

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 31/03/2018.



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, Pairokh³⁵, 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 Bi_2O_3 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 (ZrO_2) 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 ZrO_2 (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 Ca^{2+} 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 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.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.

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.

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