

CAMILA CARNEIRO ALVES

**Análise da concentração de íons liberados por
cimentos obturadores em tecidos locais e órgãos**

Araçatuba

2020

CAMILA CARNEIRO ALVES

Análise da concentração de íons liberados por cimentos obturadores em tecidos locais e órgãos

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de graduada em odontologia.

Orientador: Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho

Araçatuba

2020

À Sandro Henrique, meu pai amoroso que sempre confiou no meu potencial, à Maria Cristina, minha mãe leoa a quem eu sempre pude abrir meu coração e recorrer nos momentos mais difíceis e à Luiz Henrique, meu irmão que se mostrou um grande amigo e que me encoraja a seguir meus sonhos e a falar o que penso.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho simboliza o final de uma jornada muito importante para mim em que pude dar início a concretização dos meus sonhos, a me identificar como ser pensante, crítico e profissional, e, principalmente, a me reconhecer como capaz. Para tanto, sou grata aos meu pais que, muitas vezes, sacrificaram seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu.

Sou grata a Deus e a Nossa Senhora por me abençoarem, me protegerem e iluminarem meu caminho rumos aos meus ideais.

Sou grata a oportunidade de estudar na universidade que tanto almejei, a Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, campus de Araçatuba, que me proporcionou momentos de muitas alegrias, grandes experiências e muito aprendizado. Agradeço, também, a todos os professores que me transmitiram tanto conhecimento, especialmente às Professoras Doutoras Cristiane Duque, Cristiane Furuse e Leda Maria Salzedas, que são profissionais muito inspiradoras, atenciosas a turma e dão um show em sala de aula.

Agradeço ao Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora, em especial a disciplina de endodontia, área pela qual me apaixonei, que proporcionou tantas atividades de grande importância no meu crescimento acadêmico e profissional. Portanto, sou grata aos professores, aos técnicos e aos secretários que sempre estavam dispostos a me ensinar e ajudar.

Em especial, agradeço aos Professores Doutores, aos quais tenho muito admiração e carinho, Eloi Dezan Junior, que tornou os dias de monitorias tão enriquecedoras e engraçadas e João Eduardo Gomes Filho, meu orientador de iniciação científica e de trabalho de conclusão de curso, que sempre esteve disposto a me guiar, a me ouvir e aconselhar, mas sempre me deixando livre para decidir por mim mesma.

Esse trabalho é resultado dos experimentos que realizei e

companhei durante meu período de iniciação científica e por isso sou grata ao nosso grupo de pesquisa, em especial ao Thiago Machado, que me inseriu na área de pesquisas, que sempre esteve a disposição de me ajudar, aconselhar e aliviar as dificuldades e ansiedades do meio acadêmico com muito humor.

Sou extremante grata a India Olinta de Azevedo Queiroz, que me deu a oportunidade de conhecer o ramo de pesquisas experimentais e, que de certa forma, me fez admirar ainda mais esse campo, pois me fez participativa em diversas etapas dos experimentos, me deu responsabilidades, estava motivada a me ensinar, me aconselhava, sempre foi compreensiva, respeitou meu tempo e que até para as broncas era sutil, e que tem grande importância no meu crescimento pessoal e científico. Além disso, tornou-se mais que uma orientadora, é uma inspiração e uma amiga para compartilhar risadas e bons momentos.

Agradeço aos meus amigos de infância que, apesar de tanto tempo e da distância que nos separam, sempre me apoiam e vibram com cada conquista, e aos amigos que fiz na faculdade com quem compartilhei bons momentos e que tornaram os dias difíceis mais descontraídos e leves e que pretendo cultivá-los por muitos anos.

Agradeço a minha tia Luziane Alves e aos meus avós por sempre me querem bem e me darem apoio.

Mais uma vez, gostaria de agradecer aos meus pais, Sandro e Cris, e ao meu irmão, Luiz, que sempre estiveram por de trás dos bastidores me apoiando, me encorajando, me reconfortando (muitas vezes até) quando nada mais parecia dar certo, me aconselhando e sempre torcendo por mim. Sempre que me sentir desanimada, sei que com vocês posso me fortalecer.

"Pesquisar é acordar para o mundo."

Marcelo Lamy

ALVES, CC. **Análise da concentração de íons liberados por cimentos obturadores em tecidos locais e órgãos.** 2020. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Araçatuba, 2020

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a concentração de íons tóxicos/metais pesados liberados pelos cimentos obturadores MTA Fillapex e BioRoot RCS em tecido subcutâneo e no cérebro, fígado e rins, bem como investigar seus possíveis efeitos sistêmicos. Setenta e dois ratos Wistar foram divididos em três grupos e receberam implantes de tubos de polietileno preenchidos com os cimentos no tecido subcutâneo, para o grupo controle foram usados tubos vazios. Os períodos de avaliação foram de 7, 15, 30 e 45 dias. Após cada período pós-operatório, os animais foram sacrificados e os tubos de polietileno juntamente com o tecido que o circunda, fígado, cérebro e rins foram removidos e processados para mensurar a concentração de cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), chumbo (Pb), ferro (Fe), magnésio (Mg), níquel (Ni) e cálcio (Ca) utilizando ICP-OES. Os testes Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para os dados não paramétricos e ANOVA seguido pelo teste de Tukey para dados paramétricos também foram realizados. As análises obtidas mostram que não foram encontrados traços de Co, Cr e Mg em nenhum dos tecidos avaliados. No tecido subcutâneo não foram observados vestígios de Cu e Pb, porém estes metais pesados foram observados nos órgãos. Em relação ao Fe, nenhuma diferença entre os cimentos e o controle foi observada em todos os tecidos e as maiores concentrações de Fe foram identificadas no fígado. Todos os cimentos exibiram concentração semelhante de Ni no rim e fígado. Além disso, ambos os cimentos conseguiram liberar Ca em todos os tempos e nenhuma diferença foi detectada no subcutâneo e rim. Por outro lado, aos 15 dias, um aumento considerável de íons Ca nos rins comparado ao tecido subcutâneo no MTA Fillapex, e aos 45 dias, no tecido subcutâneo em relação ao fígado com

BioRoot RCS. Dessa forma, com base nesses resultados, nós podemos concluir que nenhum dos cimentos foi capaz de promover danos à saúde sistêmica, uma vez que a quantidade mínima de ferro e níquel encontrados nos cimentos obturadores nos faz considerar a hipótese de que esses metais são provenientes das vias de absorção/ingestão/contato dos mesmos e não estão relacionadas aos cimentos. Por outro lado, em relação ao cálcio, para ambos os cimentos, aumento nas concentrações nos órgãos podem estar relacionadas com os materiais uma vez que dados prévios também demonstraram um aumento nos níveis séricos de cálcio, sugerindo assim um potencial efeito sistêmico.

Palavras-chave: Endodontia. Cimentos obturadores. Toxicidade. Liberação de íons. Metais pesados.

ALVES, CC. **Analysis of the concentration of ions released by sealers into tissues and organs.** 2020. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Araçatuba, 2020

ABSTRACT

The aim of this study was to trace toxic ions/heavy metal concentrations released by MTA Fillapex and BioRoot RCS sealers into subcutaneous tissue and the brain, liver and kidneys, as well as investigating their possible systemic effects. Seventy-two Wistar rats were divided into three groups and received implants of polyethylene tubes filled with cements in the dorsal subcutaneous tissue, empty tubes were used for the control group. After 7, 15, 30 and 45 days of subcutaneous implantation, the animals were euthanized and the polyethylene tubes together with the surrounding tissue, brain, liver and kidney were removed and processed to determine the concentrations of chromium (Cr), cobalt (Co), copper (Cu), lead (Pb), iron (Fe), magnesium (Mg), nickel (Ni) and calcium (Ca) using ICP-OES. The Kruskal-Wallis tests followed by the Dunn test for non-parametric data and ANOVA followed by the Tukey test for parametric data were also performed. The analyzes obtained shows that no traces of Co, Cr and Mg were found in any of the evaluated tissues. In the subcutaneous tissue, no traces of Cu and Pb were observed, but these heavy metals were observed in the organs. Regarding Fe, no difference between the cements and the control was observed in all tissues and the highest concentrations of Fe were identified in the liver. All sealers exhibited a similar concentration of Ni in the kidney and liver. In addition, both cements were able to release Ca at all times and no difference was detected in the subcutaneous and kidney. On the other hand, at 15 days, a considerable increase in Ca ions in the kidneys compared to the subcutaneous tissue in the MTA Fillapex, and at 45 days, in the subcutaneous tissue in relation to the liver with BioRoot RCS. Thus, based on these results, we can conclude that none of the cements was able to promote damage to systemic health, since the minimum amount of iron

and nickel found in filling cements makes us consider the hypothesis that these metals come from their absorption / ingestion / contact routes and are not related to cements. On the other hand, in relation to calcium, for both cements, increased concentrations in the organs may be related to the materials since previous data also showed an increase in serum calcium levels, thus suggesting a potential systemic effect.

Key words: Endodontic. Sealers. Toxicity. Ions release. Heavy metals

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição dos cimentos obturadores testados e seus fabricantes	14
Tabela 2 -	Média e desvio padrão dos níveis de Cobre (Cu) e Chumbo (Pb) (mg/kg) nos obtidos aos 7, 15, 30 e 45 dias nos órgãos	17
Tabela 3 -	Média e desvio padrão dos níveis de Ferro (Fe) (mg/kg) aos 7, 15, 30 e 45 dias nos órgãos.	19
Tabela 4 -	Média e desvio padrão dos níveis de Níquel (Ni) (mg/kg) aos 7, 15, 30 e 45 dias nos órgãos.	20
Tabela 5 -	Média e desvio padrão dos níveis de Cálcio (Ca) (mg/kg) aos 7, 15, 30 e 45 dias nos órgãos.	21

LISTA DE SIGLAS

Al	Alumínio
ANOVA	Análise de variância
As	Arsênio
Be	Berílio
Ca	Cálcio
Cd	Cádmio
Cl	Cloro
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Fe	Ferro
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HNO ₃	Ácido nítrico
ICP-OES	Espectrômetro de emissão óptica de plasma indutivamente acoplado
Mg	Magnésio
MTA	Mineral trióxido agregado
N	Nitrogênio
Ni	Níquel
O	Oxigênio
Pb	Chumbo
S	Enxofre
Sb	Antimônio
Si	Silício

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1 Materiais.....	14
2.2 Procedimentos cirúrgicos	14
2.3 Mensuração dos elementos/íons – Espectrômetro de absorção atômica (ICP-OES)	15
2.4 Análise estatística	16
3 RESULTADOS	17
4 DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30
ANEXOS	34

1 INTRODUÇÃO

Um dos desafios no desenvolvimento de materiais endodônticos é a criação de biomateriais que promovam a regeneração e/ou reparação da polpa/ tecido periapical e não causem danos à saúde sistêmica do indivíduo. Devido a isso, novos cimentos endodônticos têm sido propostos; entretanto, antes de sua introdução no mercado e aplicação clínica, é imprescindível que sua composição e propriedades sejam verificadas e também comparadas com outros materiais de uso rotineiro. Assim, apesar do grande número de pesquisas a respeito das propriedades biológicas e físico-químicas dos mesmos, poucas investigações com o propósito de entender o efeito sistêmico dos cimentos endodônticos foram realizadas ao longo dos anos¹⁻³.

Já é relatado que a composição química do material endodôntico pode afetar/interferir na resposta tecidual e no processo de reparo⁴ e também pode comprometer a saúde sistêmica^{1,2} uma vez que os íons/elementos tóxicos/metais pesados por eles liberados podem atingir os tecidos perirradiculares e acessar tecidos distantes pelos sistemas circulatório ou linfático, que podem deixar rastros em alguns órgãos do corpo e afetar seu metabolismo¹⁻³. É importante enfatizar que a taxa de elementos tóxicos liberados varia dependendo da composição química, dissolução iônica e tempo de presa do material^{3,5,6}. Além disso, os cimentos endodônticos podem liberar metais pesados^{2,7} mesmo após a presa³.

As propriedades ideais do cimento endodôntico foram inicialmente descritas por Grossman⁸; entretanto, os avanços na tecnologia biocerâmica revolucionaram a ciência dos materiais e fornecem uma nova abordagem biológica, em vez do selamento hermético do canal radicular, a capacidade de induzir bioatividade; com isso, uma nova classe de cimentos endodônticos, cimentos à base de silicato de tricálcio que

apresentam excelente biocompatibilidade, bioatividade e alta osteocondutividade foram introduzidas⁹⁻¹¹.

O MTA Fillapex (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S / A, Londrina, Brasil) foi o primeiro cimento obturador a base de MTA desenvolvido. É composto por resina salicilato contendo partículas de silicato tricálcico, MTA, dióxido de silício e óxido de bismuto^{10,11}. Embora contenha MTA, o MTA Fillapex não forma hidróxido de cálcio quando hidratado, promove baixa liberação de íons cálcio¹⁰ e é capaz de liberar metais pesados^{7,12}. Apesar disso, é considerado biocompatível, apresenta ação antimicrobiana e é capaz de induzir mineralização^{13,14}.

BioRoot RCS (Septodont, Saint-Maur-des Fosses, France) é um cimento a base de silicato tricálcio apresentado na forma pó/líquido. O pó apresenta em sua composição silicato tricálcio, óxido de zircônio e povidona e o líquido, água, cloreto de cálcio e policarboxilato^{11,15}. Investigações revelam que é um material bioativo, biocompatível, promove a angiogênese e a osteogênese^{16,17} e não possui metais pesados em sua composição^{11,15}.

Apesar do grande número de cimentos a base de silicato tricálcico disponíveis para uso clínico, nenhum deles atendem a todos os critérios definidos pela ISO 6876 (2012), ao mesmo tempo que exibem potencial de bioatividade e também não liberem elementos tóxicos no sistema circulatório. Assim, novos materiais ainda estão em desenvolvimento com o objetivo de melhorar tanto o desempenho dos cimentos endodônticos quanto evitar qualquer tipo de dano sistêmico à saúde. Com isso, o objetivo deste estudo foi rastrear os íons tóxicos/metais pesados liberados por MTA Fillapex e BioRoot RCS no tecido subcutâneo, cérebro, rim e fígado de ratos por espectrômetro de emissão óptica de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e também investigar seus possíveis efeitos sistêmicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Os materiais usados nesse estudo estão descritos na tabela 1. MTA Fillapex and BioRoot RCS foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 1 - Composição dos cimentos obturadores testados e seus fabricantes

Cimento	Composição	Fabricante
BioRoot RCS	Pó: silicato tricálcio, óxido de zirconio e povidona	Septodont, Saint
	Líquido: solução aquosa de clorito de cálcio e policarboxilato	Maur-des-Fosses, France
MTA Fillapex	Pasta base (amarela): resina de salicilato, resina natural, tungstato de cálcio, sílica nanoparticulada, pigmentos Pasta catalisadora (branca): resina de diluição, agregado de trióxido mineral (MTA), sílica nanoparticulada, pigmentos	Angelus, Londrina, Brazil

Fonte: bula BioRoot RCS e bula MTA Fillapex

2.2 Procedimentos cirúrgicos

Para a realização deste trabalho, sessenta e dois ratos Wistar machos, com idades entre 3 a 4 meses de idade, pesando proximadamente 250–280 g foram selecionados. Previamente ao início do experimento, esse estudo foi aprovado pelo comite de ética no uso animal

(protocolo número 00357-2017). Todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22°C e 24°C), ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro) e tratados com água e ração sólida triturada *ad libitum*. Os animais foram divididos em grupos de acordo com os cimentos testados.

A implantação subcutânea foi realizada seguindo relatórios anteriores^{18,19}. Resumidamente, tubos de polietileno estéreis (Abbott Labs do Brasil, São Paulo, Brasil) com 1 mm de diâmetro interno, 1,6 mm de diâmetro externo e 10 mm de comprimento foram preenchidos com os selantes e então implantados no tecido conjuntivo dorsal. Tubos vazios foram usados como controle. Cada grupo de animais recebeu o mesmo cimento.

2.3 Mensuração dos elementos/íons – Espectrômetro de absorção atômica (ICP-OES)

Após 7, 15, 30 e 45 dias, os animais foram sacrificados com a injeção de alta dose anestésica de tiopental sódico (Thiopentax; Cristália, Itapira, Brasil). Cérebro, fígado, rins e tubos implantados em foram removidos cada animal, pesados e armazenados a -80°C para determinar as concentrações de cálcio (Ca), cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), chumbo (Pb), ferro (Fe), magnésio (mg) e níquel (Ni) nesses tecidos.

Antes da análise, as amostras foram isoladas de materiais metálicos e poeira para evitar contaminação. Além disso, os tubos de polietileno com cimentos foram removidos de todas as amostras antes da digestão. Resumidamente, 0,1 g de amostras úmidas foram colocadas no recipiente de digestão. Depois disso, a solução para digestão composta por 3mL de ácido nítrico 65% (HNO₃) (v / v) (Sigma Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos) e 2 ml de peróxido de hidrogênio 30% (H₂O₂) (Sigma Aldrich, Saint Louis, Estados Unidos) foi adicionado às amostras. Em seguida, as amostras foram aquecidas e digeridas em uma unidade de micro-ondas para digestão ácida (Berghof Speedwave, Eningen,

Alemanha) de acordo com o programa de digestão. As soluções de digestão foram diluídas e analisadas em um Optima série 8300 ICP-OES (PerkinElmer, São Paulo, SP, Brasil). Para cada elemento, sete padrões foram usados para levar em consideração a faixa de trabalho analítico do instrumento. Uma solução de digestão sem amostra foi usada para preparar os padrões de calibração e brancos. Um branco do reagente foi subtraído de todos os resultados da amostra.

2.4 Análise estatística

O software GraphPad Prism 8.0 foi utilizado para realizar a análise estatística. O teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn de comparação múltipla foram perfomados para os dados não paramétricos; e análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, para dados paramétricos. A diferença foi considerada significativa em $p < 0.05$.

3 RESULTADOS

Nenhum traço de Co, Cr e Mg foi detectado nos os tecidos avaliados. Por outro lado, independentemente do cimento utilizado, não foram encontrados vestígios de Cu e Pb no tecido subcutâneo; além disso, esses metais pesados foram identificados no cérebro, rins e fígado (Tabela 2).

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos níveis de Cobre (Cu) e Chumbo (Pb) (mg/kg) obtidos aos 7, 15, 30 e 45 dias nos órgãos

(continua)

Íons	Órgãos	Cimento	Tempo			
			7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Cobre (Cu)	Cérebro	Controle	0.004±0.005	0.029±0.025	0.023±0.041	ND
		MTA Fillapex	0.018±0.017	0.003±0.006	ND	ND
		BioRoot RCS	0.023±0.013	0.019±0.016	ND	ND
	Fígado	Controle	0.002±0.004	0.020±0.027	ND	ND
		MTA Fillapex	ND	ND	ND	ND
		BioRoot RCS	0.166±0.198	ND	ND	ND
	Rim	Controle	0.312±0.231	0.172±0.163	0.150±0.106	0.169±0.179
		MTA Fillapex	0.222±0.166	0.213±0.155	0.250±0.214	0.214±0.140
		BioRoot RCS	0.300±0.103	0.421±0.142	0.123±0.045	0.127±0.096
Chumbo (Pb)	Cérebro	Controle	0.040±0.021	ND	0.001±0.002	0.026±0.022
		MTA Fillapex	0.047±0.034	0.034±0.027	0.011±0.010	0.046±0.026
		BioRoot RCS	0.057±0.056	0.035±0.041	0.018±0.017	0.083±0.079
	Fígado	Controle	0.039±0.028	ND	ND	0.016±0.018
		MTA Fillapex	0.011±0.009	0.003±0.006	0.010±0.013	0.008±0.012

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos níveis de Cobre (Cu) e Chumbo (Pb) (mg/kg) obtidos aos 7, 15, 30 e 45 dias nos órgãos

(conclusão)

Íons	Órgãos	Cimento	Tempo			
			7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Chumbo (Pb)	Fígado	BioRoot RCS	0.055±0.0 39	0.003±0.0 04	0.008±0.0 11	0.044±0.0 31
	Rim	Controle	0.133±0.0 53	ND	ND	0.040±0.0 56
		MTA Fillapex	0.065±0.0 41	0.088±0.0 57	0.029±0.0 32	0.056±0.0 30
		BioRoot RCS	0.082±0.0 22	0.045±0.0 46	0.041±0.0 42	0.- 39±0.004

ND: sem detecção

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

Em relação aos íons Fe, não foi observada diferença significativa entre os grupos MTA Fillapex, BioRoot e Controle em todos os tecidos ($p > 0,05$). Enquanto isso, o rastreamento dos íons de Fe por meio da dissociação do cimento e sua distribuição iônica nos órgãos dos ratos ao longo do tempo revelou que as maiores concentrações de Fe foram encontradas no fígado. Além disso, aos 15 dias, foi detectado aumento no grupo Controle quando comparado aos demais órgãos ($p < 0,05$); entretanto, aos 45 dias, todos os cimentos promoveram aumento nas concentrações de Fe ($p < 0,05$). Além disso, aos 30 dias, o grupo BioRoot exibiu mais Fe no fígado do que no cérebro e tecido subcutâneo ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Média e desvio padrão dos níveis de Ferro (Fe) (mg/kg) aos 7, 15, 30 e 45 dias nos órgãos.

Cimentos	Tecido subcutâneo			
	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Controle	0.09±0.10	0.18±0.02	0.82±1.05	0.24±0.08
MTA Fillapex	2.43±3.34	2.91±3.32	0.49±0.47	0.31±0.27 ¹
BioRoot RCS	0.22±0.13	0.25±0.22	0.54±0.64 ¹	0.31±0.16 ¹
Cimentos	Cérebro			
	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Controle	0.39±0.50	0.41±0.28	0.49±0.38	0.37±0.07
MTA Fillapex	3.89±3.54	0.38±0.16	0.36±0.25	0.53±0.26 ¹
BioRoot RCS	1.59±1.62	0.97±0.63	0.30±0.22 ¹	0.69±0.27 ¹
Cimentos	Fígado			
	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Controle	5.32±4.96	5.31±2.83	4.26±3.79	10.43±0.70
MTA Fillapex	4.26±4.05	5.56±4.17	4.98±4.66	8.62±1.87 ²
BioRoot RCS	1.88±1.32	5.22±5.46	3.45±2.61 ²	6.96±1.89 ²
Cimentos	Rim			
	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Controle	1.69±1.22	1.31±1.06	0.94±0.54	1.31±0.88
MTA Fillapex	0.88±0.66	0.99±0.40	1.62±0.47	1.26±0.76 ¹
BioRoot RCS	1.92±0.71	2.08±0.50	1.36±0.62	1.26±0.44 ¹

Números indicam diferença estatísticas do mesmo cimento ao longo do tempo nos diferentes tecidos (rastreamento de íons).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Não houve diferença significativa entre os cimentos e o grupo controle em relação à concentração de Ni no cérebro e tecido subcutâneo ($p > 0,05$); entretanto, aos 15 dias, para o grupo MTA Fillapex no fígado ($p < 0,05$) e, aos 45 dias, para o grupo BioRoot no rim, foi identificado um aumento nessas concentrações ($p < 0,05$). Além disso, todos os cimentos apresentaram concentrações de Ni semelhantes no cérebro, rins e fígado. (Tabela 4).

Tabela 4 - Média e desvio padrão dos níveis de Níquel (Ni) (mg/kg) aos 7, 15, 30 e 45 dias nos órgãos.

Cimentos	Tecido Subcutâneo			
	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Controle	0.001±0.001	0.003±0.004	0.001±0.001	0.002±0.003
MTA	0.0002±0.0005 ^{a1}	0.007±0.009	0.001±0.002	0.003±0.003 ¹
Fillapex				
BioRoot	0.0036±0.002	0.007±0.004	0.001±0.002	0.001±0.003 ¹
RCS				
Cimentos	Cérebro			
	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Controle	0.021±0.009	0.005±0.005	0.009±0.007	0.011±0.010
MTA	0.026±0.006 ^{A2}	0.016±0.011	0.011±0.007 ^B	0.07±0.006 ²
Fillapex				
BioRoot	0.017±0.004	0.016±0.010	0.017±0.011	0.024±0.005
RCS				
Cimentos	Fígado			
	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Controle	0.021±0.003	ND	0.005±0.004	0.013±0.012
MTA	0.019±0.021 ^A	0.018±0.007 ^b	0.012±0.007	0.024±0.005 ^B
Fillapex				
BioRoot	0.035±0.023 ^A	0.003±0.003 ^B	0.013±0.012	0.017±0.010
RCS				
Cimentos	Rim			
	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Controle	0.019±0.002	0.004±0.006	0.003±0.003	0.010±0.009 ^a
MTA	0.016±0.010	0.017±0.004	0.017±0.010	0.020±0.003
Fillapex				
BioRoot	0.029±0.026	0.017±0.018	0.012±0.011	0.025±0.003 ^{b2}
RCS				

Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos no mesmo tecido e no mesmo tempo. As letras maiúsculas indicam diferença entre o mesmo cimento nos diferentes tecidos e no mesmo tempo. Os números indicam diferença estatística do mesmo cimento ao longo do tempo nos diferentes tecidos (íons de rastreamento). ND: sem detecção

Fonte: elaborada pelo autor, 2020.

A comparação entre os mesmos cimentos ao longo do tempo revelou que, nas amostras de fígado, os grupos Controle e BioRoot exibiram mais Ni no dia 7 do que aos 15 dias ($p < 0,05$); Além disso, um aumento aos 7 dias e uma redução significativa no dia 45 foi identificado no grupo MTA Fillapex ($p < 0,05$). Por outro lado, nas amostras de rim, as concentrações mais baixas foram encontradas aos 7 e 30 dias no grupo MTA Fillapex em comparação com o dia 45; além disso, no grupo Controle, aos 7 dias a concentração de Ni foi superior aos 15 e 30 dias (p

<0,05). Em relação à amostra de cérebro, aos 7 dias, a concentração de Ni do grupo Controle e MTA Fillapex foi menor em comparação aos dias 15 e 30, respectivamente ($p < 0,05$) (Tabela 4).

O rastreamento de íons Ni ao longo do tempo revelou que as menores concentrações foram encontradas no tecido subcutâneo, uma vez que, no dia 45, essas concentrações foram significativamente menores do que cérebro e rim no grupo BioRoot ($p < 0,05$) e fígado no grupo MTA Fillapex ($p < 0,05$). Além disso, aos 7 dias, as concentrações no subcutâneo de Ni no grupo MTA Fillapex também foram menores do que no cérebro ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Todos os cimentos conseguiram liberar Ca em todos os tempos, desde que foi possível quantificá-los tanto no tecido local (tecido subcutâneo) quanto no tecido à distância (rim, fígado e cérebro). Os cimentos exibiram níveis semelhantes de Ca no subcutâneo, cérebro e rim ($p > 0,05$). Além disso, o rastreamento de Ca pela investigação da dissociação dos cimentos e da distribuição iônica nos órgãos ao longo do tempo revelou que, aos 15 dias, um aumento considerável nos Ca nos rins quando comparado ao no tecido subcutâneo no MTA Fillapex ($p > 0,05$). Por outro lado, os níveis de Ca no tecido subcutâneo foram superiores ao fígado aos 45 dias no BioRoot ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Média e desvio padrão dos níveis de Cálcio (Ca) (mg/kg) aos 7, 15, 30 e 45 dias nos órgãos.

(continua)

Cimentos	Tecido Subcutâneo			
	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Controle	12.01±15.83	5.52±3.71	2.22±1.48	3.37±2.64
MTA Fillapex	3.02±3.52	2.87±2.03 ¹	5.42±4.20	42.33±58.55
BioRoot RCS	14.39±12.58	5.54±1.15	5.57±4.47	18.84±10.84 ¹
Cimentos	Cérebro			
	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Controle	5.77±4.39	11.95±12.90	25.51±37.88	3.52±2.38

Tabela 5 - Média e desvio padrão dos níveis de Cálcio (Ca) (mg/kg) aos 7, 15, 30 e 45 dias nos órgãos.

(conclusão)

Cimentos	7 dias	15 dias	30 dias	45 dias
Cérebro				
MTA	14.57±14.91	7.47±5.51 ²	9.62±6.45	25.18±27.41
Fillapex				
BioRoot	20.45±18.41	13.25±17.42	5.01±7.55	11.55±8.94
RCS				
Fígado				
Controle	2.18±2.11	1.34±1.02	1.47±0.66	6.24±2.05
MTA	3.85±2.49	4.46±1.09	4.15±3.64	2.33±0.76 ^a
Fillapex				
BioRoot	2.97±2.11	7.47±6.51	5.73±4.16	3.13±2.35
RCS				
Rins				
Controle	11.73±15.31	3.82±2.54	2.20±1.29	6.01±6.44
MTA	4.47±2.98	22.59±20.71	3.79±0.28	4.92±4.31
Fillapex				
BioRoot	8.03±6.03	3.87±3.22	0.92±1.14	4.84±3.74 ²
RCS				

Letras minúsculas indicam diferença estatística entre grupos no mesmo tecido e no mesmo tempo.

Os números indicam diferença estatística do mesmo cimento ao longo do tempo nos diferentes tecidos (íons de rastreamento)

Fonte: elaborada pelo autor, 2020.

4 DISCUSSÃO

Diversas investigações têm sido realizadas sobre o possível efeito tóxico de materiais dentários, especialmente os cimentos endodôntico em órgãos, uma vez que alguns desses materiais por estar em contato direto com a polpa e os tecidos perirradiculares e podem liberar íons tóxicos/metais pesados^{2,3,7,20}. No entanto, nenhuma pesquisas examinou os íons locais liberados/lixiviados por esses cimentos quando em contato com o fluido corporal ou mesmo tentaram verificar a distribuição/localização nos órgãos ao longo do tempo. Com isso, o objetivos deste estudo foi rastrear íons tóxicos/metais pesados liberados pelos cimentos obturadores MTA Fillapex e BioRoot RCS no tecido subcutâneo, cérebro, rins e fígado de ratos e também investigar seus possíveis efeitos sistêmicos. Embora os efeitos sistêmicos do MTA Fillapex já estejam documentados^{2,3}, nenhum estudo abordou seus efeitos sistêmicos do BioRoot. Além disso, para este estudo, usamos um rato como modelo animal, pois seu metabolismo acelerado facilita essa análise²¹ e o implante subcutâneo como método para acessar o metal de lixiviação dos cimentos endodônticos nas células circundantes (local) ou para distribuir para órgãos distantes (sistêmicos) ao longo do tempo.

Nesse estudo, ICP-OES foi selecionado para mensurar a distribuição e o potencial de toxicidade dos metais pesados liberados pelos cimentos obturadores nos órgãos dos ratos.

A ISO 9917-1 (2007) especifica apenas os limites de segurança para as concentrações de arsênio (As) e Pb, deixando os outros metais pesados sem nenhuma regulamentação (ISO 2007). Por esse motivo, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) estabeleceu legalmente alguns níveis máximos permitidos para metais pesados (antimônio (Sb), As, berílio (Be), cádmio (Cd), Cr, Pb, Al e Fe) na água potável²³.

O chumbo é um metal genotóxico que não possui função biológica e, quando absorvido, mesmo em níveis mais baixos, pode ser classificado como potencialmente tóxico, pois promove efeitos adversos como neurotoxicidade, nefrotoxicidade e danos aos sistemas cardiovasculares^{25,26}. O cobre é uma das cromosferas do MTA^{6,27} e desempenha um papel essencial nos processos metabólicos humanos, incluindo resistência óssea, respiração celular e formação de tecido conjuntivo^{28,29}. Além disso, o alimento é a principal fonte de exposição inicial ao Pb e Cu^{25,29}. Neste estudo, independentemente do cimento utilizado, não foram encontrados vestígios de Pb e Cu no tecido subcutâneo; contudo, esses metais pesados foram identificados no cérebro, rim e fígado. Nossos dados discordam de Borges *et al.*⁷ que mostram a presença de ambos no MTA Fillapex. Por outro lado, o MTA, presente na composição do MTA Fillapex, está associado à liberação de metais pesados e promove efeitos sistêmicos adversos^{1,22,24,30,31}. Além disso, até o momento, nenhum estudo abordou esses metais na presença da BioRoot. Dessa forma, acreditamos que as concentrações de Pb e Cu encontradas nos órgãos de ratos sejam prováveis da via de absorção desse metal e não dos cimentos avaliados, o que pode justificar nossos resultados. Portanto, é claro que novas investigações são necessárias para esclarecer melhor os achados.

O ferro é um íon essencial envolvido em várias reações da função celular, que inclui a homeostase celular, principalmente no transporte de oxigênio pela hemoglobina nos vasos sanguíneos³⁸. Seu acúmulo leva a danos no fígado, coração e, no cérebro está associado a distúrbios neurodegenerativos, como a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer^{32,33}. Além disso, quando presentes em materiais dentários estão relacionados à descoloração dos dentes²³. Fe foi detectado em todos os tecidos; porém, não foi observada diferença entre os cimentos e o grupo controle. A maior parte do corpo Fe é armazenada no fígado³² e o nível máximo permitido na água potável deve ser de 0.3mg/L²³. Este é o primeiro

estudo realizado para avaliar o Fe liberado na BioRoot. Assim, acreditamos que esses fatos podem nos permitir considerar que o Fe é de órgão e não de cimentos.

O rastreamento de íons ao longo do tempo pode ser associado ao tempo de endurecimento/presa e dissociação iônica, bem como aos íons lixiviados/liberados pelos cimentos quando em contato com o fluido corporal. Portanto, neste estudo, em geral, a maior concentração de Fe foi encontrada na amostra de fígado do que em outros órgãos, com alguma variação de acordo com o tempo para os grupos Controle e BioRoot. Como sabemos, Fe é armazenado no fígado³², acreditamos que concentrações mais elevadas observadas no fígado são proporcionadas pelo Fe armazenado no corpo e não pelos cimentos. Além disso, como não identificamos nenhuma diferença entre o grupo de controle e os cimentos, esses fatos nos fazem acreditar que o Fe é realmente dos órgãos do corpo. Ao mesmo tempo, a taxa gradual de reações de metabolismo desses íons pode levar à diferença na taxa de absorção/eliminação desses íons, o que poderia justificar as diferenças de concentração observadas³² e também esclarecer nossos dados.

O níquel é um nutriente essencial para algumas funções do corpo humano, pois aumenta a atividade hormonal e está envolvido no metabolismo lipídico^{34,35}. A propósito, dependendo dos níveis de exposição de Ni, eles podem promover efeitos adversos à saúde e induzir genotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade e reação alérgica da pele^{35,36}.

Não foram observadas diferenças entre todos os cimentos e grupo controle nas amostras de tecido cerebral e subcutâneo; no entanto foram identificado um aumento nas concentrações de Ni, aos 15 dias, para o grupo MTA Fillapex no fígado e, aos 45 dias, nos rins para o grupo BioRoot. A água potável, alimentos, inalação e contato dérmico são as principais fontes de ingestão de Ni^{34,35}. Ni é um nutriente responsável por

algumas funções do corpo, e sua distribuição e absorção depende da via de exposição, assim, logo após a exposição, o mesmo aparece no pulmão, cérebro, rim, fígado e suprarrenais; no entanto, após a absorção, o rim é a principal via de eliminação³⁴. Portanto, é possível que a concentração de Ni detectada no BioRoot seja de tecido e não do cimento, pois já foi relatado que a meia-vida biológica desse metal depende, em parte, do tamanho das suas partículas e do órgão³⁴, o que poderia justificar nossos dados

Neste estudo, no fígado, verificamos que os grupos Controle e BioRoot exibiram mais Ni no dia 7 do que no dia 15; ao mesmo tempo, um aumento ao 7º dia com consequente redução no dia 45 foi identificado no MTA Fillapex. Por outro lado, no rim, menor concentração foi encontrada aos 07 e 30 dias no MTA Fillapex em comparação ao dia 45; além disso, no controle, aos 07 dias a concentração de Ni foi superior aos 15 e 30 dias. Com relação ao cérebro, aos 7 dias, a concentração de Ni do grupo Controle e MTA Fillapex foi menor do que nos dias 15 e 30, respectivamente. Após a absorção, o rim é a principal via de eliminação do Ni³⁴. Portanto, com base em nossas descobertas, consideramos que o diferente comportamento do MTA Fillapex nos órgãos pode ser devido à sua composição e ao seu tempo de presa associados à via de absorção/eliminação desse metal que pode mudar no momento levando à diferença de concentração do mesmo ao longo do tempo³⁴. Da mesma forma, nenhuma diferença e mesmo comportamento entre o Controle e o BioRoot ainda nos fazem acreditar que o Ni é proveniente dos órgãos ou de uma das principais fontes de ingestão de Ni.

O rastreamento do Ni ao longo do tempo revelou que a concentração mais baixa foi encontrada no tecido subcutâneo quando comparada com outros órgãos no dia 7 para Controle (fígado), MTA Fillapex (fígado); e aos 45 dias para BioRoot (cérebro e rim) e MTA Fillapex (cérebro). Conforme relatado anteriormente, a distribuição e a absorção de Ni dependem da via de exposição; portanto, após a exposição

aparecem no pulmão, cérebro, rim e fígado, sendo que após a absorção, há eliminação no rim³⁴. Curiosamente, somos normalmente/diariamente expostos a baixos níveis de Ni, onde alimentos (0,1-0,3 mg), água potável (menos que 0,02 mg) e ar (0,0001-0,0007 mg)^{35,37}. Dessa maneira, podemos correlacionar nossos dados com os valores da água potável, pois nossos dados médios também foram menores que 0,02mg/kg. No entanto, investigações adicionais precisam ser conduzidas para elucidar essas correlações.

Concentrações semelhantes de Ca no tecido subcutâneo, cérebro e rim foram encontrados entre MTA Fillapex e BioRoot .O cálcio é um íon essencial para muitas funções biológicas e celulares, desempenhando funções indispensáveis, como transmissão de impulsos, contração muscular, coagulação sanguínea, secreção hormonal e adesão intercelular^{38,40}. Cerca de 99% do cálcio corporal está contido no osso; 1% restante está na forma de um cátion intracelular ou circulando no plasma^{39,40}. A absorção de cálcio é gastrointestinal e os rins desempenham um papel central na homeostase desses íons^{39,40}. Nossos dados podem ser confirmados por investigações anteriores que mostraram a presença de Ca no MTA Fillapex e BioRoot e também que demonstraram a liberação de Ca quando em contato com simulador de fluidos corporais^{14,15,40}. O rastreamento de Ca nos órgãos revelou que, aos 15 dias, houve um aumento da concentração de Ca nos rim quando comparado ao tecido subcutâneo no MTA Fillapex. Por outro lado, a concentração de Ca no tecido subcutâneo foi superior ao fígado aos 45 dias no BioRoot. O rim desempenha um papel central na homeostase dos íons cálcio^{39,40}, quando as reservas corporais de Ca diminuem significativamente, a absorção gastrointestinal, a reabsorção óssea e a reabsorção tubular renal aumentam para normalizar seus níveis. A regulação renal desses íons ocorre por filtração glomerular e reabsorção e/ou secreção tubular e, portanto, é um determinante importante da concentração do mesmo no plasma^{39,40}. Dessa forma, nós acreditamos

que dois eventos podem acontecer e serem conectados, justificando assim esses achados: o primeiro seria a diferença na resposta tecidual, na composição química, no tempo de presa e dissociação iônica do MTA Fillapex e BioRoot que promoveria uma variação na liberação iônica ao longo do tempo. O segundo seria o mecanismo de reabsorção/secreção presente no rim, com o objetivo de eliminar esse íon e tentar manter o corpo em homeostase; assim, esses tais eventos juntos talvez sejam a razão das elevadas concentrações de Ca observadas nos órgãos. No entanto, é claro que novas investigações são necessárias para melhor esclarecer as descobertas.

6 CONCLUSÃO

Com base em nossas constatações, é possível concluir que nenhum dos selantes foi capaz de promover danos à saúde sistêmicos. Ao mesmo tempo, a ausência de algum metal pesado no tecido subcutâneo pode nos permitir apoiar essa conclusão. Além disso, a quantidade mínima de metais Fe e Ni observada tanto no tecido subcutâneo quanto nos órgãos do corpo nos leva a considerar que, mesmo que esses metais possam passar pela circulação sistêmica, a via de absorção / eliminação não é a mesma para cada órgão. Além disso, o comportamento semelhante entre controle e cimentos nos permite concordar nas hipóteses de que esses metais estejam presentes no tecido e não tenham relação com os cimentos obturadores; portanto, novos estudos são necessários para entender esse mecanismo.

REFERÊNCIAS

1. Simsek N, Akinci L, Alan H, Gecor O. Determination of trace elements in kidneys, livers and brains of rats with sealer implants by ICP-MS. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;31:397–402.
2. Demirkaya K, Can Demirdöğen B, Öncel Torun Z, Erdem O, Çetinkaya S, Akay C. In vivo evaluation of the effects of hydraulic calcium silicate dental cements on plasma and liver aluminium levels in rats. *Eur J Oral Sci*. 2016;124:75-81.
3. Demirkaya K, Demirdöğen BC, Torun ZÖ, Erdem O, Çırak E, Tunca YM. Brain aluminium accumulation and oxidative stress in the presence of calcium silicate dental cements. *Hum Exp Toxicol*. 2017;36:1071-1080.
4. Anderson JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res* 2001;31: 81–110.
5. Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials*. 2011;32:2757-74.
6. Tian J, Zhang Y, Lai Z, Li M, Huang Y, Jiang H, et al. Ion Release, Microstructural, and Biological Properties of iRoot BP Plus and ProRoot MTA Exposed to an Acidic Environment. *J Endod*. 2017;43:163-168.
7. Borges AH, Guedes OA, Dorileo MCGO, Bandeca MC, Estrela ARA, Estrela C. Analysis of chemical elements and heavy metals in MTA Fillapex and AH Plus. *Oral Health Dent Manag* 2014;13:1007–1012.
8. Grossman L. Obturation of root canal. In: Grossman L, editor. *Endodontic Practice*. Philadelphia: USA; 1982. pp 297.
9. Khalil I, Naaman A, Camilleri J. Properties of Tricalcium Silicate Sealers. *J Endod*. 2016;42:1529-35.
10. Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru JM, Hungaro-Duarte MA, Tanomaru-Filho M, Camilleri J. Chemical characterization and bioactivity of epoxy resin and Portland cement-based sealers with niobium and zirconium oxide radiopacifiers. *Dent Mater*. 2014;30:1005-20.

11. Siboni F, Taddei P, Zamparini F, Prati C, Gandolfi MG. Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. *Int Endod J*. 2017(50 Suppl 2):e120-e136.
12. Demirkaya K, Demirdöğen BC, Torun ZO, Erdem O, Tunca YM. The effects of hydraulic calcium silicate containing endodontic materials on oxidative stress in erythrocytes and liver. *Turkish J Biochemistry* 2017;43: 3-9.
13. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J*. 2013;46:755-62.
14. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Nery MJ, Filho JA, et al. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX®. *Dent Traumatol*. 2012;28:452-6.
15. Reszka P, Nowicka A, Lipski M, Dura W, Drożdżik A, Woźniak K. A Comparative Chemical Study of Calcium Silicate-Containing and Epoxy Resin-Based Root Canal Sealers. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9808432.
16. Camps J, Jeanneau C, El Ayachi I, Laurent P, About I. Bioactivity of a Calcium Silicate-based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. *J Endod*. 2015;41:1469-73.
17. Loison-Robert LS, Tassin M, Bonte E, Berbar T, Isaac J, Berdal A, et al. In vitro effects of two silicate-based materials, Biodentine and BioRoot RCS, on dental pulp stem cells in models of reactionary and reparative dentinogenesis. *PLoS One*. 2018;13:e0190014.
18. de Azevedo Queiroz ÍO, Gonçalves LO, Takamiya AS, Rezende GC, Machado T, Siveiri-Araujo G, et al. Hyperglycemic condition influence on mineral trioxide aggregate biocompatibility and biomineralization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108:663-673.
19. de Azevedo Queiroz IO, Mello WG, Martins CM, Dal Fabbro R, Narciso LG, Massunari L, et al. Systemic bone marker expression induced by grey and white mineral trioxide aggregate in normal and diabetic conditions. *Int Endod J*. 2018;51:889-900.

20. Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, Camargo CH. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2012;38:495-500.
21. Azzu V, Valencak TG. Energy Metabolism and Ageing in the Mouse: A Mini-Review. *Gerontology*. 2017;63:327-336.
22. Chang SW, Baek SH, Yang HC, Seo DG, Hong ST, Han SH, et al. Heavy metal analysis of ortho MTA and ProRoot MTA. *J Endod*. 2011;37:1673-6.
23. Kum KY, Kim EC, Yoo YJ, Zhu Q, Safavi K, Bae KS, et al. Trace metal contents of three tricalcium silicate materials: MTA Angelus, Micro Mega MTA and Bioaggregate. *Int Endod J*. 2014;47:704-10.
24. Kum KY, Zhu Q, Safavi K, Gu Y, Bae KS, Chang SW. Analysis of six heavy metals in Ortho mineral trioxide aggregate and ProRoot mineral trioxide aggregate by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Aust Endod J*. 2013;39:126-30.
25. Moore MR. Diet and lead toxicity. *Proc Nutr Soc*. 1979;38:243-50.
26. García-Lestón J, Méndez J, Pásaro E, Laffon B. Genotoxic effects of lead: an updated review. *Environ Int*. 2010;36:623-36.
27. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Stowe S, Brink F. A qualitative X-ray analysis of white and grey mineral trioxide aggregate using compositional imaging. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17:187-91.
28. Balamurugan K, Schaffner W. Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1763:737-46.
29. Myint ZW, Oo TH, Thein KZ, Tun AM, Saeed H. Copper deficiency anemia: review article. *Ann Hematol*. 2018;97:1527-1534.
30. Khalil WA, Eid NF. Biocompatibility of BioAggregate and mineral trioxide aggregate on the liver and kidney. *Int Endod J*. 2013;46:730-7.
31. Garcia LDFR, Huck C, Magalhães FAC, Souza PPC, Souza Costa CA. Systemic effect of mineral aggregate-based cements: histopathological analysis in rats. *J Appl Oral Sci*. 2017;25:620-630.
32. Tandara L, Salamunic I. Iron metabolism: current facts and future directions. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012;22:311-28.

33. Stankowski JN, Dawson VL, Dawson TM. Ironing out tau's role in parkinsonism. *Nat Med*. 2012;18:197-8.
34. Barceloux DG. Nickel. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1999;37:239-58.
35. Schaumlöffel D. Nickel species: analysis and toxic effects. *J Trace Elem Med Biol*. 2012;26:1-6.
36. Das KK, Reddy RC, Bagoji IB, Das S, Bagali S, Mullur L, et al. MS. Primary concept of nickel toxicity - an overview. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2018;30:141-152.
37. International programme on chemical safety, environmental health criteria 108, Nickel, WHO, Geneva, Switzerland; 1991.
38. Hebert SC, Brown EM: The scent of an ion: Calcium-sensing and its roles in health and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5: 45–53, 1996. 109.
39. Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10:1257-72. 110.
40. Allgrove J. Physiology of Calcium, Phosphate, Magnesium and Vitamin D. *Endocr Dev*. 2015;28:7-32.

ANEXOS

ANEXO A - Comitê de ética animal



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação das propriedades físico-químicas e biológicas de um cimento experimental à base de silicato tricálcico", Processo FOA nº 00357-2017, sob responsabilidade de João Eduardo Gomes Filho apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 17 de Maio de 2017.

VALIDADE DESTA CERTIFICADO: 17 de Maio de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 17 de Junho de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of the physicochemical and biological properties of experimental tricalcium silicate based sealer", Protocol FOA nº 00357-2017, under the supervision of João Eduardo Gomes Filho presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 17, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 17, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 17, 2019.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Favaroni
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Aracatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
Rua José Bonifácio, 1100 - Vila Aracatuba - CEP: 16075-600 - ARACATUBA - SP
Fone (16) 3392-0021 E-mail: CEUA-aracatuba@vet.unesp.br