, and ANOVA and Tukey post- test ($P \leq 0.05$) to ARS. MTT and NR results, all tested cements were non-cytotoxic. The highest ALP activity occurred at the 7th days. Mineralized area was observed in all materials, STC group showed lower mineralized area. Experimental tricalcium silicate with 20% zirconium oxide and MTA Plus have present biocompatibility and bioactive potential. **Chapter 2-** The inflammatory reaction induced by tricalcium silicate cement replaced with 20% zirconium oxide (STC) e MTA Plus (MTAP) was evaluated in rat subcutaneous tissues. A polyethylene tube filled with STC ($n= 20$) and MTAP ($n= 20$) was placed into the dorsal subcutaneous of forty rats; in the control group (GC; $n= 20$), empty tubes were implanted. After 7, 15, 30 and 60 days, the polyethylene tubes surrounded by connective tissue were embedded in paraffin. The number of inflammatory cells was estimated in HE-stained sections; numerical density of interleukin-6 (IL-6)- immunolabelled cells was also performed. The differences amongst the groups were analysed statistically by Tukey's test ($P \leq 0.05$). A high number of inflammatory cells and IL-6-positive cells were observed at 7 days, in all groups; however, the number of inflammatory was significantly higher ($P \leq 0.05$) to STC and MTAP groups. The number of IL-6- positive cells in the capsules was not significantly different amongst GSTC, GMTAP and GC groups in each period. In the capsules of animals from all groups, a gradual and significant reduction ($P \leq 0.05$) of these parameters was seen over time. At 60 days, the connective tissue capsules exhibited numerous fibroblasts and bundles of collagen fibres. Experimental tricalcium silicate with 20% zirconium oxide and MTA Plus are biocompatible.

Keywords: Silicate cement. In vitro techniques. Inflammation.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2 PROPOSIÇÃO..... | 17 |
| 3 PUBLICAÇÃO 1..... | 18 |
| 4 PUBLICAÇÃO 2..... | 41 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 68 |
| REFERÊNCIAS..... | 70 |
| ANEXO- APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA..... | 74 |

1 INTRODUÇÃO

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) é indicado para o selamento de comunicações entre o canal radicular e o periodonto, como perfurações e reabsorções radiculares, e retrobturação em função das suas propriedades físico-químicas adequadas (Torabinejad et al.³⁶, 1995) e biocompatibilidade (da Fonseca et al.¹⁵, 2016; da Silva et al.¹⁶, 2011; Torabinejad, Parirokh³⁵, 2010). Também apresenta outras aplicabilidades como tratamento de dentes com rizogênese incompleta (Felippe et al.¹⁸, 2006) e capeamento pulpar direto (Li et al.²⁵, 2015). MTA é capaz de estimular a regeneração periodontal (da Silva et al.¹⁶, 2011) e perirradicular (Baek et al.², 2010).

O cimento Portland e o agente radiopacificador óxido de bismuto (Bi_2O_3) compõem o MTA (Camilleri et al.⁶, 2012). Os silicatos tricálcico e dicálcico representam 67,8% e 27,1%, respectivamente, da composição do cimento Portland (Camilleri⁹, 2011). O MTA é composto basicamente por silicato tricálcico (66,1%), silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, dióxido de silício e óxido de alumínio, além do Bi_2O_3 como radiopacificador (Camilleri et al.⁸, 2013).

O MTA apresenta algumas das propriedades ideais de um material reparador. No entanto, o cimento Portland e o MTA (ProRoot e Angelus) podem apresentar metais pesados em sua composição, sendo os níveis de arsênio maiores que o limite seguro especificado pela norma ISO 9917-1 de 2007 (Schembri et al.³¹, 2010). Além disso, há evidências de que o Bi_2O_3 interfere no mecanismo de hidratação (Camilleri¹⁰, 2007), promovendo falhas na microestrutura do cimento Portland. Como consequência, há um aumento na porosidade, resultando na diminuição da resistência do material (Coosmarawamy et al.¹², 2007).

A substituição do cimento Portland componente do MTA por silicato tricálcico tem sido avaliada (Camilleri⁹, 2011; Camilleri et al.⁶, 2012; Formosa^{19,21}, 2012), resultando em materiais com propriedades físico-químicas satisfatórias (Camilleri et al.^{8,7,5}, 2013, 2014; Grech et al.^{22,23}, 2013). A substituição do cimento Portland pelo silicato tricálcico permite um melhor

controle sobre as impurezas e inclusões de metais pesados encontrados no cimento Portland (Formosa et al.²¹, 2012).

O silicato tricálcico é composto por oxigênio, cálcio e silício, não contendo elementos menores, como alumínio, estrôncio, ferro e magnésio. Sua produção é mais segura, porque não sofre alteração durante a fabricação ou por conta da variabilidade da composição química das matérias-primas (Camilleri et al.⁸, 2013). Para ser utilizado como material reparador é necessário a incorporação de um agente radiopacificador ao silicato tricálcico, pois a sua radiopacidade é inferior aos 3 mm de espessura de alumínio como recomendado pelas normas internacionais (Formosa et al.²¹, 2012). Portanto, este material é produzido a partir de componentes puros e pode ser utilizado para a produção de cimentos odontológicos (Camilleri et al.⁶, 2012).

Cimentos à base de silicato tricálcico quando hidratados exibem silicato de cálcio e hidróxido de cálcio (Camilleri⁹, 2011; Formosa et al.¹⁹, 2012; Grech et al.²², 2013), sendo esse último o responsável pelo pH alcalino (Formosa et al.¹⁹, 2012). A bioatividade dos cimentos à base de silicato tricálcico está relacionada à produção de hidróxido de cálcio e formação de fosfato de cálcio quando em contato com o fluido tecidual (Formosa et al.¹⁹, 2012).

A substituição do Bi₂O₃ por outros radiopacificadores tem sido proposta (Antonijevic et al.¹, 2014; Camilleri et al.³, 2011; Cutajar et al.¹⁴, 2011; Silva et al.^{32,33}, 2014, 2015; Tanomaru-Filho et al.³⁴, 2012). Há evidências de que o óxido de zircônio (ZrO₂) é inerte e, portanto, não reage com os subprodutos da hidratação de cimentos à base de silicato tricálcico (Camilleri¹¹, 2015; Camilleri et al.³, 2011).

Um cimento experimental composto por 80% de silicato tricálcico puro (Mineral Research Processing, Meyzieu, França) e 20% de ZrO₂ (STC) vem sendo testado. O STC mostra propriedades físico-químicas satisfatórias quando avaliado em relação à radiopacidade, mineralogia, microestrutura, bioatividade, hidratação, pH e concentração de íons Ca²⁺ em comparação a outros cimentos à base de silicato de cálcio, como Biodentine, Bioaggregate e MTA (Camilleri et al.^{5,7,8}, 2014, 2013; Grech et al.^{22,23}, 2013). O cimento experimental apresenta radiopacidade maior que os 3 mm de alumínio

recomendados pela ISO 6876 de 2001 (Camilleri et al.⁸, 2013; Grech et al.²³, 2013), solubilidade negativa (Grech et al.²³, 2013) e deposição de hidroxiapatita na sua superfície quando em contato com fluido tecidual simulado, justificando a sua bioatividade (Camilleri et al.⁸, 2013; Grech et al.²³, 2013).

Modificações na composição do MTA deram origem ao MTA Plus (MTAP) (Avalon Biomed Inc., Bradenton, FL, EUA), material à base de silicato tricálcico na forma pó-líquido/gel disponível comercialmente. Segundo o fabricante, é indicado para terapias pulpares vitais (capeamento pulpar e pulpotomia) e procedimentos endodônticos (reparo de perfurações e reabsorções, apicificação, apicogênese, obturação de canal radicular e retrobturação). Sua composição consiste em silicato tricálcico, silicato dicálcico e Bi_2O_3 (Formosa et al.²⁰, 2013).

O MTAP apresenta partículas mais finas que o ProoRoot MTA, mas com a composição química semelhante (Camilleri et al.⁴, 2013). Quando em contato direto com fluidos, exhibe perda parcial de silicato de cálcio hidratado, microtrincas e liberação de hidróxido de cálcio; além disso, a interação com solução fisiológica resulta na inibição da hidratação (Camilleri et al.⁴, 2013). Como agente de proteção após pulpotomia em dentes de ratos, o MTAP induziu uma redução na imunopressão de IL-1 β e IL-1 α no tecido pulpar e formação de ponte de dentina aos 30 e 60 dias (Kramer et al.²⁴, 2014). Como material utilizado em pulpotomia de dentes com rizogênese incompleta, o MTAP induz liberação de hidróxido de cálcio como subproduto e formação de fosfato de cálcio quando em contato com fluido tecidual, porém, provoca manchamento em contato com o hipoclorito de sódio por conta do Bi_2O_3 (Camilleri¹¹, 2015).

A biocompatibilidade refere-se à capacidade de um biomaterial desempenhar sua função desejada, sem desencadear quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis aos indivíduos, mas gerando uma resposta celular e tecidual benéfica para a situação a qual foi planejado (Williams³⁷, 2008).

Testes *in vitro* representam o primeiro passo para avaliação e classificação do potencial ativo de materiais antes de usá-los em experimentos *in vivo*. Entre eles, testes de citotoxicidade *in vitro* são simples e reprodutíveis

para a avaliação de propriedades biológicas (Peters et al.²⁸, 2001). Cimentos à base de silicato de cálcio vêm sendo avaliados quanto a sua citotoxicidade e bioatividade em cultura de células, com adequada resposta biológica (Mestieri et al.^{26,27}, 2015, 2014). De acordo com os resultados de Mestieri et al.²⁶ (2015), o MTAP é biocompatível e bioativo em cultura de células da polpa dental humana.

Diversas linhagens celulares expostas aos cimentos à base de silicato de cálcio mostraram atividade de ALP, importante marcador da mineralização da matriz óssea (Mestieri et al.²⁶, 2015; Salles et al.³⁰, 2012).

A correlação entre reação inflamatória e imunexpressão de interleucina-6 (IL-6) tem sido observada após implantação de materiais à base de silicato de cálcio em subcutâneo de ratos (da Fonseca et al.¹⁵, 2016; Silva et al.^{32,33}, 2014, 2015). A IL-6 participa em diversos eventos biológicos e atua como um importante mediador da resposta do hospedeiro decorrente de uma lesão ou infecção teciduais, bem como de uma reação inflamatória. Níveis elevados de IL-6 podem estar correlacionados à extensão da inflamação e edema do tecido pulpar e ao seu papel como um mediador da resposta do hospedeiro em função da injúria tecidual e infecção (EISalhy et al.¹⁷, 2013). Portanto, é considerada um potente mediador subproduto da resposta inflamatória e marcador da inflamação (Rincon²⁹, 2012).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade e bioatividade do STC e MTAP em células de osteoblastos humanos (Saos-2). Ainda, investigar a reação inflamatória e a imunexpressão de IL-6 promovidas por esses materiais à base de silicato tricálcico em subcutâneo de ratos.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a biocompatibilidade e bioatividade do cimento experimental silicato tricálcico com 20% de óxido de zircônio (STC) e do MTA Plus (MTAP) em células humanas de osteoblastos (Saos-2, linhagem ATCC HTB-85) e em subcutâneo de ratos. Os objetivos específicos foram subdivididos em dois capítulos.

Publicação 1

O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade e bioatividade do STC e MTAP em células humanas de osteoblastos (Saos-2, linhagem ATCC HTB-85). Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a viabilidade celular por meio dos ensaios de MTT e Vermelho Neutro (NR);
- Analisar a bioatividade por meio da atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) e da presença de áreas mineralizadas coradas pelo Vermelho de Alizarina (ARS).

Publicação 2

O objetivo do presente estudo foi investigar a biocompatibilidade do STC e MTAP em subcutâneo de ratos. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar morfológica e quantitativamente o processo inflamatório induzido pelo STC e MTAP;
- Analisar a imunexpressão de interleucina-6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória, nas cápsulas adjacentes ao STC e MTAP.

3 PUBLICAÇÃO 1

Citotoxicidade e bioatividade de cimentos à base de silicato tricálcico em cultura de osteoblastos humanos (Saos-2) *

*** Padronizado pelas normas do periódico Journal of Applied Oral Science**

RESUMO

Cimentos à base de silicato tricálcico são desenvolvidos como alternativa ao Mineral Trióxido Agregado (MTA). **Objetivo:** Avaliar a citotoxicidade e bioatividade do cimento experimental silicato tricálcico com 20% de óxido de zircônio (STC) e MTA Plus (MTAP). **Material e métodos:** Células humanas de osteoblastos (Saos-2) expostas aos extratos do STC e MTAP foram utilizadas para análise da viabilidade celular por meio dos ensaios de MTT e Vermelho Neutro (NR), da bioatividade pela atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) e da presença de área mineralizada pela coloração de Vermelho de Alizarina (ARS). O controle foi realizado com células sem tratamento. Os dados obtidos para MTT, NR e ALP foram analisados por ANOVA e Bonferroni, e ARS, por ANOVA e Tukey ($\alpha = 0,05$). **Resultados:** Nos ensaios de viabilidade celular, os materiais não foram citotóxicos. Maior atividade de ALP ocorreu aos 7 dias, para todos materiais. No ARS, não houve diferença estatística entre os grupos MTAP e controle, sendo que STC apresentou menor área mineralizada. **Conclusão:** Conclui-se que o cimento experimental silicato tricálcico com 20% de óxido de zircônio e MTA Plus apresentam citocompatibilidade e potencial bioativo.

Palavras-chave: Cimento de silicato. Técnicas in vitro. Sobrevivência celular.

ABSTRACT

Tricalcium silicate- based cements have been developed as an alternative to Mineral Trióxido Agregado (MTA). **Objective:** To evaluate cytotoxicity and bioactivity of the tricalcium silicate cement replaced with 20% zirconium oxide (STC) e MTA Plus (MTAP). **Material na Methods:** Human osteoblastic cells (Saos-2) were exposed to test materials and assessed for viability, MTT and Neutral Red (NR) assay, and bioactivity for ALP activity assay and alizarin red staining (ARS). Unexposed cells acted as the control group. Statistical analysis was performed using ANOVA and the Bonferroni post- test to MTT, NR and ALP, and ANOVA and Tukey post- test ($\alpha = 0.05$) to ARS. **Results:** MTT and NR results, all tested cements were non-cytotoxic. The highest ALP activity occurred at the 7th days for all materials. ARS, there was no statistical difference between MTAP and control groups, STC showed lower mineralized area. **Conclusions:** experimental tricalcium silicate with 20% zirconium oxide and MTA Plus present proper biocompatibility and bioactive potential.

Keywords: Silicate cement. In vitro techniques. Cell survival.

INTRODUÇÃO

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) é um material capaz de estimular a regeneração periodontal¹⁸ e perirradicular². É composto pelo cimento Portland e o agente radiopacificador óxido de bismuto (Bi_2O_3)⁶. Os silicatos tricálcico e dicálcico representam 67,8% e 27,1%, respectivamente, da composição do cimento Portland⁹.

Tanto o cimento Portland quanto o MTA (ProRoot e Angelus) podem apresentar metais pesados em sua composição³³. Além disso, há evidências de que o Bi_2O_3 interfere no mecanismo de hidratação¹⁰, causando falhas na microestrutura do cimento Portland que levam ao aumento da porosidade e diminuição da resistência do material¹⁴.

A substituição do cimento Portland componente do MTA por silicato tricálcico tem sido avaliada^{6,9,21,23}. Para ser utilizado como material reparador, é necessária a incorporação de um agente radiopacificador ao silicato tricálcico, pois a sua radiopacidade é inferior aos 3 mm de espessura de alumínio²³.

A substituição do Bi_2O_3 por outros radiopacificadores tem sido proposta^{1,3,17,34,35,37}. O óxido de zircônio (ZrO_2) é inerte e, portanto, não reage com os subprodutos da hidratação de cimentos à base de silicato tricálcico^{3,11}.

Um cimento experimental composto por 80% de silicato tricálcico puro (Mineral Research Processing, Meyzieu, França) e 20% de ZrO_2 (STC) vem sendo testado. O STC mostra propriedades físico-químicas satisfatórias em relação à radiopacidade, mineralogia, microestrutura, bioatividade, hidratação, pH e concentração de íons Ca^{2+} em comparação a outros cimentos à base de silicato de cálcio, como Biodentine, Bioaggregate e MTA^{5,7,8,25,26}. O cimento experimental apresenta radiopacidade maior que os 3 mm de alumínio recomendados pela ISO 6876 de 2001^{8,26}, solubilidade negativa²⁶ e deposição de hidroxiapatita na sua superfície quando em contato com fluido tecidual simulado, justificando a sua bioatividade^{8,26}.

O MTA Plus (MTAP) (Avalon Biomed Inc., Bradenton, FL, EUA) é um material à base de silicato tricálcico na forma pó-líquido/gel e, segundo o fabricante, indicado para terapias pulpares vitais (capeamento pulpar e pulpotomia) e procedimentos endodônticos (reparo de perfurações e

reabsorções, apicificação, apicogênese, obturação de canal radicular e retrobturação). Sua composição consiste em silicato tricálcico, silicato dicálcico e Bi_2O_3 ²².

O MTAP mostrou biocompatibilidade e bioatividade em cultura de células da polpa dental humana²⁷ e células humanas de osteoblastos (Saos-2)¹⁵, sendo seus efeitos citotóxicos tempo e concentração dependentes²⁰.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade e bioatividade do STC e MTAP em células humanas de osteoblastos (Saos-2).

MATERIAL E MÉTODOS

Cultura de células

Células humanas de osteoblastos (Saos-2, linhagem ATCC HTB-85) foram cultivadas em frascos T-75 (Corning, Union City, CA), contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium- Sigma/ Aldrich, St Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB- Gibco/ Life Technologies Grand Island, NY, EUA), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) ou meio de cultura DMEM osteogênico (0.023 g/mL β -glicerolfosfato; 0.055 mg/mL ácido ascórbico – Sigma Chemicals, St Louis, MO), em estufa a 37°C, 95% de umidade, 5% de CO₂ até confluência.

Preparo dos extratos

Os materiais avaliados (Tabela 1) foram manipulados com água destilada na proporção pó/líquido em placas de vidro esterilizadas e colocados no fundo de placas de cultura de 12 poços (TPP - Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça) e hidratados com gaze estéril umedecida. As placas foram, então, levadas em estufa a 37°C durante 15 horas. Após exposição das placas à luz U.V. durante 30 minutos para desinfecção, 5 mL de meio de cultura DMEM sem SFB foram colocados em contato com os materiais. Após 24 horas em estufa a 37°C, 95% umidade e 5% CO₂, foram realizadas diluições de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 dos extratos dos cimentos para a realização dos experimentos.

Tabela 1 – Materiais avaliados.

| Grupo | Material | Composição | Proporção (pó/ água destilada) |
|-------|---|--|--------------------------------|
| STC | Cimento silicato tricálcico* com 20% de ZrO ₂ ** | Silicato de tricálcico, Óxido de zircônio | 1g/ 340 μ L de |
| MTAP | Mineral Trióxido Agregado Plus branco*** | Silicato tricálcico, Silicato Dicálcico, Sulfato de cálcio, Sílica, Óxido de bismuto | 1g/ 340 μ L |

* Mineral Research Processing, Meyzieu, França

** Sigma Chemicals, St Louis, Missouri, EUA

*** MTA Plus™ Avalon Biomed Inc., Bradenton, Flórida, EUA

Ensaio do MTT

O ensaio de MTT avalia a habilidade da enzima desidrogenase mitocondrial em converter o sal, 3- (4,5-dimethyl-thiazoyl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) de cor amarela e solúvel em água em compostos coloridos de formazan, cuja absorbância é proporcional a quantidade de células vivas.

Após plaqueamento das células de osteoblastos Saos-2 (1×10^5 células/mL) em placas de 96 poços com meio de cultura DMEM e 10% SFB, as mesmas foram expostas durante 24 horas aos extratos dos cimentos (200 μ L/poço) nas diluições de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 e controle negativo (meio de cultura DMEM). Após o período de exposição aos extratos dos cimentos, o meio de cultura foi trocado por 100 μ L de DMEM contendo 5 mg/mL de MTT (Sigma Chemicals, St Louis, MO) e as placas incubadas por 3 horas. Em seguida, foi adicionado 100 μ L de álcool isopropílico acificado (HCl: isopropylalcohol, 0.04N) para solubilizar o formazan. A densidade óptica foi mensurada em leitor de microplacas automático (ELx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT) no comprimento de onda de 570nm.

Ensaio do Vermelho Neutro (NR)

O ensaio determina os níveis de células viáveis através da integridade da membrana celular. O corante NR é incorporado por endocitose e acumula-se preferencialmente nos lisossomos de células viáveis com membrana intacta³².

Após plaqueamento das células de osteoblastos Saos-2 (1×10^5 células/mL) em placas de 96 poços com meio de cultura DMEM e 10% SFB, as mesmas foram expostas durante 24 horas com os eluídos dos cimentos (200 μ L/poço) nas diluições de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 e controle (meio de cultura DMEM). Após o período de 24 horas, os extratos foram removidos e, foi adicionado às células 100 μ L da solução de NR (0,05 mg/mL NR em meio de cultura DMEM sem soro) e as placas incubadas por 3 horas. Depois, adicionou-se ao extrato 100 μ L da solução de ácido acético e etanol (1% de etanol + 50% de álcool etílico). A densidade óptica foi mensurada em leitor de microplacas automático (ELx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT) no comprimento de onda de 570nm.

Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

O kit comercial da Labtest (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil) foi utilizado para avaliação da atividade enzimática da ALP. O princípio da metodologia está na hidrólise da timolftaleínamonofosfato pela fosfatase alcalina, que deverá liberar a timolftaleína de cor azul em meio alcalino, sendo a intensidade de cor diretamente proporcional à atividade enzimática.

As células Saos-2 (1×10^5 células/mL) foram expostas ao extrato dos cimentos na diluição de 1:8, durante o período de 1, 3 e 7 dias. Em cada avaliação de atividade de ALP, 200 μ L da solução de Lauril sulfato de sódio/água destilada 1% (Sigma/Aldrich) era adicionado a cada poço da cultura de células. A densidade óptica foi mensurada em leitor de microplacas automático (ELx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT) no comprimento de onda de 590nm.

A avaliação da atividade da ALP foi normalizada pelo número de células viáveis no ensaio de MTT nos períodos de 1, 3 e 7 dias³¹.

Vermelho de Alizarina (ARS)

O corante vermelho de alizarina é usado para identificar depósito de cálcio para a formação óssea em estudos *in vitro*³⁶.

Saos-2 foram plaqueadas (2×10^4 células/mL) em placas de cultura de 24 poços e expostas aos extratos dos cimentos (diluição 1:8), a troca do meio de cultura foi realizado a cada 48 horas. Após 21 dias, os poços lavados com PBS 1X e as células fixadas com 10% de paraformaldeído (Sigma/Aldrich) em temperatura ambiente por 15 minutos. As monocamadas foram lavadas duas vezes com água destilada anteriormente a adição de 500 μ L do corante de vermelho de alizarina (2%- pH 4.1). Em seguida, as placas de cultura foram incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos. As imagens foram obtidas com uso de câmera digital (Canon Power Shot SX220 HS; Canon Inc, Tóquio, JP). A área mineralizada foi avaliada no programa ImageTool (San Antonio, Texas, USA)¹⁵.

Análise estatística dos resultados

Os dados foram apresentados como média e desvio padrão da média de nove amostras obtidas de três experimentos independentes. Os dados submetidos a análises pelo programa estatístico GraphPadPrism 5 (GraphPad Software In., San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados dos ensaios de MTT, NR e da ALP foram analisados empregando Two-way ANOVA e Bonferroni ($\alpha = 0,05$). Os dados do ensaio vermelho de alizarina foram analisados empregando teste ANOVA e Tukey ($\alpha = 0,05$).

RESULTADOS

Viabilidade celular (MTT)

O teste que avalia viabilidade celular, MTT, realizado na linhagem célula humana de osteoblastos Saos-2 mostrou menor viabilidade celular para os materiais STC e MTAP na diluição de 1:1 quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Na diluição de 1:2, 1:4 e 1:8, os materiais avaliados não apresentaram efeito citotóxico, com viabilidade similar ao grupo controle ($p > 0,05$) (Fig. 1A).

Viabilidade celular (NR)

O ensaio de viabilidade celular realizado pelo método do corante vital Vermelho Neutro mostrou que os materiais avaliados não apresentaram efeito citotóxico, com viabilidade maior ($p < 0,05$) ou similar ao grupo controle ($p > 0,05$), dependendo da diluição (Fig. 1B). Esse teste de avaliação da citotoxicidade corroborou com os resultados do MTT, demonstrando aumento da proliferação celular na diluição de 1:8 (Fig. 1B).

Desta forma, os experimentos subsequentes foram realizados na diluição de 1:8

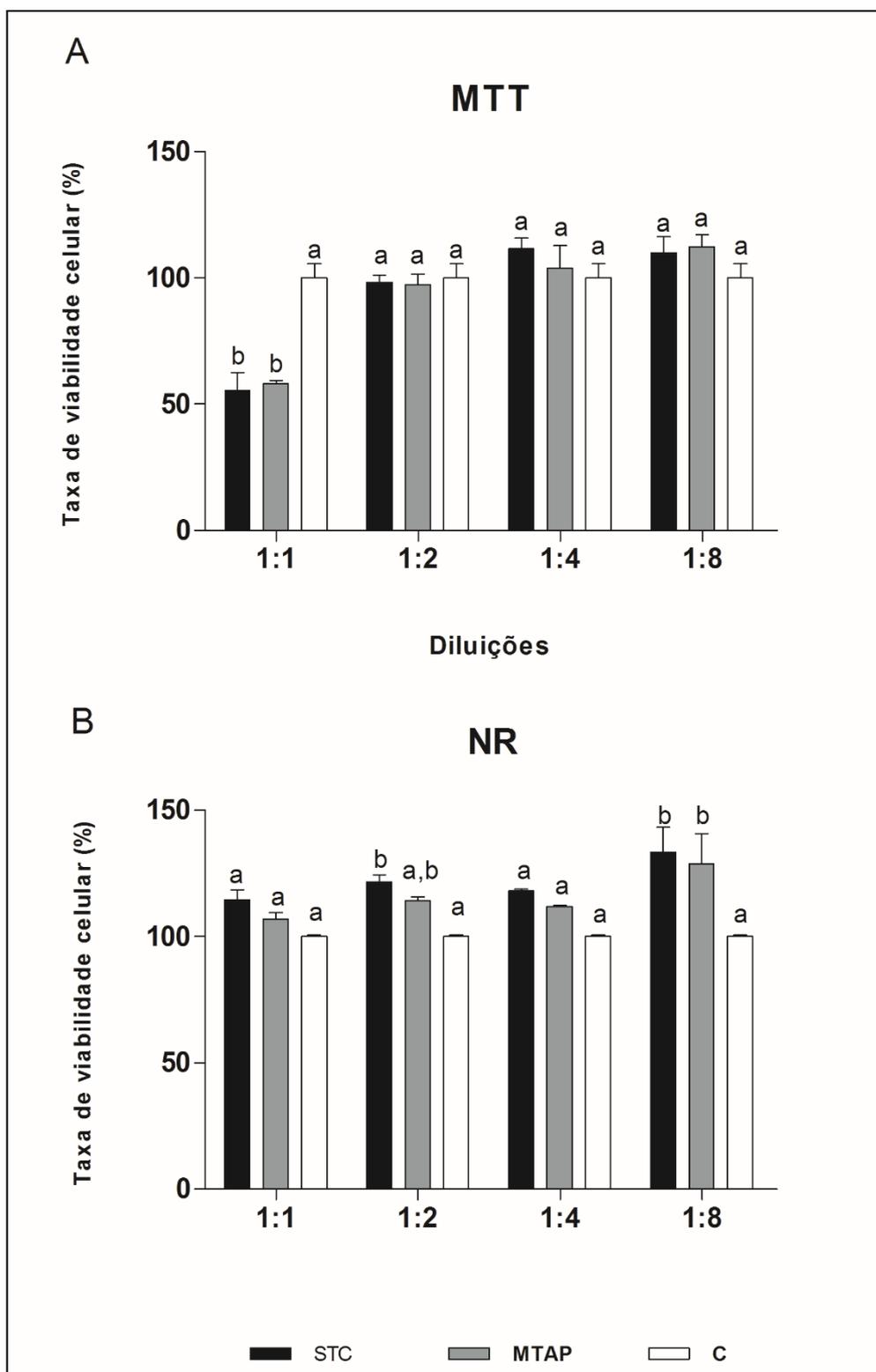


Figura 1 – Viabilidade de osteoblastos humanos (Saos-2) avaliada pelos ensaios de MTT **(A)** e Vermelho Neutro (NR) **(B)** após 24 horas de exposição a diferentes diluições dos cimentos (1:1, 1:2; 1:4 e 1:8) STC e MTAP, e meio de cultura sem SFB foi usado como controle. Barras com diferentes letras representam diferença estatística significativa entre os extratos dos cimentos e grupo controle. ANOVA e Bonferroni ($p < 0,05$). STC = Silicato tricálcico com 20% de ZrO_2 , MTAP = MTA Plus e C = controle.

Atividade da Fosfatase Alcalina (ALP)

No primeiro dia de exposição aos extratos dos cimentos foi observada menor viabilidade celular (Fig. 2A), já nos períodos subsequentes, houve aumento de viabilidade. Em relação a atividade de ALP, maior atividade foi observada no primeiro e sétimo dia de exposição e menor, no terceiro dia (Fig. 2B). No terceiro dia de exposição aos extratos dos cimentos não houve diferença significativa em relação ao controle nos resultados de viabilidade celular (MTT) ($p > 0,05$). No terceiro dia, a atividade de ALP foi maior ($p < 0,05$) ou similar ao grupo controle ($p > 0,05$). A melhor atividade de ALP foi detectada em sete dias de exposição aos extratos dos cimentos, porém não houve diferença entre os grupos STC e MTAP em relação ao grupo controle ($p > 0,05$).

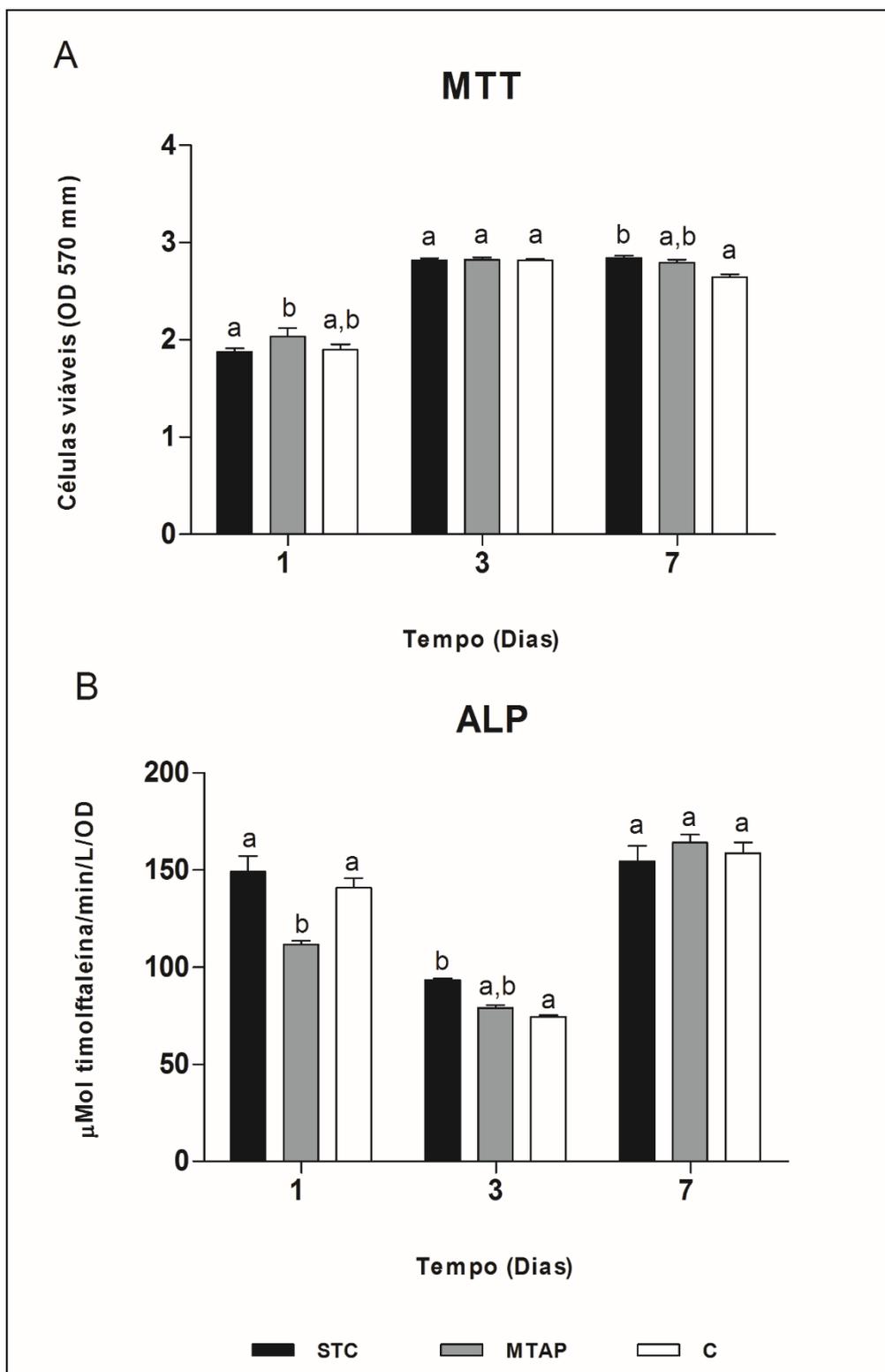


Figura 2 – (A) Viabilidade das células Saos-2 e **(B)** Atividade de enzima Fosfatase Alcalina (ALP) avaliadas após exposição aos extratos de cimentos STC e MTAP na diluição de 1:8, e meio de cultura (controle) nos períodos de 1, 3 e 7 dias. Barras com diferentes letras representam diferença estatística significativa entre os extratos dos cimentos e grupo controle. ANOVA e Bonferroni ($p < 0,05$). STC = Silicato tricálcico com 20% de ZrO_2 , MTAP = MTA Plus e C = controle.

Ensaio Vermelho de Alizarina (ARS)

Após 21 dias de exposição da linhagem celular de osteoblastos humanos Saos-2 aos extratos dos cimentos, não houve diferença estatística entre os grupos MTAP e controle ($p < 0,05$), no entanto, o STC apresentou menor área mineralizada quando comparado aos demais grupos ($p > 0,05$) (Fig. 3A e 3B).

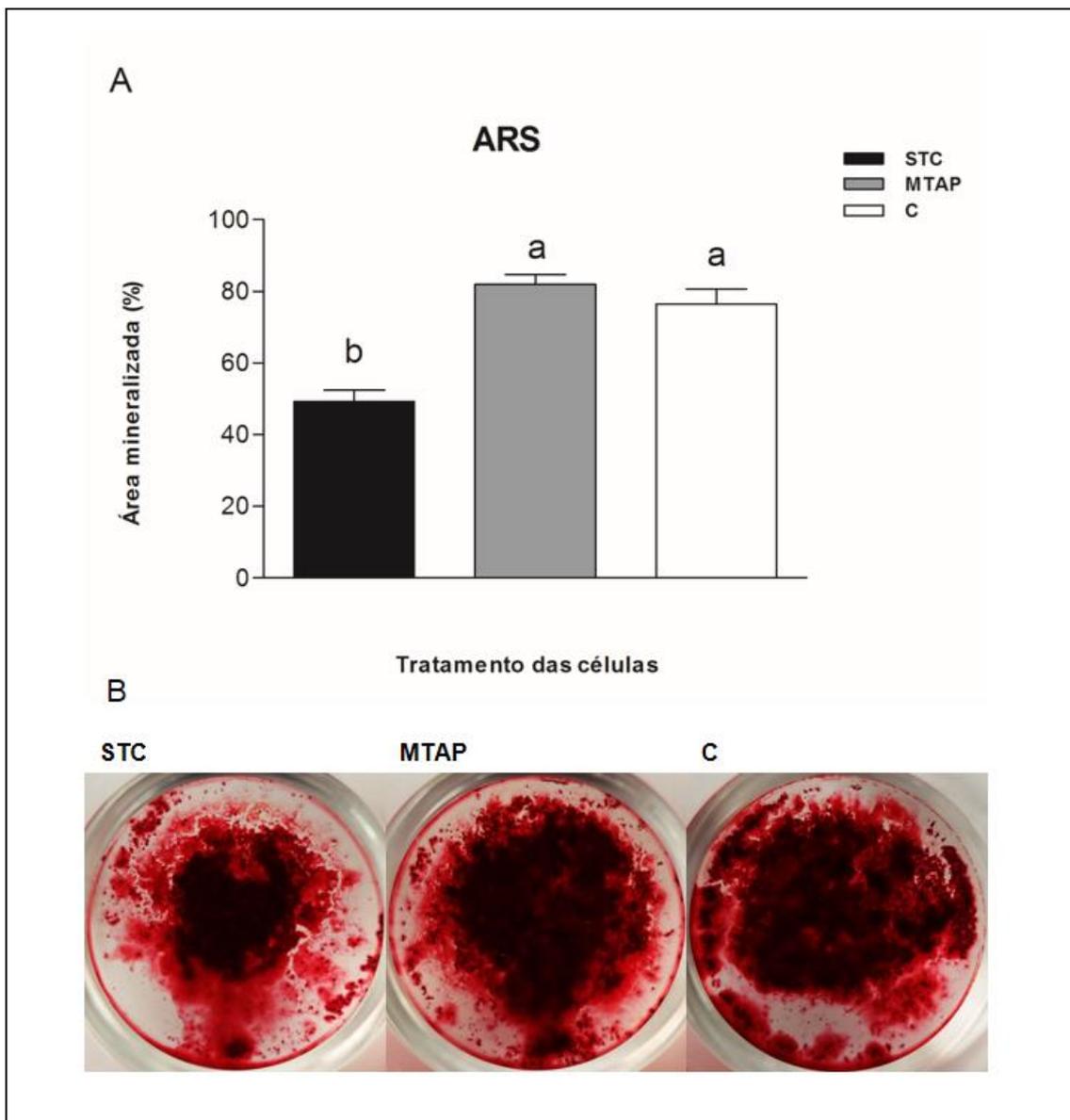


Figura 3 – (A) Área mineralizada formada após exposição da linhagem Saos-2 aos extratos de cimentos STC e MTAP na diluição de 1:8, e meio de cultura osteogênico (controle). **(B)** Imagens da área mineralizada corada pelo ensaio Vermelho de Alizarina (ARS). Barras com diferentes letras representam diferença estatística significativa entre os extratos dos cimentos e controle. ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). STC = Silicato tricálcico com 20% de ZrO_2 , MTAP= MTA Plus e C = controle.

DISCUSSÃO

Células humanas de osteoblastos (Saos-2) são utilizadas em ensaios *in vitro* para avaliação de cimentos endodônticos e reparadores^{15,28,29,31}. Além disso, o uso de extratos desses materiais para avaliação da citotoxicidade é considerado um método de rotina para investigação *in vitro* do potencial efeito tóxico da liberação de subprodutos³⁰.

De acordo com os resultados do MTT e NR, os materiais avaliados, STC e MTAP, não mostraram efeito citotóxico, com viabilidade celular similar ou maior que o grupo controle para todas as diluições; exceto no MTT, no qual as células humanas de osteoblastos (Saos-2) em contato com os extratos do STC e MTAP mostraram menor viabilidade celular do que as células não expostas na diluição de 1:1. O ensaio NR corroborou com os resultados do MTT, confirmando o aumento da proliferação celular na diluição de 1:8. Desta forma, os experimentos subsequentes foram realizados na diluição de 1:8.

A exposição ao MTAP revelou o aumento da viabilidade de osteoblastos humanos (Saos-2) de maneira dose dependente, sendo essa taxa similar ou maiores em comparação ao grupo controle nas diluições de 1:4 e 1:8¹⁵. Resultado semelhante foi encontrado ao avaliar a citotoxicidade, por meio do teste XTT, do MTAP em células odonoblastóides de rato (MDPC-23)²⁰. Ainda, células da polpa dentária humana (hCPCs) expostas aos extratos do MTAP exibiram viabilidade em todas as concentrações avaliadas, sendo similar ao controle, no MTT; no entanto, no NR, hCPCs expostas ao material mostraram um aumento significativo da viabilidade quando comparado ao controle²⁷. Portanto, o MTAP não apresenta citotoxicidade em diferentes linhagens celulares.

De Deus, et al.¹⁹ (2009), mostraram a compatibilidade *in vitro* de cimento à base de silicato tricálcico (Pro-Root MTA e DiaRoot BioAggregate) após combinação dos testes: XTT, NR e Cristal violeta. Scelza, et al.³² (2012) utilizaram o ensaio de NR para avaliar a viabilidade celular das células osteoblásticas primárias humanas quando em contato com diferentes cimentos endodônticos (Sealapex, Pulp Canal Sealer EWT, Real Seal e MTA Fillapex).

Todos eles mostraram citotoxicidade após 24 h. Houve uma correlação entre citotoxicidade dos materiais e o tempo após manipulação.

O ZrO_2 quando acrescido ao cimento Portland é um radiopacificador biocompatível às células do ligamento periodontal (mPDL) e de osteossarcoma (ROS 17/2.8)²⁴. Entretanto, no presente estudo, O MTAP, composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico e Bi_2O_3 ²², mostrou ser citocompatível em cultura de osteoblastos humanos (Saos-2). Camilleri, Sorrentino e Damidot⁸ (2013) avaliaram o MTAP em relação à caracterização e reação de hidratação quando exposto a diferentes condições ambientais. Os autores concluíram que esse material, em contato direto com fluidos, exibiu perda parcial de silicato de cálcio hidratado e liberação do hidróxido de cálcio. A hidratação completa do material pode justificar a melhor resposta celular após sua reação de presa, mesmo contendo Bi_2O_3 .

Eid, et al.²⁰ (2014) avaliaram a viabilidade celular, apoptose/necrose e stress oxidativo do MTA Plus branco e cinza em diferentes proporções água/pó; gel/pó em células odontoblastóides de ratos (MDPC-23), comparados com MTA ProRoot branco e cinza. Os autores concluíram que a viabilidade do MTA Plus é tempo/concentração dependente, assim os riscos citotóxicos tornam-se desprezíveis após a diluição dos componentes. Além disso, o MTA Plus favoreceu a redução do stress oxidativo nas células MDPC-23. No presente estudo, nota-se também que o grupo MTAP Plus mostrou maiores taxa de viabilidade na maior diluição (1:8).

A bioatividade do STC e MTAP foi avaliada por meio da atividade da ALP e da presença de área mineralizada por meio do ensaio ARS, assim como realizado por outros estudo^{12,13,15,31}. Chang, et al.¹² (2015), observaram atividade da ALP e formação de nódulos mineralizados corados por ARS para cimentos à base de silicato de cálcio (MicroMega MTA, RetroMTA, ProRoot MTA e um cimento experimental).

Os resultados do presente estudo mostraram atividade da ALP em todos os grupos (STC, MTAP e controle), sendo a maior atividade em 1 e 7 dias e menor, aos 3 dias. Estudo anteriores, ao utilizar as células de osteoblastos humanos (Saos-2), mostraram um aumento significativo da atividade da APL após 7 dias de exposição ao cimento à base de MTA (MTA Fillapex)³¹. A

mesma linhagem celular exposta ao MTAP exibiu aumento da atividade de ALP ao longo dos períodos experimentais (1, 3 e 7 dias), sendo essa atividade tempo dependente¹⁵. Ainda, resultados mostram melhor atividade de ALP em células de osteoblastos humanos (Saos-2) depois de 3 dias de exposição a diferentes cimentos à base de silicato de cálcio associado ao Nb₂O₅. Enquanto que, hDPCs expostas ao MTAP exibiram atividade de ALP similar ao grupo controle ao longo dos períodos avaliados (1 e 3 dias)²⁷.

A expressão do gene ALP, importante marcador da mineralização da matriz óssea, foi menor para o MTAP em comparação ao controle depois de 1 e 3 dias de exposição da Saos-2 ao extrato do material na diluição de 1:8¹⁵. A deposição de nódulos de mineralização observada no ensaio ARS evidencia que os cimentos à base de silicato tricálcico avaliados promovem a formação de nódulos mineralizados semelhante ao controle, resultado equivalente encontrado para o MTAP em estudo anterior¹⁵.

Material à base de silicato tricálcico (Biodentine), que apresenta ZrO₂ como radiopacificador, induziu a diferenciação das células da polpa em odontoblastóides estimulando a mineralização por meio da expressão de genes como fosfatase alcalina (ALP), colágeno tipo 1 (COL I) e osteocalcina (OC), ainda houve depósitos minerais por meio do ensaio ARS³⁸.

Cimentos à base de silicato tricálcico quando hidratados exibem silicato de cálcio e hidróxido de cálcio^{9,21,25}, sendo esse último o responsável pelo pH alcalino²¹ (Formosa et al. 2012). A bioatividade dos cimentos à base de silicato tricálcico está relacionada à produção de hidróxido de cálcio e formação de fosfato de cálcio quando em contato com o fluido tecidual simulado²¹.

Materiais endodônticos à base de silicato de cálcio exibem suprarregulação a expressão de marcadores de diferenciação odontoblástica como osteonectina, osteopontina, osteocalcina, sialofosfoproteína e proteína da matriz dentinária em hDPCs¹². O MTAP mostra efeito estimulante na proliferação de células mesenquimais humanas, atividade de ALP e regeneração de defeitos ósseos *ex vivo*, sendo a resposta osteogênica dose e tempo dependentes¹⁶.

A atividade de ALP apresentada pelas células de osteoblastos humanos (Saos-2) expostas ao ProRoot MTA foi semelhante à atividade encontrada pelas células não expostas, sugerindo que esse material não interferiu na bioatividade celular neste modelo experimental²⁹. Da mesma forma, no presente estudo, as áreas mineralizadas exibidas pelo STC e MTAP foram semelhantes ao grupo controle, mostrando similar formação de nódulos mineralizados.

CONCLUSÃO

Conclui-se que os cimentos à base de silicato tricálcico avaliados apresentam citocompatibilidade. As células humanas de osteoblastos (Saos-2) exibiram atividade de ALP quando expostas ao cimento silicato tricálcico com 20% de ZrO_2 e MTA Plus, indicando potencial bioativo.

REFERÊNCIAS

1. Antonijevic D, Medigovic I, Zrilic M, Jokic B, Vukovic Z, Todorovic L. The influence of different radiopacifying agents on the radiopacity, compressive strength, setting time, and porosity of Portland cement. *Clin Oral Investig.* 2014;18:1597-604.
2. Baek SH, Lee WC, Setzer FC, Kim S. Periapical bone regeneration after endodontic microsurgery with three different root-end filling materials: amalgam, SuperEBA, and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2010;36: 1323-5.
3. 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.
4. Camilleri J, Formosa L, Damidot. The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J.* 2013;46:831-40.
5. Camilleri J, Grech L, Galea K, Keir D, Fenech M, Formosa L, et al. Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. *Clin Oral Investig.* 2014;18:1437-46.
6. Camilleri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements *Int Endod J.* 2012;45:737-43.
7. Camilleri J, Laurent P, About I. Hydration of Biodentine, Theracal LC, and a prototype tricalcium silicate-based dentin replacement material after pulp capping in entire tooth cultures. *J Endod.* 2014;40:1846-54.
8. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater.* 2013;29:580-93.
9. Camilleri J. Characterization and hydration kinetics of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Dent Mater.* 2011;27:836-44.
10. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2007;40:462-70.
11. Camilleri, J. Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine Used for Pulpotomy Procedures. *J Endod.* 2015;41:1139-45.
12. Chang SW, Bae WJ, Yi JK, Lee S, Lee DW, Kum KY, et al. Odontoblastic differentiation, inflammatory response, and angiogenic potential of 4 calcium silicate-based cements: micromega mta, proroot mta, retromta, and experimental calcium silicate cement, *J Endod.* 2015;41:1524-9.
13. Chang SW, Lee SY, Kang KY, Kim EC. In vitro biocompatibility, inflammatory response and osteogenic potential of 4 root canal sealer: Sealapex, Sanki apatite root sealer, MTA Fillapex and iRoot SP root canal sealer. *J Endod.* 2014;40:1642-8.

14. 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.
15. Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and experimental calcium silicate-based cements in human osteoblast-like cells. *Int Endod J.* 2015. [Epub ahead of print].
16. Costa F, Sousa Gomes P, Fernandes MH. Osteogenic and Angiogenic Response to Calcium Silicate-based Endodontic Sealers. *J Endod.* 2016; 42:113-9.
17. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mater.* 2011;27:879-91.
18. da 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.
19. De Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. *J Endod.* 2009;35:1387-90.
20. Eid AA, Gosier JL, Primus CM, Hammond BD, Susin LF, Pashley DH. In vitro biocompatibility and oxidative stress profiles of different hydraulic calcium silicate cements. *J Endod.* 2014;40:255-60.
21. Formosa LM, Mallia B, Bull T, Camilleri J. The microstructure and surface morphology of radiopaque tricalcium silicate cement exposed to different curing conditions. *Dent Mater.* 2012;28:584-95.
22. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. Mineral trioxide aggregate with anti-washout gel - properties and microstructure. *Dent Mater.* 2013;29:294-306.
23. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. The effect of curing conditions on the physical properties of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Int. Endod J.* 2012;45:326-36.
24. Gomes Cornélio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod.* 2011;37:203-10.
25. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J.* 2013;46:632-41.
26. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Denta Mater.* 2013;29:20-8.
27. Mestieri LB, Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Biocompatibility and bioactivity of calcium silicatebased endodontic sealers in human dental pulp cells. *J Appl Oral Sci.* 2015;23:467-71.

28. Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornélio AL, Salles LP, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement associated with niobium oxide micro and nanoparticles. *J Appl Oral Sci.* 2014;22:554-9.
29. Modareszadeh MR, Di Fiore PM, Tipton DA, Salamat N. Cytotoxicity and alkaline phosphatase activity evaluation of endosequence root repair material. *J Endod.* 2012;38:1101-5.
30. Petrović V, Opačić-Galić V, Živković S, Nikolić B, Danilović V, Miletić V, et al. Biocompatibility of new nanostructural materials based on active silicate systems and hydroxyapatite: in vitro and in vivo study. *Int Endod J.* 2015;48:966-75.
31. Salles LP, Gomes-Cornélio AL, Guimarães FC, Herrera BS, Bao SN, Rossa-Junior C, et al. Mineral Trioxide Aggregate–based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod.* 2012;38:971-6.
32. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J.* 2012;45:12-8.
33. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod.* 2010;36:1210-5.
34. Silva GF, Bosso R, Ferino RV, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102:4336-45.
35. Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agent calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Invest.* 2015;19:2012-25.
36. Souter P, Horner A, Cunningham JC. Quantification of in vitro mineralisation using ion chromatography. *Anal Biochem.* 2011;15:244-7.
37. Tanomaru-Filho M, Morales V, da Silva GF, Bosso R, Reis JMSN, Húngaro-Duarte MA, et al. Compressive Strength and Setting Time of MTA and Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents. *ISRN Dent.* 2012;2012:1-4.
38. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod.* 2012;38:1220–6.

4 PUBLICAÇÃO 2

Resposta tecidual e imunoexpressão de IL-6 promovidas por cimentos à base de silicato tricálcico em subcutâneo de ratos *

*** Padronizado pelas normas do periódico International Endodontic Journal**

RESUMO

Objetivo: Avaliar a reação inflamatória induzida pelo cimento experimental silicato tricálcico com 20% de óxido de zircônio (STC) e o MTA Plus (MTAP) em subcutâneo de ratos. **Material e métodos:** Tubos de polietileno foram preenchidos com STC (n= 20) e MTAP (n= 20) e implantados no subcutâneo dorsal de quarenta ratos. No grupo controle (GC; n= 20), tubos vazios foram implantados. Após 7, 15, 30 e 60 dias, os tubos de polietileno com o tecido conjuntivo circundante foram fixados e embebidos em parafina. O número de células inflamatórias foi obtido pelos cortes corados em HE; a densidade numérica de células imunomarcadas para interleucina-6 (IL-6) também foi realizada. As diferenças entre os grupos foram analisadas estatisticamente pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). **Resultados:** Elevado número de células inflamatórias e imunomarcadas para IL-6 foram observadas aos 7 dias, em todos os grupos; no entanto, o número de células inflamatórias foi significativamente maior para os grupos STC e MTAP ($p \leq 0,05$). Diferenças significantes não foram detectadas em relação ao número de células imunomarcadas para IL-6 nas cápsulas entre os grupos GSTC, GMTAP e GC, em cada período. Uma redução gradativa e significativa ($p \leq 0,05$) da reação inflamatória e imunomarcção para IL-6 foi observada, em todos os grupos. Aos 60 dias, as cápsulas de tecido conjuntivo denso exibiram diversos fibroblastos e feixes organizados de fibras colágenas. **Conclusão:** O cimento experimental silicato tricálcico com 20% de óxido de zircônio e o MTA Plus são materiais biocompatíveis.

Palavras-chave: Silicato tricálcico, óxido de zircônio, biocompatibilidade, imuno-histoquímica, interleucina-6.

ABSTRACT

Aim: To evaluate the inflammatory reaction induced by tricalcium silicate cement replaced with 20% zirconium oxide (STC) e MTA Plus (MTAP) in rat subcutaneous tissues. **Methodology:** A polyethylene tube filled with STC (n= 20) and MTAP (n= 20) was placed into the dorsal subcutaneous of forty rats; in the control group (GC; n= 20), empty tubes were implanted. After 7, 15, 30 and 60 days, the polyethylene tubes surrounded by connective tissue were embedded in paraffin. The number of inflammatory cells was estimated in HE-stained sections; numerical density of interleukin-6 (IL-6)- immunolabelled cells was also performed. The differences amongst the groups were analysed statistically by Tukey's test ($P \leq 0.05$). **Results:** A high number of inflammatory cells and IL-6-positive cells were observed at 7 days, in all groups; however, the number of inflammatory was significantly higher ($P \leq 0.05$) to STC and MTAP groups. The number of IL-6- positive cells in the capsules was not significantly different amongst GSTC, GMTAP and GC groups in each period. In the capsules of animals from all groups, a gradual and significant reduction ($P \leq 0.05$) of these parameters was seen over time. At 60 days, the connective tissue capsules exhibited numerous fibroblasts and bundles of collagen fibres. **Conclusions:** Experimental tricalcium silicate with 20% zirconium oxide and MTA Plus are biocompatible.

Keywords: tricalcium silicate, zirconium oxide, biocompatibility, immunohistochemistry, interleukin-6.

INTRODUÇÃO

O cimento Portland e o agente radiopacificador óxido de bismuto (Bi_2O_3) compõem o MTA (Mineral Tróxido Agregado) (Camilleri *et al.* 2012). Biomateriais à base de silicato tricálcico têm sido avaliados (Camilleri 2011, Camilleri *et al.* 2012, Formosa *et al.* 2012a, Formosa *et al.* 2012b), resultando em materiais com propriedades físico-químicas satisfatórias (Camilleri *et al.* 2013b, Grech *et al.* 2013a, Grech *et al.* 2013b, Camilleri *et al.* 2014a, Camilleri *et al.* 2014b). Essa substituição permite um melhor controle sobre as impurezas e inclusões de metais pesados encontrados no MTA (Formosa *et al.* 2012b).

O silicato tricálcico não sofre alteração durante a fabricação e não apresenta variabilidade da composição química das matérias-primas (Camilleri *et al.* 2013b). Para ser utilizado como material reparador, é necessária a incorporação de um agente radiopacificador ao silicato tricálcico, pois a sua radiopacidade é inferior aos 3 mm de espessura de alumínio como recomendado pelas normas internacionais (Formosa *et al.* 2012b).

A substituição do Bi_2O_3 , componente do MTA, por outros radiopacificadores tem sido proposta (Bortolluzi *et al.* 2009, Húngaro Duarte *et al.* 2009, Camilleri *et al.* 2011b, Cutajar *et al.* 2011, Tanomaru-Filho *et al.* 2012, Silva *et al.* 2014, Silva *et al.* 2015, Antonijevic *et al.* 2014). Há evidências de que o óxido de zircônio (ZrO_2) é inerte e, portanto, não reage com os subprodutos da hidratação de cimentos à base de silicato tricálcico (Camilleri *et al.* 2011b, Camilleri 2015).

Um cimento experimental composto por 80% de silicato tricálcico puro (Mineral Research Processing, Meyzieu, França) e 20% de ZrO_2 (STC) vem sendo estudado, com propriedades físico-químicas satisfatórias quando avaliado em relação à radiopacidade, mineralogia, microestrutura, bioatividade, hidratação, pH e concentração de íons Ca^{2+} em comparação a outros cimentos à base de silicato de cálcio, como Biodentine, Bioaggregate e MTA (Camilleri *et al.* 2013a, Grech *et al.* 2013a, Grech *et al.* 2013b, Camilleri *et al.* 2014a, Camilleri *et al.* 2014b). O cimento experimental apresenta radiopacidade maior que os 3 mm de alumínio recomendados pela ISO 6876 de 2001 (Camilleri *et al.* 2013b, Grech *et al.* 2013b), baixa solubilidade (Grech *et al.* 2013b) e

deposição de hidroxiapatita na sua superfície quando em contato com fluido tecidual simulado, justificando a sua bioatividade (Camilleri *et al.* 2013b, Grech *et al.* 2013b).

MTA Plus (MTAP) (Avalon Biomed Inc., Bradenton, FL, EUA) é um material à base de silicato tricálcico na forma pó-líquido/gel. Segundo o fabricante, é indicado para terapias pulpares vitais (capeamento pulpar e pulpotomia) e procedimentos endodônticos (reparo de perfurações e reabsorções, apicificação, apicegênese, obturação de canal radicular e retrobturação). Sua composição consiste em silicato tricálcico, silicato dicálcico e Bi_2O_3 (Formosa *et al.* 2013).

O MTAP apresenta partículas mais finas que o ProoRoot MTA, mas com a composição química semelhante (Camilleri *et al.* 2013a). Como material utilizado em pulpotomia de dentes com rizogênese incompleta, o MTAP induz liberação de hidróxido de cálcio como subproduto e formação de fosfato de cálcio quando em contato com fluido tecidual (Camilleri 2015). Como agente de proteção após pulpotomia em dentes de ratos, o MTAP promoveu baixa imunexpressão de IL-1 β e IL-1 α no tecido pulpar e formação de ponte de dentina aos 30 e 60 dias (Kramer *et al.* 2014).

A correlação entre reação inflamatória e imunexpressão de interleucina-6 (IL-6) tem sido observada após implantação de materiais à base de silicato de cálcio em subcutâneo de ratos (Silva *et al.* 2014, Silva *et al.* 2015, da Fonseca *et al.* 2016). A IL-6 participa em diversos eventos biológicos e atua como um importante mediador da resposta do hospedeiro decorrente de uma lesão ou infecção teciduais, bem como de uma reação inflamatória. Níveis elevados de IL-6 podem estar correlacionados à extensão da inflamação e edema do tecido pulpar e ao seu papel como um mediador da resposta do hospedeiro em função da injúria tecidual e infecção (EISalhy *et al.* 2013).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a reação tecidual promovida pelo STC e MTAP no tecido subcutâneo de ratos. Para esse propósito, foram realizadas análises morfológica e morfométrica, bem como reação imuno-histoquímica para detecção de IL-6. A hipótese nula é a de que os materiais não apresentem biocompatibilidade no tecido subcutâneo de ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O protocolo da presente pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP (Processo CEUA nº 33/2014, em Anexo).

Neste estudo, foram utilizados sessenta ratos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*) adultos jovens, pesando em média 220 gramas, adquiridos do biotério de Criação da Faculdade de Odontologia localizado no Campus de Araraquara (UNESP). Todos os animais foram mantidos no biotério de manutenção da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), em ambiente com temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55\pm 10\%$) controladas e fotoperíodo de 12 horas. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno forradas com maravalha e receberam ração e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos equitativamente em três grupos: GSTC (Silicato tricálcico; Mineral Research Processing, Meyzieu, França; 20% de ZrO_2 ; Sigma Chemicals, St Louis, Missouri, EUA), GMTAP (Mineral Trióxido Agregado Plus; MTA Plus™ Avalon Biomed Inc., Bradenton, Flórida, EUA) e GC (Grupo controle; tubos de polietileno vazios). A composição e proporção dos materiais avaliados estão descritos na Tabela 1. Os implantes permaneceram no subcutâneo por 7, 15, 30 ou 60 dias; foram utilizados 5 animais por grupo em cada período.

Tabela 1 – Materiais avaliados.

| Grupo | Material | Composição | Proporção (pó/água destilada) |
|-------|---|--|-------------------------------|
| GSTC | Cimento silicato tricálcico* com 20% de ZrO_2 ** | Silicato tricálcico, Óxido de zircônio | 1g/ 340 μL de |
| GMTAP | Mineral Trióxido Agregado Plus branco*** | Silicato tricálcico, Silicato Dicálcico, Sulfato de cálcio, Sílica, Óxido de bismuto | 1g/ 340 μL |

* Mineral Research Processing, Meyzieu, França

** Sigma Chemicals, St Louis, Missouri, EUA

*** MTA Plus™ Avalon Biomed Inc., Bradenton, Flórida, EUA

Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com uma solução contendo 80 mL/kg cloridrato de cetamina a 10% (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) e 4 mL/kg de cloridrato de xilazina a 2% (União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, São Paulo, Brasil), administrada por via intraperitoneal com seringa e agulha de insulina.

O animal foi posicionado em decúbito ventral para realização da tricotomia e antissepsia com solução de iodo a 5% da região dorsal. Uma incisão de 2 cm foi realizada no sentido crânio-caudal com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15 (Fibra Cirúrgica, Joinville, Santa Catarina, Brasil). A pele foi divulsionada com tesoura de ponta romba e, posteriormente, foi inserido um tubo de polietileno (Embramed Indústria e comércio Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil) medindo 10 mm de comprimento x 1,5 mm de diâmetro, previamente esterilizado em óxido de etileno. Os tubos foram preenchidos com os materiais descritos no Quadro 1 e, no grupo controle (GC), os tubos permaneceram vazios. Em cada animal foi colocado somente um implante no subcutâneo dorsal. O local da pele incisada foi suturado com pontos simples utilizando fio de seda 4-0 (Ethicon Inc., São José dos Campos, São Paulo, Brasil).

Após 7, 15, 30 e 60 dias aos implantes, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico para remoção dos implantes com os tecidos circundantes.

Processamento histológico

Os tecidos circunjacentes aos tubos de polietileno implantados foram removidos e, imediatamente, colocados na solução de formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído) tamponado com fosfato de sódio 0,1 M com pH 7,2, durante 48 horas. Após fixação, as peças foram desidratadas, diafanizadas, embebidas em parafina líquida (60°C) e incluídas em parafina. Com um micrótomo rotativo (Leica, modelo RM2125 RST, Heidelberg, Alemanha) e navalhas descartáveis de aço inoxidável (Leica, modelo 818, Heidelberg, Alemanha), foram obtidos cortes com 6 µm de espessura. Alguns cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a análise morfológica e estimativa do número de células inflamatórias nas cápsulas. Em

lâminas previamente tratadas com silano a 4% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), cortes foram aderidos para realização da reação imunohistoquímica para detecção de interleucina-6 (IL-6).

Densidade numérica de células inflamatórias

As imagens foram capturadas usando a câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão).

O número de células inflamatórias foi estimado usando o programa Image-Pro Express 6.0 Olympus, como previamente descrito (Viola *et al.* 2012). A análise quantitativa foi realizada nas cápsulas de todos os implantes sendo que em cada implante foram usados 3 cortes, com intervalo mínimo entre os cortes de 100 μm . Em cada corte corado com HE, uma área padrão de 0,09 mm^2 da cápsula adjacente à abertura dos tubos implantados foi capturada com a objetiva de 40x (Fig. 1A-1B). Considerando que a estimativa de células inflamatórias foi obtida a partir de 3 cortes/implante, portanto, em cada implante o número de células inflamatórias foi estimado numa área total de 0,27 mm^2 . Em cada área, o número de células inflamatórias foi calculado, sendo obtido o número de células inflamatórias/ mm^2 por espécime.

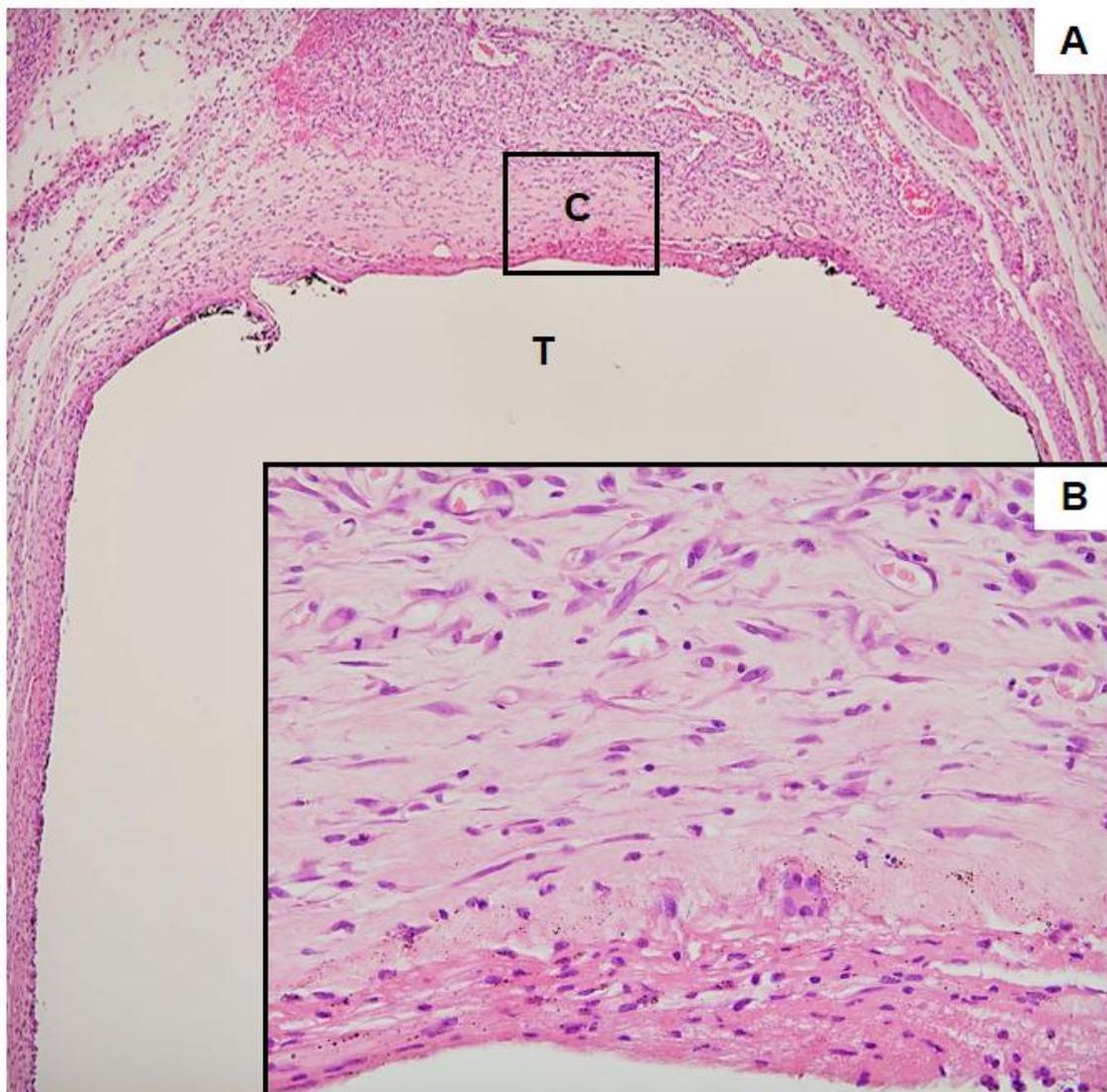


Figura 1 – Fotomicrografias mostram uma porção do corte exibindo os tecidos adjacentes ao tubo de polietileno implantando no subcutâneo. A letra T indica o espaço ocupado pelo tubo de polietileno que foi removido para obtenção do corte histológico. **(A)** Aspecto geral da cápsula (C) adjacente à abertura do tubo (T) implantado. HE. 65x. **(B)** detalhe da área demarcada na figura A, mostrando a área padronizada na cápsula que foi capturada para estimar o número de células inflamatórias. 390x.

Reação imuno-histoquímica para detecção de IL-6

Para a detecção de IL-6, o anticorpo primário anti-IL-6 produzido em cabra (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Califórnia, EUA) foi utilizado. Após desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001 M com pH 6,0 e submetidos ao tratamento com micro-ondas por 20 minutos a 90-94°C para recuperação antigênica. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas em tampão Tris-HCl 0,05 M com pH 7,4 e, em seguida, imersas em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 5%, sendo duas trocas da solução por 10 minutos cada, para o bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados novamente e, então, incubados com albumina do soro bovino a 2% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA), por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* em câmara úmida a 4°C com anticorpo primário anti-IL-6 produzido em cabra, na diluição 1:100.

Subsequentemente às lavagens em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados em anticorpo secundário de coelho/camundongo/cabra anti-IgG biotilado (LSAB, Dako Inc., Carpinteria, Califórnia, EUA), por 40 minutos. Após lavagem em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados com o complexo HRP (System-HRP, Dako Inc., Carpinteria, Califórnia, EUA), por 40 minutos. Subsequentemente às lavagens em tampão, a atividade da peroxidase foi revelada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Dako Inc., Carpinteria, Califórnia, EUA) durante 4 minutos. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Carazzi, desidratados, diafanizados e montados para análise ao microscópio de luz. Como controle negativo, alguns cortes foram submetidos a todas as etapas exceto a incubação com anticorpo primário, onde foram incubados com soro não imune.

Densidade numérica de células positivas à IL-6

Com o objetivo de verificar se houve diferenças entre os grupos e períodos, o número de células imunopositivas para IL-6 foi estimado nas cápsulas dos 5 implantes de cada grupo/período. Com auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão), uma área padrão de 0,09 mm² da cápsula adjacente à abertura do tudo implantado foi capturada, em aumento de 40x. O

número de células imunopositivas foi computado com auxílio de um programa de análise de imagens (Image Pro-Express 6.0, Olympus, Tóquio, Japão). Assim, o número de células imunopositivas/mm² de cápsula foi obtido para cada implante; posteriormente, calculou-se a média para cada grupo em cada período

Análise Estatística

Os dados quantitativos foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, Califórnia, EUA). Após confirmação da normalidade, foram empregados os testes de ANOVA e Tukey com nível de significância de 5%.

Resultados

Análise morfológica e densidade numérica de células inflamatórias

A análise morfológica foi realizada na cápsula adjacente à abertura dos tubos implantados, ou seja, em estreita justaposição aos materiais.

No período de 7 dias, as cápsulas de todos os grupos exibiram diversas células inflamatórias, principalmente linfócitos e macrófagos, entre vasos sanguíneos (Figs. 2A-2C). Aos 15 dias, fibroblastos entre fibras colágenas foram observados em algumas porções das cápsulas, principalmente nos grupos GSTC e GC. No entanto, células inflamatórias e vasos sanguíneos eram ainda claramente observados nas cápsulas (Figs. 2D-2F). Ocasionalmente, algumas células gigantes multinucleadas foram também observadas, principalmente na porção mais interna da cápsula, adjacente aos materiais (Fig. 2D). Nos períodos de 30 e 60 dias, o tecido conjuntivo das cápsulas continha diversos fibroblastos entre feixes de fibras colágenas; as escassas células inflamatórias estavam representadas por plasmócitos, macrófagos e mastócitos, localizadas próximas a abertura do tubo (Figs. 3A-3F).

A análise quantitativa revelou que, em todos os grupos, o número de células inflamatórias foi significativamente maior no período de 7 dias ($p < 0,05$). A análise estatística de cada grupo ao longo do tempo revelou uma redução gradativa e significativa no número de células inflamatórias nas cápsulas de todos os grupos ($p < 0,05$). Aos 7 e 15 dias, diferenças estatisticamente significantes não foram verificadas entre os grupos GSTC e GMTAP ($p > 0,05$) enquanto que, nos períodos de 30 e 60 dias, diferenças significantes não foram observadas entre todos os grupos ($p > 0,05$) (Tabela 2).

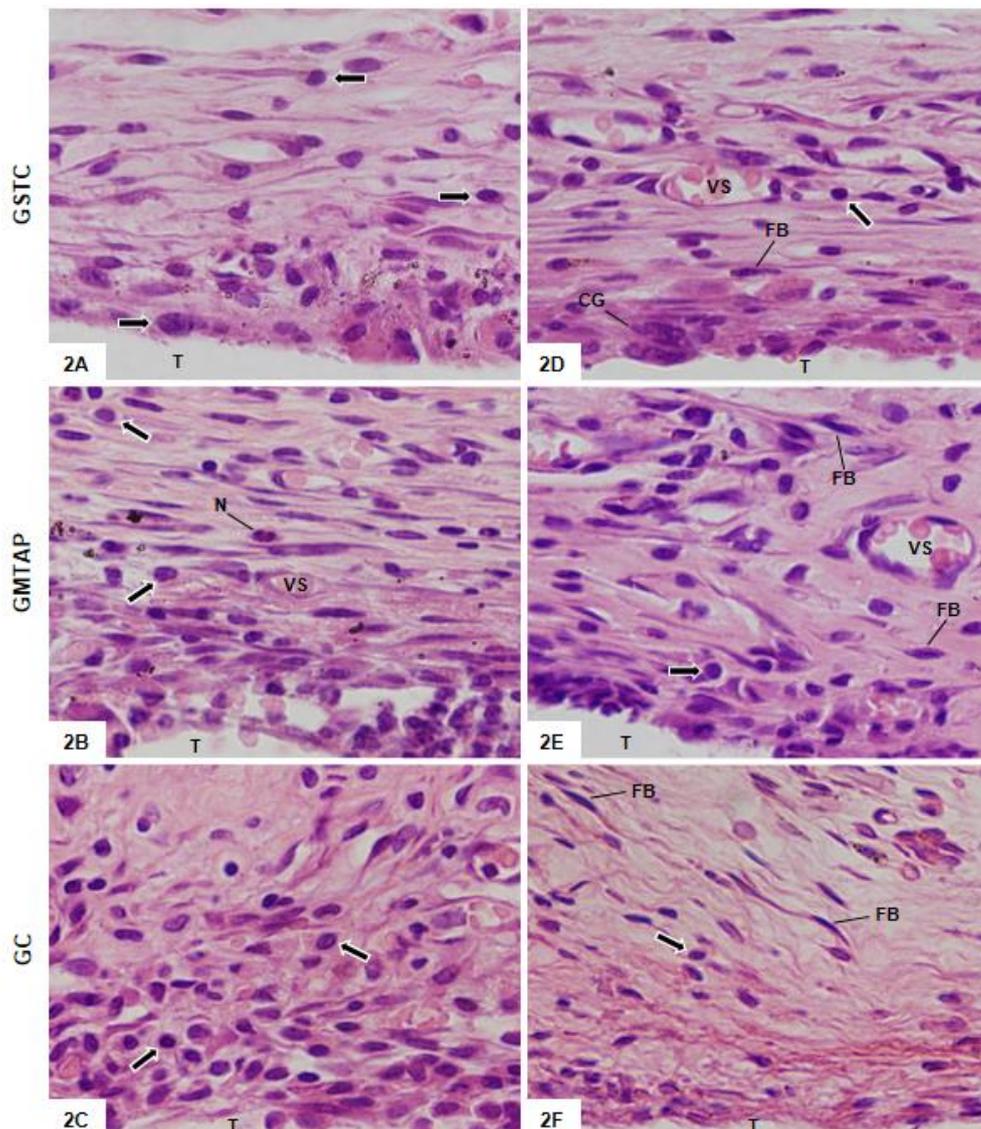


Figura 2 – Fotomicrografias mostrando porções de cortes das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 7 (**2A**, **2B** e **2C**) e 15 (**2D**, **2E** e **2F**) dias. Nas figuras **2A**, **2B** e **2C**, diversas células inflamatórias (setas) são observadas, principalmente, na porção mais interna da cápsula em íntimo contato com a abertura do tubo (T). N, neutrófilo; VS, vasos sanguíneos. HE. 695x. Nas figuras **2D**, **2E** e **2F**, as cápsulas exibem células inflamatórias (setas) entre vasos sanguíneos (VS) e fibroblastos (FB). CG, célula gigante. HE. 695x.

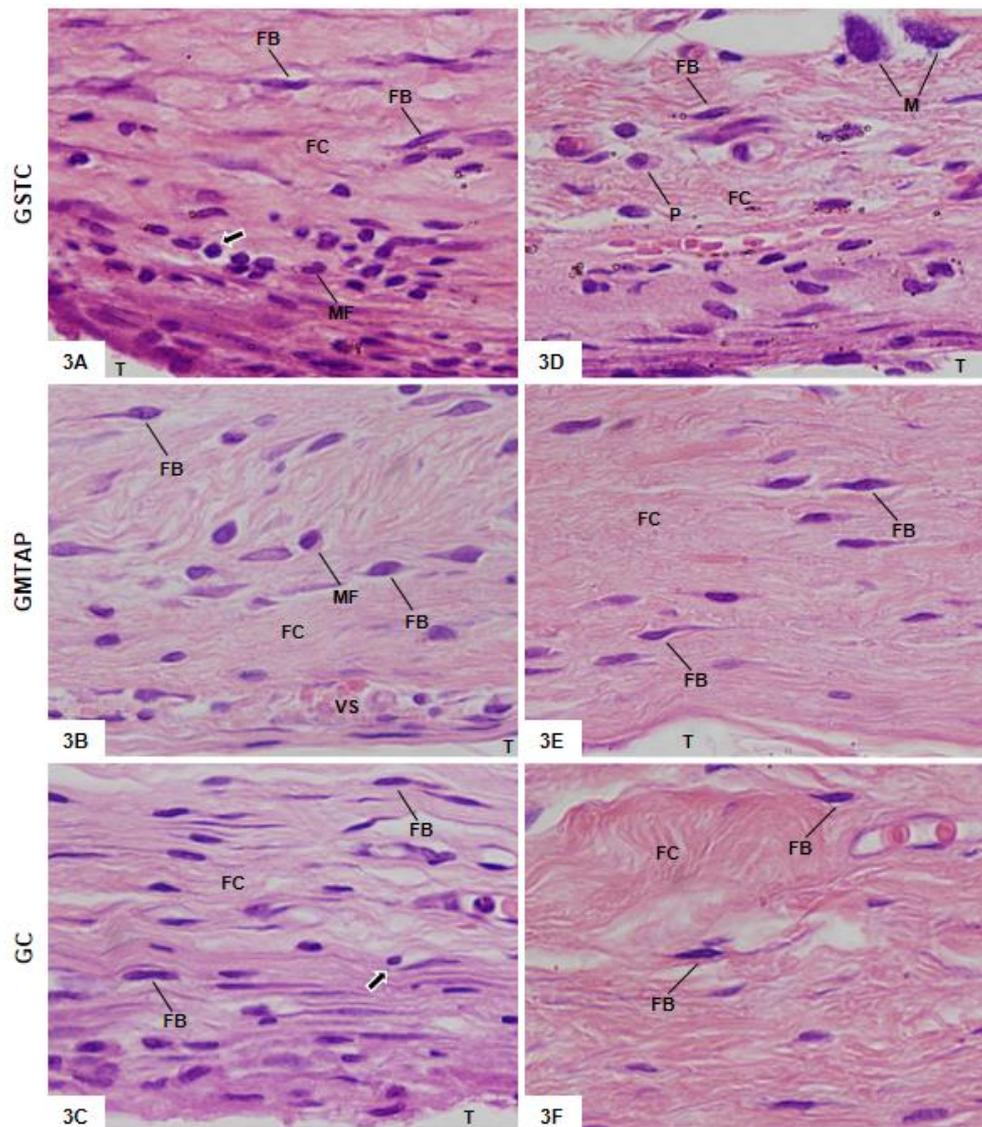


Figura 3 – Fotomicrografias mostrando porções de cortes das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 30 (**3A**, **3B** e **3C**) e 60 (**3D**, **3E** e **3F**) dias. Nas Figuras **3A**, **3B** e **3C**, diversos fibroblastos (FB) estão dispostos entre os feixes de fibras colágenas (FC). Note que poucas células inflamatórias (setas) são observadas, principalmente nas cápsulas dos grupos GMTAP e GC. MF, macrófago; VS, vasos sanguíneos. HE. 695x. Nas figuras **3D**, **3E** e **3F**, fibroblastos (FB) entre feixes de fibras colágenas espessos (FC) estão presentes nas cápsulas, em todos os grupos. As células inflamatórias (setas) estão representadas por escassos plasmócitos (P) e mastócitos (M) ocasionalmente observados entre os fibroblastos e fibras colágenas. HE. 695x.

Tabela 2 – Densidade numérica de células inflamatórias nas cápsulas dos grupos GSTC, GMTAP e GC aos 7, 15, 30 e 60 dias.

| Períodos | GSTC | GMTAP | GC |
|-----------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 7 dias | 482,52 ± 45,90 ^{b; 1} | 448,89 ± 34,88 ^{b; 1} | 324,07 ± 29,97 ^{a; 1} |
| 15 dias | 185,19 ± 28,21 ^{a, b; 2} | 214,81 ± 43,67 ^{b; 2} | 154,07 ± 8,11 ^{a; 2} |
| 30 dias | 160,00 ± 30,36 ^{a; 2} | 135,56 ± 29,00 ^{a; 3} | 148,89 ± 8,03 ^{a; 2} |
| 60 dias | 71,11 ± 9,57 ^{a, 3} | 70,37 ± 16,14 ^{a, 4} | 69,04 ± 6,59 ^{a, 3} |

Valores numéricos representam média ± desvio padrão.

A comparação entre os grupos no mesmo período é indicado por letras sobrescritas nas linhas; letras iguais = sem diferença estatística significativa.

A comparação entre os períodos é indicada por números sobrescritos nas colunas; números iguais = sem diferença estatística significativa. Testes de ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

Detecção imuno-histoquímica para IL-6 e densidade numérica de células imunopositivas

Os cortes das cápsulas dos grupos GSTC, GMTAP e GC submetidos à reação imuno-histoquímica para IL-6 mostraram células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos, macrófagos e mastócitos) e alguns fibroblastos exibindo citoplasma em castanho, ou seja, positivos à imunorreação. A análise morfológica revelou células imunomarcadas nas cápsulas de todos os grupos; no entanto, uma acentuada imunopositividade foi observado nas cápsulas dos grupos aos 7 dias em comparação aos demais períodos (Figs. 4A-4F e 5A-5F). Em contrapartida, cortes de cápsulas incubados sem o anticorpo primário (controle negativo), não exibiram células imunopositivas (dados não ilustrados).

De acordo com a tabela 3, o número de células positivas à IL-6 foi significativamente maior aos 7 dias em comparação aos 15, 30 e 60 dias. Em todos os grupos, o número de células imunomarcadas nas cápsulas reduziu significativamente no decorrer dos períodos. No entanto, diferenças estatisticamente significantes não foram detectadas entre os grupos GSTC, GMTAP e GC, em cada período.

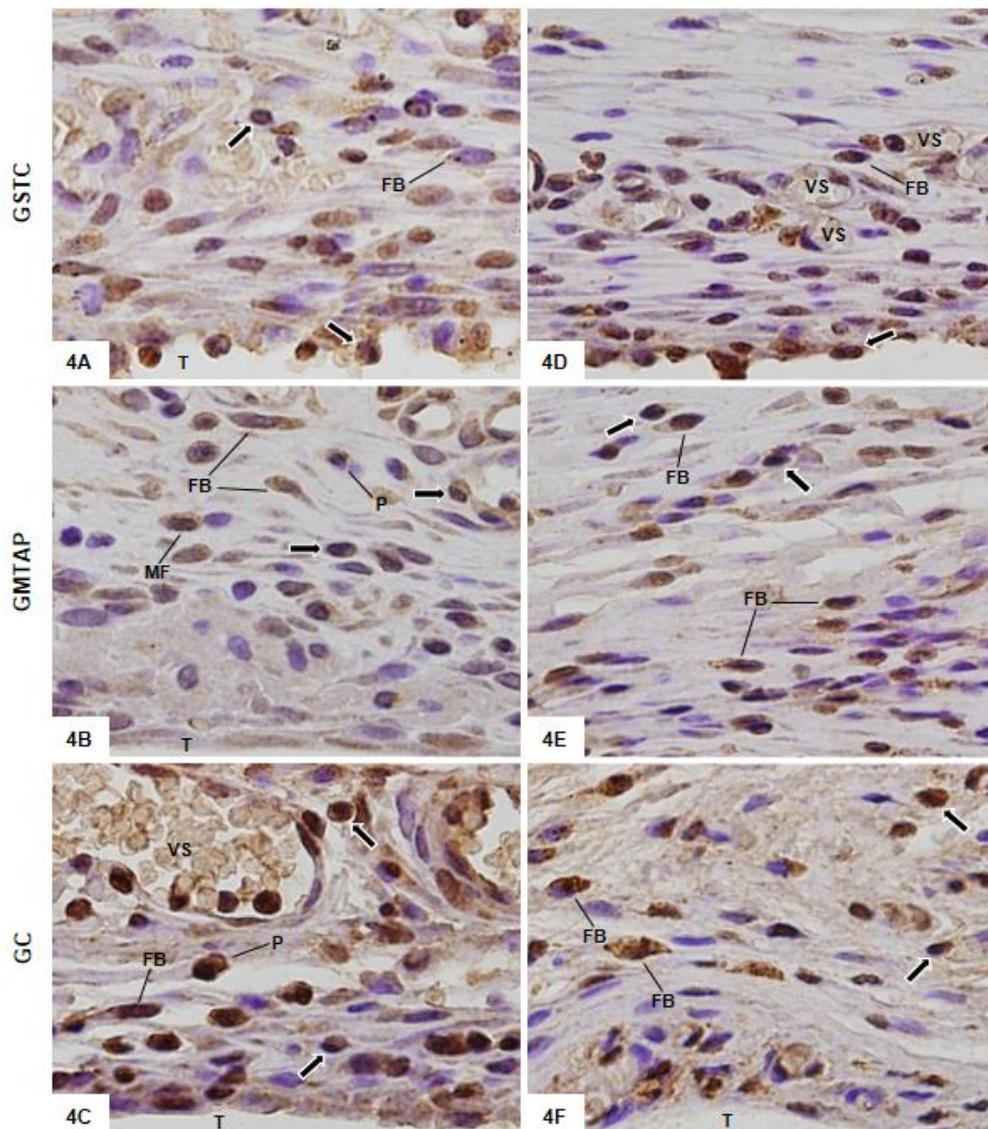


Figura 4 – Fotomicrografias mostrando porções de cortes das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 7 (**4A**, **4B** e **4C**) e 15 (**4D**, **4E** e **4F**) dias. Os cortes foram submetidos à imuno-histoquímica para IL-6 (em castanho) e contracorados com hematoxilina. Nas figuras **4A**, **4B** e **4C**, diversas células inflamatórias (setas), representadas por plasmócitos (P) e macrófagos (MF), e alguns fibroblastos (FB) mostram imunopositividade citoplasmática. VS, vasos sanguíneos. 695x. Nas figuras **4D**, **4E** e **4F**, as cápsulas exibem células inflamatórias (setas) e fibroblastos (FB) imunopositivos à reação imuno-histoquímica para IL-6. VS, vasos sanguíneos. 695x.

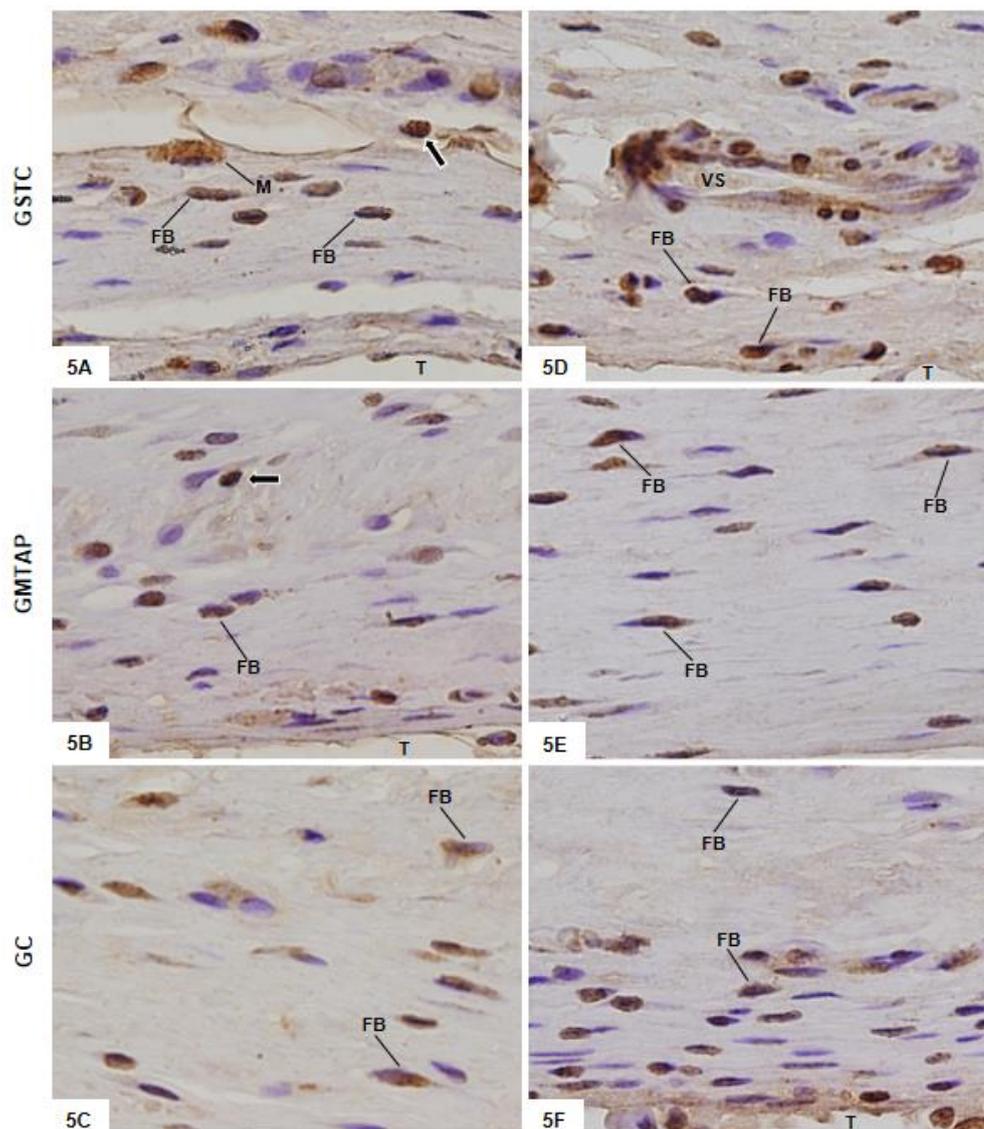


Figura 5 – Fotomicrografias mostrando porções de cortes das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 30 (**5A**, **5B** e **5C**) e 60 (**5D**, **5E** e **5F**) dias. Os cortes foram submetidos à imuno-histoquímica para IL-6 (em castanho) e contracolorados com hematoxilina. Nas Figuras **5A**, **5B**, **5C**, **5D**, **5E** e **5F**, diversos fibroblastos (FB) com citoplasma imunomarcados à reação imuno-histoquímica para IL-6 estão presentes nas cápsulas entre os feixes de fibra colágenas, em todos os grupos. Note que poucas células inflamatórias (setas) são observadas nas cápsulas. M, mastócito; VS, vasos sanguíneos. 695x.

Tabela 3 – Densidade numérica de células positivas à IL-6 nas cápsulas dos grupos GSTC, GMTAP e GC aos 7, 15, 30 e 60 dias.

| Períodos | GSTC | GMTAP | GC |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 7 dias | 475,55 ± 16,48 ^{a; 1} | 480 ± 14,49 ^{a;1} | 464,44 ± 19,88 ^{a;1} |
| 15 dias | 186,67 ± 18,26 ^{a; 2} | 195,55 ± 12,67 ^{a; 2} | 182,22 ± 12,67 ^{a; 2} |
| 30 dias | 148,89 ± 18,59 ^{a; 3} | 151,11 ± 14,91 ^{a; 3} | 144,44 ± 17,57 ^{a; 3} |
| 60 dias | 75,90 ± 8,91 ^{a; 4} | 75,55 ± 9,30 ^{a; 4} | 71,11 ± 9,94 ^{a; 4} |

Valores numéricos representam média ± desvio padrão.

A comparação entre os grupos no mesmo período é indicado por letras sobrescritas nas linhas; letras iguais = sem diferença estatística significativa.

A comparação entre os períodos é indicada por números sobrescritos nas colunas; números iguais = sem diferença estatística significativa. Testes de ANOVA e Tukey ($p \leq 0.05$).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que o cimento experimental à base de silicato tricálcico (STC) e o MTA Plus (MTAP) induziram, inicialmente, uma reação inflamatória moderada no subcutâneo. No entanto, esta reação foi gradativamente reduzida, culminando na formação de cápsulas de tecido conjuntivo denso. Além disso, a diminuição do processo inflamatório ocorreu concomitante à redução significativa na imunexpressão de IL-6, uma citocina pró-inflamatória, nas cápsulas adjacentes aos materiais, indicando que o cimento experimental STC e o MTAP são materiais biocompatíveis.

É possível que a reação inflamatória provocada inicialmente pelo STC e MTAP esteja relacionado as hidroxilas (OH^-) liberadas após a hidratação dos materiais, proporcionando ao meio um pH alcalino (Formosa *et al.* 2012a, Formosa *et al.* 2013b, Grech *et al.* 2013a). O pH alcalino estimula o recrutamento de leucócitos dos vasos sanguíneos (Shahi *et al.* 2006, Vosoughhosseini *et al.* 2008, Shahi *et al.* 2010, Silva *et al.* 2014, Silva *et al.* 2015, da Fonseca *et al.* 2016) e, portanto, deve explicar os valores mais elevados de células inflamatórias verificados no período inicial.

A alcalinidade proporcionada pelos materiais à base de silicato tricálcico é resultado do hidróxido de cálcio que se forma durante a reação de hidratação destes materiais (Camilleri 2011a, Formosa *et al.* 2012a, Camilleri *et al.* 2013a, Camilleri *et al.* 2013b, Grech *et al.* 2013a, Camilleri 2015). Os íons cálcio liberados podem reagir com fosfato presente no fluido tecidual resultando na deposição de fosfato de cálcio na superfície do material (Camilleri 2011a, Formosa *et al.* 2012a, Camilleri *et al.* 2013b, Grech *et al.* 2013b). Esta hipótese é a base físico-química da bioatividade dos materiais à base de silicato tricálcico (Camilleri, 2011a, Grech *et al.* 2013b).

De fato, a reação tecidual observada é consequência da resposta do hospedeiro as substâncias liberadas pelos materiais. Assim, as células do hospedeiro (inflamatórias e residentes) produzem e liberam diversas citocinas e fatores de crescimento que exercem um papel específico na complexa cascata de eventos celulares envolvidos na resposta tecidual. Dentre as diversas

citocinas, a IL-6 é considerada um potente mediador do processo inflamatório (Azuma *et al.* 2014).

A IL-6 está envolvida em diferentes processos biológicos, incluindo hematopoese, resposta imune e inflamação (Gadient & Otten, 1997). Esta interleucina é produzida por macrófagos, células dendríticas, mastócitos, linfócitos B e T. Além dessas células, essa citocina é sintetizada por células não leucocitárias, como fibroblastos, células endoteliais e epiteliais (Rincon *et al.* 2012). A IL-6 estimula a diferenciação de linfócito B em plasmócito, ativa linfócitos T, aumenta hematopoese e, subsequente, leucocitose, regula a resposta imune e a fase aguda da inflamação (Barkhordar *et al.* 1999).

A IL-6 participa de diversos eventos biológicos e atua como um importante mediador da resposta do hospedeiro em função da injúria e infecção teciduais, bem como da reação inflamatória (EISalhy *et al.* 2013). Há evidências de que a IL-6 pode constituir uma das moléculas envolvidas no processo inflamatório induzido por cimentos à base de silicato de tricálcico (MTA Angelus e Biodentine) em subcutâneo de ratos. Além disso, a correlação significativa entre células imunomarcadas para IL-6 e inflamatórias indica que esta interleucina deve ser importante na manutenção do processo inflamatório (da Fonseca *et al.* 2016), reforçando o conceito de que essa citocina é um potente mediador do processo inflamatório (Azuma *et al.* 2014). Uma associação foi observada entre a diminuição da imunoexpressão para IL-6 e redução do processo inflamatório nas cápsulas adjacentes ao cimentos à base de silicato de cálcio implantados nos tecidos subcutâneos de rato (Silva *et al.* 2014, Silva *et al.* 2015, da Fonseca *et al.* 2016), indicando que esses materiais não exercem efeito irritante no tecido conjuntivo durante um período prolongado (Silva *et al.* 2015).

A reação inflamatória moderada induzida pelos materiais foi substituída por uma cápsula caracterizada por um tecido conjuntivo contendo fibroblastos entre feixes organizados de fibras colágenas ao longo do tempo. Nos períodos de 30 e 60 dias, não foram observadas diferenças significantes entre os materiais e controle, reforçando o conceito de que os materiais avaliados são biocompatíveis.

Células imunomarcadas para IL-6 nas cápsulas foram observadas em todos os períodos. No entanto, aos 7 dias, houve acentuada imunopositividade nas cápsulas em comparação aos demais períodos. Em todos os grupos, o número de células imunomarcadas nas cápsulas reduziu significativamente no decorrer dos períodos. Porém, diferenças significantes não foram detectadas entre os materiais e controle, em cada período.

Dessa maneira, a redução gradual e significativa no número de células imunomarcadas para IL-6, sugere que as cápsulas adjacentes aos materiais implantados sofreram um processo de remodelação intensa ao longo do tempo. Além disso, os nossos resultados apontam que essa citocina pode estar envolvida na resposta promovida pelos materiais à base de silicato tricálcico, pois uma redução tanto de células imunomarcadas para IL-6 quanto da reação inflamatória foi observada. Considerando que diferenças significantes na imunoexpressão de IL-6 não foram observadas entre os grupos GSTC e GMTAP com o GC, é possível sugerir que o potencial irritante dos materiais aos tecidos é baixo, possibilitando aos tecidos do hospedeiro uma regeneração e/ou reparação em curto tempo. Esta hipótese é sustentada desde que o processo inflamatório envolveu e foi substituído por uma cápsula contendo feixes organizados de fibras de colágenas entre fibroblastos presente a partir do período de 30 dias após os implantes no subcutâneo.

Os tubos preenchidos com os materiais promoveram um maior recrutamento de células inflamatórias do que os tubos vazios, sugerindo, portanto, que estes materiais podem liberar algumas substâncias que estimulam a migração e a diferenciação destas células tais como macrófagos e plasmócitos, frequentemente observados nas cápsulas.

O ZrO_2 adicionado à cimento de silicato de cálcio promove propriedades físico-químicas adequadas e melhor resposta biológica em comparação com o Bi_2O_3 (Silva *et al.* 2014). Embora contendo em sua composição o radiopacificador Bi_2O_3 , o MTAP promoveu resposta tecidual semelhante a do STC no presente estudo. A hipótese para esses resultados pode estar relacionada ao fato do MTAP não apresentar em sua composição o cimento Portland, principal componente do MTA, mas sim o silicato tricálcico (aproximadamente 50%), silicato dicálcico, sulfato de cálcio e dióxido de silício, além do Bi_2O_3 (aproximadamente 30%). A substituição do cimento Portland

pelo silicato tricálcico e silicato dicálcico permite um melhor controle sobre a inclusão de metais pesados que podem ser encontrados no MTA (Formosa *et al.* 2012b), além de possivelmente favorecer a reação de hidratação (Grech *et al.* 2013a).

CONCLUSÃO

Conclui-se que o cimento experimental silicato tricálcico com 20% de ZrO_2 e MTA Plus implantados no tecido subcutâneo de ratos induziram a formação de uma cápsula de tecido conjuntivo denso, indicando a biocompatibilidade desses materiais.

REFERÊNCIAS

- Antonijevic D, Medigovic I, Zrilic M, Jokic B, Vukovic Z, Todorovic L (2014) The influence of different radiopacifying agents on the radiopacity, compressive strength, setting time, and porosity of Portland cement. *Clinical Oral Investigations* **18**, 1597-604.
- Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LT (2014) The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *International Endodontic Journal* **47**, 615-21.
- Barkhordar RA, Hayashi C, Hussain MZ (1999) Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endodontics & Dental Traumatology* **15**, 26-7.
- Bortoluzzi EA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Duarte MA (2009). Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **108**, 628-32.
- Camilleri J (2011a) Characterization and hydration kinetics of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Dental Materials* **27**, 836-44.
- Camilleri J, Cuttajar A, Mallia B (2011b) Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dental Materials* **27**, 845-54.
- Camilleri J, Formosa L, Damidot (2013a) The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *International Endodontic Journal* **46**, 831-40.
- Camilleri J, Grech L, Galea K, Keir D, Fenech M, Formosa L, Damidot D, Mallia B (2014a) Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. *Clinical Oral Investigations* **18**, 1437-46.
- Camilleri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E (2012) Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *International Endodontic Journal* **45**, 737-43.
- Camilleri J, Laurent P, About I (2014b) Hydration of Biodentine, Theracal LC, and a prototype tricalcium silicate-based dentin replacement material after pulp capping in entire tooth cultures. *Journal of Endodontics* **40**, 1846-54.
- Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D (2013b) Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dental Materials* **29**, 580-93.
- Camilleri, J (2015) Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine Used for Pulpotomy Procedures. *Journal of Endodontics* **41**, 1139-45.
- Cuttajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J (2011) Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dental Materials* **27**, 879-91.

da Fonseca TS, da Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS (2016) In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *International Endodontic Journal* **49**, 145-53.

Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R (2013) Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *International Endodontic Journal* **46**, 573-80.

Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R (2013) Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *International Endodontic Journal* **46**, 573-80.

Formosa LM, Mallia B, Bull T, Camilleri J (2012a) The microstructure and surface morphology of radiopaque tricalcium silicate cement exposed to different curing conditions. *Dental Materials* **28**, 584-95.

Formosa LM, Mallia B, Camilleri J (2012b) The effect of curing conditions on the physical properties of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *International Endodontic Journal* **45**, 326-36.

Formosa LM, Mallia B, Camilleri J (2013) Mineral trioxide aggregate with anti-washout gel - properties and microstructure. *Dental Materials* **29**, 294-306.

Gadient RA, Otten UH (1997) Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Progress in Neurobiology* **52**, 379-90.

Grech L, Mallia B, Camilleri J (2013a) Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *International Endodontic Journal* **46**, 632-41.

Grech L, Mallia B, Camilleri J (2013b) Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dental Materials* **29**, 20-8.

Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivian RR, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru Filho M *et al.* (2009). Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod* **35**, 737-40.

Kramer PR, Woodmansey KF, White R, Primus CM, Opperman LA (2014) Capping a pulpotomy with calcium aluminosilicate cement: comparison to mineral trioxide aggregates. *Journal of Endodontics* **40**, 1429-34.

Rincon M (2012) Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunology* **33**, 571-7.

Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari H, Gaderian A (2006) A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. *Journal of Endodontics* **32**, 776-80.

Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Mokhtari H, Roshangar L, Abasi MM *et al.* (2010) Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. *Journal of Endodontics* **36**, 899-903.

Silva GF, Bosso R, Ferino RV, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM *et al.* (2014) Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and

biological properties. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A* **102**, 4336-45.

Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS (2015) Niobium pentoxide as radiopacifying agent calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clinical Oral Investigations* **19**, 2012-25.

Tanomaru-Filho M, Morales V, da Silva GF, Bosso R, Reis JMSN, Húngaro-Duarte MA *et al.* (2012) Compressive Strength and Setting Time of MTA and Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents. *ISRN Dentistry* **2012**, 1-4.

Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri OS (2012) Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **100**, 1773-81.

Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Saghiri MA *et al.* (2008) Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. *Journal of Endodontics* **34**, 715-7.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O cimento silicato tricálcico com 20% de ZrO_2 apresenta potencial físico-químico e biológico para ser usado com material reparador. A sua produção é mais segura e com melhor controle sobre as impurezas e metais pesados. Ainda, o radiopacificador ZrO_2 incorporado ao cimento experimental é considerado adequado, pois não interfere na biocompatibilidade, como também, não reage com os subprodutos da hidratação de cimentos à base de silicato tricálcico.

Nos testes realizados em células humanas de osteoblastos (Saos-2), o cimento silicato tricálcico com 20% de ZrO_2 e o MTA Plus não mostraram efeito citotóxico. Além disso, as células expostas aos extratos desses materiais exibiram atividade de ALP sendo maior em 1 e 7 dias e áreas mineralizadas, indicando que o cimento silicato tricálcico com 20% de ZrO_2 e o MTA Plus demonstram potencial bioativo.

Embora nossos resultados demonstrem que os cimentos à base de silicato tricálcico provocam, inicialmente, uma reação inflamatória moderada no subcutâneo, esta reação foi gradativamente reduzida, culminando na formação de cápsulas de tecido conjuntivo denso. Além disso, a diminuição do processo inflamatório foi concomitante à redução significativa na imunexpressão de IL-6, uma citocina pró-inflamatória, nas cápsulas adjacentes aos materiais, indicando que o cimento silicato tricálcico com 20% de ZrO_2 e o MTA Plus são materiais biocompatíveis.

A redução gradativa e significativa do processo inflamatório promovido pelo cimento silicato tricálcico com 20% de ZrO_2 e MTA Plus indica que as cápsulas adjacentes aos materiais implantados estão passando por um processo de remodelação intensa ao longo do tempo. Ainda, os nossos resultados apontam que a IL-6, citocina pró-inflamatória, pode estar envolvida na resposta induzida pelos materiais à base de silicato tricálcico, em decorrência da redução tanto de células imunomarcadas para IL-6 quanto da reação inflamatória. Além disso, é possível sugerir que o potencial irritante

desses materiais aos tecidos é baixo, possibilitando aos tecidos do hospedeiro uma regeneração e/ou reparação em curto tempo.

Portanto, os resultados encontrados no presente estudo mostraram que o cimento experimental silicato tricálcico com 20% de ZrO_2 e MTA Plus são biocompatíveis, pois foram citocompatíveis em cultura de células humanas de osteoblastos (Saos-2) e induziram a formação de cápsula de tecido conjuntivo denso em subcutâneo de ratos. Confirmando, de fato, materiais à base de silicato tricálcico são viáveis e representam excelente perspectiva para o desenvolvimento de biomateriais de uso odontológico.

REFERÊNCIAS*

1. Antonijevic D, Medigovic I, Zrilic M, Jokic B, Vukovic Z, Todorovic L. The influence of different radiopacifying agents on the radiopacity, compressive strength, setting time, and porosity of Portland cement. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(6):1597-604.
2. Baek SH, Lee WC, Setzer FC, Kim S. Periapical bone regeneration after endodontic microsurgery with three different root-end filling materials: amalgam, SuperEBA, and mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2010; 36(8): 1323-5.
3. 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.
4. Camilleri J, Formosa L, Damidot. The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J*. 2013; 46(9): 831-40.
5. Camilleri J, Grech L, Galea K, Keir D, Fenech M, Formosa L et al. Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(5): 1437-46.
6. Camilleri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements *Int Endod J*. 2012; 45(8):737-43.
7. Camilleri J, Laurent P, About I. Hydration of Biodentine, Theracal LC, and a prototype tricalcium silicate-based dentin replacement material after pulp capping in entire tooth cultures. *J Endod*. 2014; 40(11): 1846-54.
8. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater*. 2013; 29(5): 580-93.
9. Camilleri J. Characterization and hydration kinetics of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Dent Mater*. 2011; 27(8): 836-44.
10. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2007; 40(6): 462-70.

*De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. <http://www.foar.unesp.br/#!/biblioteca/manual>

11. Camilleri J. Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine Used for Pulpotomy Procedures. *J Endod.* 2015; 41(7): 1139-45.
12. 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.
13. Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and experimental calcium silicate-based cements in human osteoblast-like cells. *Int Endod J.* 2015 Nov 26 [Epub ahead of print].
14. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mater.* 2011; 27(9): 879-91.
15. da Fonseca TS, da Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J.* 2016; 49(2):145-53.
16. da 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.
17. Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J.* 2013; 46(6): 573-80.
18. Felipe WT, Felipe MC, Rocha MJ. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod J.* 2006; 39(1): 2-9.
19. Formosa LM, Mallia B, Bull T, Camilleri J. The microstructure and surface morphology of radiopaque tricalcium silicate cement exposed to different curing conditions. *Dent Mater.* 2012; 28(5): 584-95.
20. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. Mineral trioxide aggregate with anti-washout gel - properties and microstructure. *Dent Mater.* 2013; 29(3): 294-306.
21. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. The effect of curing conditions on the physical properties of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Int. Endod J.* 2012; 45(4): 326-36.
22. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J.* 2013; 46(7): 632-41.
23. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater.* 2013; 29(2): 20-8.

24. Kramer PR, Woodmansey KF, White R, Primus CM, Opperman LA. Capping a pulpotomy with calcium aluminosilicate cement: comparison to mineral trioxide aggregates. *J Endod.* 2014; 40(9): 1429-34.
25. Li Z, Cao L, Fan M, Xu Q. Direct pulp capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: a meta-analysis. *J Endod.* 2015; 41(9): 1412-7.
26. Mestieri LB, Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Biocompatibility and bioactivity of calcium silicatebased endodontic sealers in human dental pulp cells. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(5): 467-71.
27. Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornélio AL, Salles LP, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM. Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement associated with niobium oxide micro and nanoparticles. *J Appl Oral Sci.* 2014; 22(6): 554-9.
28. Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2001; 27(2): 76-81.
29. Rincon M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends Immunol.* 2012; 33(11): 571-7.
30. Salles LP, Gomes-Cornélio AL, Guimarães FC, Herrera BS, Bao SN, Rossa-Junior C, et al. Mineral trioxide aggregate–based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod.* 2012; 38(7): 971-6.
31. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod.* 2010; 36(7): 1210-5.
32. Silva GF, Bosso R, Ferino RV, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res A.* 2014; 102(12): 4336-45.
33. Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agent calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Invest.* 2015; 19(8): 2012-25.
34. Tanomaru-Filho M, Morales V, da Silva GF, Bosso R, Reis JMSN, Húngaro-Duarte MA, et al. Compressive strength and setting time of MTA and portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dent.* 2012; 2012: 1-4.

35. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 2010; 36(2):190-202.
36. 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.
37. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008; 29(20): 2941-53.

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 33/2014

Araraquara, 23 de setembro de 2014.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, em reunião hoje realizada, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado **"BIOCOMPATIBILIDADE E POTENCIAL DE MINERALIZAÇÃO DE CIMENTOS À BASE DE SILICATO TRICÁLCICO: ESTUDO IN VITRO E IN VIVO"** (Proc. CEUA nº 33/2014) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para **AGOSTO/2016**.

Atenciosamente.

Prof. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari
Vice-coordenadora da CEUA

Ao
Prof. Dr. MÁRIO TANOMARU FILHO
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Odontologia Restauradora

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 31 de março de 2018.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 31 de março de 2016.

ALINE SILVA ANDRADE