



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



ANA LÍVIA GOMES CORNÉLIO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E
BIOATIVIDADE DE CIMENTOS EXPERIMENTAIS A BASE DE
SILICATO DE CÁLCIO COM DIFERENTES RADIOPACIFICADORES
E DOS CIMENTOS BIODENTINE E MTA PLUS.**

Araraquara
2015



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



ANA LÍVIA GOMES CORNÉLIO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E
BIOATIVIDADE DE CIMENTOS EXPERIMENTAIS A BASE DE
SILICATO DE CÁLCIO COM DIFERENTES RADIOPACIFICADORES
E DOS CIMENTOS BIODENTINE E MTA PLUS.**

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

Araraquara
2015

Cornélio, Ana Livia Gomes
Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e bioatividade de cimentos experimentais a base de silicato de cálcio com diferentes radiopacificadores e dos cimentos Biodentine e MTA Plus / Ana Livia Gomes Cornélio.-- Araraquara: [s.n.], 2015.
100 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

1. Genotoxicidade 2. Técnicas de cultura de células 3. Endodontia

I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

ANA LÍVIA GOMES CORNÉLIO

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e bioatividade de cimentos experimentais a base de silicato de cálcio com diferentes radiopacificadores e dos cimentos Biodentine e MTA Plus.

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção do grau de Doutor

Presidente e Orientador: Prof.Dr. Mário Tanomaru Filho

2º examinador: Prof.Dr. Idomeo Bonetti Filho

3º examinador: Prof.Dr. Joni Augusto Cirelli

4º examinador: Prof.Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte

5º examinador: Profa.Dra. Loise Pedrosa Salles

Araraquara, 30 de março de 2015.

DADOS CURRICULARES

Ana Livia Gomes Cornélio

Nascimento: 01.04.1986
Bauru -SP

Filiação: Rita Maria Gomes Cornélio
Fernando Albertini Cornélio

2011-2015 Doutorado em Endodontia Faculdade de
Odontologia de Araraquara –UNESP – Área:
Odontologia

2009-2011 Mestrado em Endodontia Faculdade de
Odontologia de Araraquara –UNESP - Área:
Odontologia

2008-2010 Especialização em Endodontia Faculdade de
Odontologia de Araraquara –UNESP Fundação
Araraquarense de ensino e pesquisa em
Odontologia – FAEPO

2004-2007 Graduação em Odontologia Faculdade de
Odontologia de Araraquara- UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha querida mãe Rita, que sempre foi ao longo da minha jornada profissional e pessoal, meu porto seguro. O amor incondicional dela me faz ser forte e lutar pelos meus sonhos, sempre com honestidade e amor. Você é minha ídola e sempre vou te amar e demonstrar minha eterna gratidão por ti.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me guiado até aqui, ter aberto caminhos tão iluminados e por ter colocado na minha vida pessoas e oportunidades tão especiais.

Agradeço a minha família, de modo especial aos meus pais Rita e Fernando. Saibam que vocês sempre foram e sempre serão meu porto seguro, agradeço por sempre me apoiarem e incentivarem nos estudos e no caminho que escolhi trilhar. Eu amo vocês incondicionalmente, obrigada por tudo!

Agradeço a meu irmão, Fernando, recém doutor, que por coincidência, escolheu seguir a carreira acadêmica, e que muitas vezes me ajudou, trocamos experiências e consolos. Você foi meu primeiro e melhor amigo, e que assim possamos continuar sempre juntos. Amo você.

Agradeço ao meu noivo, Henrique, pela paciência, incentivo e parceria. Paciência principalmente pela distância, e nos momentos difíceis; incentivo, por sempre me apoiar e acompanhar minhas conquistas, e parceria por topa tudo, acreditar em mim, e lutar junto comigo na realização de mais um sonho. A vida se torna muito mais fácil, quando encontramos o verdadeiro amor. Obrigada por tudo amore. Amo você.

Agradeço a minha vó Ana, que sempre se preocupou comigo, na correria das viagens de Bauru-Araraquara, e que sempre me espera com um sorriso no rosto e um abraço apertado. Eu amo você Vó!

Agradeço a todos da minha família que sempre estão acompanhando meus estudos, minhas conquistas e torcendo junto comigo, amo demais vocês, tias, tios, primos, primas, vós, sogro e sogra, cunhados e cunhadas, sobrinhos e sobrinhas.

Agradeço ao meu orientador, prof. Dr. Mário Tanomaru filho, pela sabedoria, ensinamentos e oportunidades. Devo grande parte do meu aprendizado profissional ao senhor. Obrigada por tudo! Saiba que sempre levarei seus ensinamentos e a filosofia da Unesp-Araraquara comigo, onde eu estiver.

Agradeço aos demais professores do departamento de Endodontia, pelo “bom dia” de cada dia, pela convivência e ensinamentos diários. Profa. Dra. Gisele Faria, Prof. Dr. Idomeo Bonetti-filho, Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru, Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Vilella Berbet, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo, Prof. Milton Carlos Kuga.

Agradeço também todos os colegas de pós-graduação que estavam comigo diariamente, aqueles que me acompanham desde a graduação, o mestrado, até os mais novos recentes alunos. Carol Andolfatto que foi minha companheira de quarto por muitos anos, e grande amiga até hoje, Roberta, Raqueli, Alana, Paulinha, Gisselle, Camis, Ca Spir, Ariele, Adinael, Tiago, Fernando, Mírian, Carol Venção, Bernardo, Natália, Kátia, Kelly, Ju, Aline, Kênnia, Larissa, Dérik, Fernanda, Gaby, Lauriê, Rodrigo e Roberto, por cada um de vocês, pela amizade, ajuda, descontração e trabalho compartilhado.

Agradeço em especial a duas grandes amigas que me ajudaram muito na realização desta tese: Letícia e Elisandra. A Lê, desde a iniciação científica, sempre tornou meus dias mais alegres, uma amiga muito competente e inteligente, que conquista seu espaço por onde passa, minha irmã caçula da FOAr. Obrigada por toda a ajuda e amizade, você foi essencial neste trabalho. A Eli, um anjo que apareceu pra nos ajudar, e aos poucos se tornou uma grande amiga, confidente diária, conselheira e irmã. Li, essa conquista é sua também. Obrigada por todos os ensinamentos, parcerias na madrugada, ombro amigo, e

risadas, você é muito especial! Vou sentir demais a falta de vocês no meu dia-a-dia. Obrigada meninas, muito obrigada!

A Loise, grande amiga desde o mestrado, que me apoiou e me ajudou sempre, uma das grandes responsáveis pela minha paixão hoje pela pesquisa em cultura de células. Me proporcionou uma grande experiência nos Estados Unidos, onde abriu sua casa pra mim, podendo assim conhecer o Forsyth Institute, e o Dr. Battaglino, numa experiência única. Meu muito obrigada a minha futura vizinha de Brasília-DF.

Aos demais professores de Periodontia, que abriram as portas do laboratório de Biologia celular e molecular, sempre dispostos a nos ajudar, Prof. Dr. Carlos Rossa-Júnior e Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, grandes professores e pesquisadores, os quais admiro muito!

Agradeço também a faculdade de Farmácia, especialmente ao laboratório de Citologia e Imunologia. Aos alunos Thaís, Felipe, e a técnica Mariza, que nos ajudaram muito.

A unB, Universidade de Brasília, sempre de portas abertas a nos receber e ajudar sempre que necessário, pela parceira e novos conhecimentos adquiridos no laboratório de cultura de células.

Agradeço a todos os funcionários do departamento, Priscila, Alessandra, D.Cida, Marinho, as moças da limpeza, que sempre deixam tudo impecável pra gente trabalhar, e fazem um café delicioso. A todos os demais funcionários da FOAr, da pós-graduação, sempre muito solícitos e dispostos. Agradeço demais.

Agradeço minhas amigas de longa data, Fernanda e Juliana Hotta, pela amizade, torcida e acompanhamento desde a graduação nesta jornada acadêmica. Sabem o quanto são especiais e importantes na minha vida! As eternas amigas e companheiras de Bauru e Araraquara, Laísa, Jéssica, Nat,

Liegi, Mayara, Chaine, Gisele, Andressa, Sarinha, pelos ótimos momentos de descontração, viagens, pelos desabafos e pela amizade sincera de sempre!

Ao CNPq e a FAPESP pela concessão de bolsa de estudos e auxílio para a realização desta tese de doutorado.

RESUMO

Gomes-Cornélio AL. Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e bioatividade de cimentos experimentais a base de silicato de cálcio com diferentes radiopacificadores e dos cimentos Biodentine e MTA Plus.[Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

Cimentos de silicato de cálcio são estudados como materiais reparadores. O estudo foi dividido em 4 capítulos: No primeiro, citotoxicidade (MTT e Apoptose), genotoxicidade (teste Cometa) foram avaliadas em Saos-2 para os materiais: Cimentos de silicato de cálcio puro (CSC); Modificado (CSCM); Resinoso (CSCR1, CSCR2 e CSCR3). Na viabilidade, CSC e CSCR3 (50mg/mL) foram citotóxicos. CSCR1, CSCR2 e CSCR3 mostraram maior apoptose. Somente CSC e CSCR2 não foram genotóxicos em 10mg/mL ($P<0.05$). No cap.2, CSCM e CSCR2, foram associados a radiopacificadores: óxido de zircônio e óxido de nióbio (micro e nano), óxido de bismuto, tungstato de cálcio. MTA foi o controle para citotoxicidade e bioatividade. Todos foram viáveis e apresentaram apoptose semelhantes (1:8). A necrose foi superior ($P<0.05$). Ambos CSCs induziram fosfatase alcalina (ALP) e ARS. No cap.3, Biodentine (Septodont), MTA Plus (Avalon), CSCRs Nb₂O₅ e ZrO₂ foram analisados quanto à cito e genotoxicidade. No MTT (1, 3 e 7d), todos foram similares. No qPCR, houve expressão de BAX (3d.) para CSCRs, MTAP e CSCR ZrO₂ (5d). Para BCL2, (3 e 5d) somente MTAP e CSCR Nb₂O₅ (5d.). Na genotoxicidade, todos (1:2 e 1:8) permaneceram similares ($P<0.05$). Cap. 4, os mesmos foram avaliados na bioatividade: MTT, proliferação celular, ALP (1, 3 e 7d), qPCR (*alp* e *ocn*), e ARS. Todos os grupos foram viáveis e induziram ALP, ARS e expressão gênica, destacando os materiais CSCR Nb₂O₅ e Biodentine. Desta forma, os materiais apresentam potencial biológico para ser usado na endodontia. Estudos adicionais devem ser realizados, especialmente para os materiais experimentais.

Palavras chave: Genotoxicidade, Técnicas de cultura de célula, Endodontia.

ABSTRACT

Gomes-Cornélio AL. Cytotoxicity, genotoxicity and bioactivity of experimental calcium silicate based cements with different radiopacifiers, Biodentine and MTA Plus sealers. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2015.

Calcium silicate-based cements are studied as reparative materials. This study was divided into 4 chapters: In the first, cytotoxicity (MTT and apoptosis) and genotoxicity (Comet assay) were evaluated in Saos-2 for: Pure calcium silicate-based (CSC); Modified (CSCM); resin-based (CSCR1, CSCR2, CSCR3). In the Viability assay, CSC and CSCR3 (50mg/mL) showed lower cell viability. CSCR1, CSCR2, CSCR3 showed more apoptosis. Only CSC and CSCR2 were not genotoxicity in 10mg/mL ($P<0.05$). Chapter 2, CSCM and CSCR2 were associated with radiopacifiers: zirconium oxide and niobium oxide (micro and nano), bismuth oxide and calcium tungstate. MTA was used for the control of cytotoxicity and bioactivity tests. All were viable and showed similar apoptosis (1:8). Necrosis was superior ($P<0.05$). CSCM and CSCR induced alkaline phosphatase (ALP) and ARS. Chapter 3, was compared Biodentine (Septodont), MTA Plus (Avalon), CSCRs ZrO_2 and Nb_2O_5 , on cytotoxicity and genotoxicity. In MTT (1, 3 and 7 days) all were similar. In the qPCR, BAX was expressed by CSCRs (3d). MTAP and CSCR ZrO_2 expressed in 5 days. For BCL2 gene (3 and 5d) only MTAP and CSCR Nb_2O_5 (5d). In genotoxicity assay, all (1:2 and 1:8) were similar ($P<0.05$). Chapter 4, we evaluated the same materials in Saos-2 bioactivity: MTT, cell proliferation, ALP (1, 3 and 7d), qPCR (*alp* and *ocn*) and ARS. All groups were viable and induced ALP, ARS and gene expression, particularly CSCR Nb_2O_5 and Biodentine. Therefore, the biological materials has the potential to be used in endodontics. Additional studies should be conducted, especially for experimental cements. Additional studies should be conducted, especially for experimental cements.

Key- words: Genotoxicity, Culture cells technique, Endodontics.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2	PROPOSIÇÃO	17
3	CAPÍTULO 1.....	19
4	CAPÍTULO 2.....	36
5	CAPÍTULO 3.....	56
6	CAPÍTULO 4.....	72
7	DISCUSSÃO.....	92
8	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O MTA (Agregado Trióxido Mineral) é considerado o material de escolha para tratamento de perfurações e obturação retrógrada, além de outras indicações por apresentar excelente propriedade biológica⁵³, sendo considerado um material reparador. Finas partículas de silicato tricálcio, tricálcio de alumínio, óxido tricálcio, óxido de bismuto e outros óxidos minerais constituem o pó do MTA que endurece quando manipulado em água⁴⁷. No entanto, a consistência fluida e elevado tempo de presa dificultam seu uso clínico. Vários estudos demonstram que as propriedades físico-químicas e biológicas do MTA e cimento Portland (CP) são semelhantes^{17,21,26,40}. Ambos apresentam boa resposta tecidual, habilidade seladora, além de não serem citotóxicos e genotóxicos^{11,42}. Assim, o CP é sugerido como alternativa para composição de materiais reparadores.

Para aumentar a plasticidade, facilitando o manuseio do material, aditivos podem ser acrescentados ao cimento Portland (CP) ou ao MTA¹. Diferentes formulações de CP branco com formulações modificadas visam aperfeiçoar a consistência e adesão do material. Adição de aceleradores de presa, como o cloreto de cálcio- CaCl_2 ¹ e intensificadores de viscosidade são tentativas para aperfeiçoar o manuseio do MTA e derivados²⁹.

Apesar da similaridade na composição dos cimentos MTA e Portland, existe a preocupação quanto à presença de metais pesados⁴⁵, para indicação de seu uso clínico^{35,41}. A liberação do arsênio, entre outros metais pesados tem sido estudada, tanto para o MTA quanto para o CP. A avaliação do MTA branco e cinza quanto à liberação de metais pesados por meio de espectrofotometria de absorção atômica, demonstrou níveis compatíveis dos mesmos em algumas marcas comercialmente disponíveis no mercado³⁵. O cimento Portland também demonstrou liberação pequena de arsênio¹³, sendo semelhante ao MTA. Níveis de arsênio elevados para os cimentos Portland e MTA, provavelmente não seriam compatíveis com a biocompatibilidade em culturas de células e em estudos com animais^{20,24,25}. Outros achados corroboram com Duarte et al.¹³ ressaltando a presença de arsênio em quantidades mínimas^{17,18}.

CP e Cimentos de silicato de cálcio puros (CSC) não apresentam radiopacidade suficiente para observação radiográfica, sendo necessário o acréscimo de um agente radiopacificador na composição. Agentes radiopacificadores alternativos em substituição ao

óxido de bismuto presente no MTA têm sido estudados. Duarte et al.²⁷ (20), avaliaram diferentes agentes radiopacificadores (óxido de bismuto, óxido de zinco, subnitrito de bismuto, carbonato de bismuto, sulfato de bário, iodofórmio, tungstato de cálcio e óxido de zircônio) os quais demonstraram maior radiopacidade que a da dentina, com potencial para adição ao cimento Portland como agente radiopacificador. Camilleri et al.⁴ (21) também investigaram propriedades físicas do cimento Portland com diferentes agentes radiopacificadores como bismuto, ouro e prata e concluíram que todas as combinações foram similares ao MTA.

Entretanto, a possibilidade de interferência dos radiopacificadores com as propriedades físico-químicas e biocompatibilidade dos novos cimentos devem ser investigadas. Coomaraswamy et al.⁷ investigaram o efeito do radiopacificador óxido de bismuto nas propriedades físicas do CP e concluíram que a adição deste radiopacificador resultou na deterioração da estabilidade mecânica e aumento da porosidade. Isso pode alterar a longevidade do material, comparado ao CP puro. Desta maneira, agentes radiopacificadores alternativos têm sido estudados. Gomes-Cornélio et al.²⁰ avaliaram a citotoxicidade do cimento Portland associado a diferentes agentes radiopacificadores em 2 linhagens celulares: mPDL e ROS17/2.8. As associações do cimento Portland com óxido de bismuto, óxido de zircônio e tungstato de cálcio foram avaliadas por meio da viabilidade, detecção de apoptose/necrose e morfologia celular. Puderam concluir que CP com diferentes agentes radiopacificadores avaliados podem ser boas alternativas para uso em substituição ao MTA.

Cutajar et al.⁹ e Camilleri et al.³ investigaram a substituição do radiopacificador óxido de bismuto, presente no MTA, por óxido de zircônio (ZrO_2) em associação ao CP. Em relação a resistência à compressão, tempo de presa, absorção de água e solubilidade, o CP acrescido de 30% de ZrO_2 resultou numa ótima combinação quando comparado ao ProRoot MTA⁴ (21). Camilleri et al.³ avaliaram os produtos de hidratação de CP acrescido de 30% de ZrO_2 através da análise de energia dispersiva de raios-x (EDX) e observaram que houve liberação de íons cálcio nos produtos de hidratação que reagiram com fosfatos presentes nos fluidos dos tecidos simulados HBSS (Solução salina balanceada de Hank) resultando em aumento do pH e bioatividade para o cimento.

Além da possibilidade de substituição do óxido de bismuto do MTA pelo ZrO_2 , seu uso na forma nanoparticulada têm sido estudado. Liu et al.³³, demonstraram a bioatividade e citocompatibilidade de filmes de Zr nanoestruturados por meio da formação de apatita sobre a

superfície, e adesão das células tronco da medula óssea (BMSSC). Partículas de zircônia (ZrO_2) e sulfato de bário ($BaSO_4$) foram introduzidos em uma solução de monômero de metil metacrilato (MMA) com polimetil metacrilato (PMMA) durante as polimerizações no desenvolvimento de novos cimentos ósseos. Os resultados *in vitro* mostraram que a densidade dos osteoblastos foram maiores em cimentos ósseos contendo partículas de cerâmica de $BaSO_4$ em relação ao controle (cimento sem modificação). Além disso, os resultados mostraram impacto positivo com a adição de nanopartículas sobre as propriedades físicas, mecânicas e biológicas dos cimentos para aplicações ortopédicas¹⁹.

Outro elemento químico estudado para melhorar radiopacidade e propriedades biológicas de materiais é o nióbio (Nb_2O_5), o qual tem sido utilizado em ligas de titânio de implantes endósseos devido a sua excelente biocompatibilidade e resistência superior à corrosão e desintegração¹⁹. As estruturas da superfície de biomateriais com topografias de tamanho nano são dispositivos apropriados para influenciar as interações celulares, tais como a adesão dos osteoblastos. Ferramentas nanotecnológicas tais como estruturas de superfície, partículas e revestimentos finos oferecem meios promissores para proporcionar ambientes fisiológicos para células de tecido em contato com implantes¹⁶. Óxido de nióbio micro e nanoparticulado foram avaliados quanto a citotoxicidade, radiopacidade e produção de fosfatase alcalina (ALP) por Saos-2 e obtiveram bons resultados, demonstrando aumento da viabilidade com o passar dos períodos, radiopacidade dentro das normas ISO e ainda produção de ALP, o que demonstra bioatividade aos materiais³⁶.

Viapiana et al.⁴⁹ estudaram óxido de nióbio e óxido de zircônio nas formas micro e nanoparticuladas na bioatividade e composição química de cimentos à base de CP, e demonstraram que os radiopacificadores aumentarem o pH e a liberação de cálcio, com destaque o Nb_2O_5 .

Considerando a avaliação de propriedades biológicas dos materiais à base de Portland, Ribeiro et al.⁴², realizaram testes de biocompatibilidade *in vitro* do MTA e cimentos Portland cinza e branco usando o teste cometa e o teste azul de *trypan*, em células de linfomas de ratos. Os resultados do teste cometa revelaram integridade no DNA depois do tratamento com os cimentos para concentrações acima de 100 $\mu\text{g/ml}$. Os resultados mostraram que nenhum dos compostos testados foram citotóxicos. Esses resultados parecem indicar que os cimentos MTA e Portland não são genotóxicos e não induzem a morte celular. Braz et al.² avaliaram através do teste cometa a genotoxicidade em linfócitos primários humanos, depois da

exposição a alguns agentes radiopacificadores isoladamente, e puderam concluir que todos os radiopacificadores estudados (sulfato de bário, óxido de zircônia e óxido de bismuto) não induziram nenhum dano ao DNA.

O MTT (*3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide*) é um teste padrão, simples e rotineiro para avaliar a citotoxicidade de novas formulações de materiais em cultura de células³⁹. Jafarnia et al.²⁸, avaliaram a citotoxicidade do MTA, através do teste MTT, empregando vários aditivos na mistura fresca ou endurecida do material, com o intuito de melhorar as características de manuseio do MTA. Os aditivos testados incluíram água estéril, solução salina, 5% CaCl₂, Gel KY, 2% de lidocaína com 1:100.000 epinefrina (Xylocaine), e 3% de gel NaOCl. Fibroblastos de ratos (L929) foram cultivados e expostos ao MTA por 24, 48, e 72 horas. Células sem tratamento serviram como grupo controle. Para o MTA solidificado, não houve diferenças significantes quanto à viabilidade celular entre os vários aditivos por cada período testado. O grupo do cimento MTA fresco acrescido de gel 3% NaOCl, foi o que demonstrou menor viabilidade celular que todos os outros grupos. MTA branco e cinza tiveram resultados similares. Este estudo mostrou que os vários aditivos não tiveram efeito na citotoxicidade do MTA quando tomado presa.

Um novo material a base de resina epóxi e cimento Portland (EPC) foi avaliado quanto a radiopacidade e citotoxicidade por meio de ensaio MTT, comparado aos cimentos MTA e AMTA (AH Plus + MTA). Além de adequada radiopacidade, o material EPC demonstrou viabilidade frente aos fibroblastos humanos, após contato de 72 horas com os extratos obtidos de diferentes períodos³².

Gorduysus et al.²², estudaram a citotoxicidade, indução apoptótica ou necrose, e análise do ciclo celular nos fibroblastos do ligamento periodontal humano (PDL) tratados com quatro diferentes materiais endodônticos: MTA ProRoot (MTA/Denstply; Tulsa Dental, Memphis, TN), Diaket (ESPE, Seefeld, Germany), Endion (VOCO, Cuxhaven, Germany), e CYMED 8410 (NANO, Kaohsiung, Taiwan). A viabilidade dos fibroblastos (PDL) foi determinada pela análise MTT e ensaio azul de *trypan*. Expostos aos materiais por 24, 48 e 72 horas os resultados para o MTA não foram significativamente diferentes comparado com o controle. Entretanto, com Diaket, Endion, e CYMED 8410 houve citotoxicidade e redução do número de células viáveis comparado ao controle. Quanto ao ensaio de apoptose e ciclo celular, a marcação com V-FITC/PI mostrou que Diaket, Endion, e CYMED 8410 induziram

as maiores porcentagens de apoptose e/ou necrose que o controle, sugerindo assim somente biocompatibilidade para o MTA.

Além de novas formulações e adição de aceleradores e resinas nos cimentos, dois novos cimentos comerciais foram introduzidos no mercado, com indicações e características similares ao MTA: Biodentine (Septodont) e MTA Plus (Avalon). Biodentine, é um material a base de silicato de cálcio, silicato dicálcio, óxido de cálcio, carbonato de cálcio e o que difere é o radiopacificador utilizado: óxido de zircônio. O líquido do material contém cloreto de cálcio, que reduz o tempo de presa⁴³. MTA e Biodentine mostraram respostas semelhantes quando a resposta inflamatória foi avaliada, através da expressão de citocinas IL-1 e IL-6 após 3 e 24 horas de contato direto com os materiais. No teste de viabilidade Alamar blue, entre os períodos de 3, 6, 24 e 72 horas, apenas em 6 horas a viabilidade de ambos os materiais caíram, havendo uma recuperação logo em 24 horas. Ainda, imagens de microscopia eletrônica de varredura, revelaram que o Biodentine foi o único que se assemelhou com o controle (células não tratadas), com células bem espalhadas e ligadas ao substrato cobrindo quase toda a superfície do material⁸. Outro material, também a base de silicato de cálcio é o MTA Plus (MTA P). A composição do MTA P é baseada em silicatos de cálcio, com partículas finas⁵. A citotoxicidade e o tipo de morte celular por apoptose ou necrose através da citometria de fluxo foram avaliadas para os cimentos MTAP e MTA branco e cinza em contato com células tipo odontoblastóides de ratos. O teste MTT, revelou que apesar do MTA cinza mostrar melhor viabilidade que o MTA branco, todos os materiais foram biocompatíveis. Já na análise de apoptose/necrose por citometria de fluxo, MTA P resultou em maior porcentagem de células viáveis que MTA ProRoot em ambas as versões, branca e cinza, além disso, ambos os materiais revelaram maior porcentagem de apoptose que necrose, sugerindo ser a causa da citotoxicidade inicial dos materiais, mantendo assim as membranas nucleares intactas¹⁵.

Além de não demonstrarem citotoxicidade e genotoxicidade, os cimentos retrobturadores devem promover reparo dos tecidos periapicais estimulando a proliferação e atividade de células como cementoblastos e osteoblastos. Diversos estudos comprovam efeitos biológicos do MTA na reparação dos tecidos periradiculares, inclusive no aumento da expressão gênica de proteínas da matriz óssea como colágeno do tipo I (COLI), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), fosfatase alcalina (ALP) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) que desempenham funções importantes na osteogênese e odontogênese^{31,46,52}. Yan P. et al.⁵¹ estudaram além da citotoxicidade, o potencial dos cimentos MTA e Bioaggregate na

diferenciação de fibroblastos do ligamento periodontal humano através dos testes MTT e PCR sobre genes envolvidos na mineralização: colágeno tipo I (*colI*) e fosfatase alcalina (*alp*). Concluíram que os cimentos não demonstraram citotoxicidade e permitiram a diferenciação osteogênica dos fibroblastos humanos. Também demonstrando bioatividade em relação à expressão de proteínas extracelulares da matriz óssea, Tani-Ishii et al.⁴⁶ avaliaram a expressão gênica dos marcadores moleculares COLI, OCN e sialoproteína óssea (BSP) sobre o MTA em células osteoblásticas de ratos (MC3T3) e, confirmaram que além de biocompatível, o MTA induz a expressão de genes fundamentais na formação da matriz óssea.

Além de não provocarem citotoxicidade em células HDPCs (células pulpares humanas), Biodentine e MTA estimularam a produção de ALP, deposição de nódulos de mineralização e aumento de marcadores da diferenciação odontoblástica⁶. Ainda, Biodentine foi considerado biocompatível e bioativo capaz de estimular a proliferação, migração e adesão das células hDPSCs (células da polpa humana) obtidas de 3°s molares, eventos importantes para a manutenção da homeostase do tecido e regeneração de órgãos e tecidos lesionados³⁴.

Visto que ainda não há um material retrobturador e de reparo que preencha todos os requisitos fundamentais, há uma constante busca por novas formulações e cimentos, com características físico-químicas satisfatórias, mas uma adequada biocompatibilidade e bioatividade, para o sucesso clínico. Testes in vitro são uma das primeiras etapas para testar novas formulações, já que nos dão informações importantes quanto a citotoxicidade e genotoxicidade^{44,50}, contribuindo com testes futuros in vivo, e ainda permite-nos avaliar o potencial osteoindutor, e capacidade de induzir mineralização, de uma forma mais acessível, e com menor custo, e possibilidade de reprodução.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar propriedades citotóxicas, genotóxicas e bioatividade de cimentos a base de CSC branco e de suas modificações, além da adição de diferentes agentes radiopacificadores – óxido de zircônio (ZrO_2), óxido de nióbio (Nb_2O_5) nas formas micro (μ) e nanoparticuladas (η); óxido de bismuto (Bi_2O_3) e tungstato de cálcio ($CAWO_4$). Ainda, foi proposta a comparação com dois novos cimentos a base de silicato de cálcio Biodentine e MTA Plus em cultura de células osteoblásticas humanas Saos-2.

2 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

1. Avaliar a citotoxicidade e biotividade in vitro de novas formulações de cimentos a base de silicato de cálcio puros e/ou associados a diferentes agentes radiopacificadores, e comparar os de melhor resposta, aos materiais comerciais: Biodentine e MTA Plus nas células osteoblásticas humanas Saos-2.

Objetivos Específicos

1. Avaliação da viabilidade por meio do teste MTT, ensaio de apoptose/necrose pelo kit Annexin/FITC/PI, e genotoxicidade por teste Cometa de 5 grupos de cimentos a base de silicato de cálcio puros: Cimento de silicato de cálcio puro (CSC), Cimento de silicato de cálcio modificado (CSCM), Cimento de silicato de cálcio resinoso 1 (CSCR1), Cimento de silicato de cálcio resinoso 2 (CSCR2), Cimento de silicato de cálcio resinoso 3 (CSCR3) em células osteoblásticas humanas Saos-2.
2. Avaliação de dois cimentos de silicato de cálcio escolhidos em estudo anterior (CSCM e CSCR2) acrescidos de diferentes agentes radiopacificadores: Óxido de zircônio nas formas micro e nano (μZrO_2 ; ηZrO_2), óxido de nióbio nas formas micro e nano ($\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$; $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$), além do óxido de bismuto (Bi_2O_3) e tungstato de cálcio (CAWO_4) na viabilidade celular de Saos-2 pelo ensaio MTT, Apoptose/necrose por citometria de fluxo, e ensaios de fosfatase alcalina (ALP) e nódulos de mineralização por meio de vermelho de Alizarina (ARS).
3. Avaliação do cimento de silicato de cálcio resinoso acrescido de óxido de zircônio e óxido de nióbio (CSCR ZrO_2 ; CSCR Nb_2O_5) comparando-os a dois cimentos comerciais: Biodentine e MTA Plus na citotoxicidade e genotoxicidade de Saos-2 por meio dos ensaios de MTT, qPCR (genes BAX e BCL2) e teste Cometa.

4. Avaliação do cimentos de silicato de cálcio resinosos acrescido de óxido de zircônio e óxido de nióbio (CSCR ZrO_2 ; CSCR Nb_2O_5) comparando-os a dois cimentos comerciais: Biodentine e MTA Plus na bioatividade de Saos-2 por meio dos ensaios de MTT (24h), Proliferação celular, ALP, ARS e qPCR com os genes *alp* e *ocn*.

3 CAPÍTULO 1

Citotoxicidade e genotoxicidade de cimentos à base de silicato de cálcio em linhagem osteoblástica*

* Artigo submetido para publicação em periódico Clinical Oral Investigation.

Resumo

Objetivo: Além do Mineral Trióxido Agregado (MTA), biomateriais à base de silicato de cálcio são desenvolvidos. O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e apoptose/necrose das células osteoblásticas humanas (Saos-2) em cimentos a base de silicato de cálcio puro (CSC) e formulações modificadas: Cimento de silicato de cálcio modificado (CSCM); CSC resinoso 1 (CSCR1); (CSCR 2; CSCR3). *Material e Métodos:* Após manipulação, os materiais foram mantidos com meio de cultura. Após 24 horas de exposição, foram realizados testes MTT, apoptose/necrose por citometria de fluxo e teste Cometa. O Controle negativo (CT-) foi realizado com células sem tratamento e como CT+ foi usado o peróxido de hidrogênio. Os dados de MTT e apoptose foram submetidos a análise de variância e Bonferroni ($P < 0.05$) e para análise do ensaio Cometa foi usado *Kruskal-Wallis* e *Dunn* ($P < 0.05$). *Resultados:* No ensaio MTT, não houve diferença estatística entre os materiais nas concentrações de 2 e 10mg/mL. Na maior concentração (50mg/mL), CSC e CSCR3 apresentaram menor viabilidade. No ensaio de apoptose em 24 horas, CSCR1, CSCR2 e CSCR3 mostraram maior porcentagem de apoptose inicial que o controle. No teste Cometa, na concentração de 2mg/mL, os cimentos não apresentaram genotoxicidade. Em 10mg/mL, CSC e CSCR2 também não foram genotóxicos. *Conclusão:* Todos os materiais experimentais mostraram viabilidade por MTT. CSC e CSCR2 apresentaram melhor resposta na apoptose e genotoxicidade com potencial para uso como materiais reparadores. *Relevância clínica:* Novas formulações de materiais à base de silicato de cálcio mostram potencial para desenvolvimento de materiais reparadores.

Abstract

Objective: In addition to Mineral Trioxide Aggregate (MTA), other calcium silicate-based biomaterials have been developed. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity, genotoxicity on, and apoptosis/necrosis in human osteoblast cells (SAOS-2) of pure calcium silicate-based (CSC) cements and the following modified formulations: Modified calcium silicate-based (CSCM); and resin-based (CSCR1); (CSCR 2); and (CSCR3) cements.

Materials and Methods: After manipulation, the materials were kept in culture medium. After 24 hours of exposure, MTT, apoptosis/necrosis tests were performed by flow cytometry and Comet assay. The Negative Control (CT-) was performed with cells without treatment and as CT+, hydrogen peroxide was used. The data of MTT and apoptosis were submitted to analysis of variance and Bonferroni ($P < 0.05$) and for the Comet assay analysis *Kruskal-Wallis* and *Dunn* tests ($P < 0.05$) were used.

Results: In the MTT test, there was no significant difference among the materials at the concentrations of 2 and 10mg/mL. At higher concentration (50mg/mL), CSC and CSCR3 showed lower cell viability. In the apoptosis test in 24 hours, CSCR1, CSCR2 and CSCR3 showed a higher percentage of initial apoptosis than the control. By Comet assay, at the concentration of 2mg/mL, the cements showed no genotoxicity. At 10mg/mL, CSC and CSCR2 were also not genotoxic.

Conclusion: All experimental groups showed viability by MTT. CSC and CSCR2 presented the best response in apoptosis and genotoxicity, with potential for use as reparative materials.

Clinical Relevance: New formulations of calcium silicate-based materials showed potential for development for use as reparative materials.

Introdução

O MTA (Mineral Trióxido Agregado) é um material reparador não citotóxico e com excelente propriedade biológica [1]. Finas partículas de silicato tricálcio, tricálcio de alumínio, óxido tricálcio e outros óxidos minerais, além do óxido de bismuto que promove radiopacidade ao cimento, constituem o pó do MTA que toma presa quando manipulado em água [2]. Vários estudos demonstram que as propriedades físico-químicas e biológicas do MTA e cimento Portland (CP), cimento à base de silicato de cálcio (CSC) são semelhantes [3-5]. Ambos apresentam boa resposta tecidual, e não são citotóxicos e genotóxicos [6,7].

A consistência fluida e granular do MTA e o seu elevado tempo de presa dificultam o uso clínico. Para aumentar a plasticidade de cimentos de silicato de cálcio, facilitando o manuseio do material, aditivos são utilizados [8]. Diferentes formulações deste cimento com modificações por meio de aditivos e resinas são propostos para aperfeiçoar a manipulação e consistência do cimento, dando origem a cimentos de silicato de cálcio modificados (CSCMs) e cimentos de silicato de cálcio resinosos (CSCRs). A adição de 2% e 5% de cloreto de cálcio no cimento Portland mostrou melhores tempos de presa e biocompatibilidade semelhante ao MTA [9]. Uma nova proposta de material retrobturador, a base de resina epóxi e cimento Portland, denominado EPC, apresentou adequada radiopacidade, menor tempo de presa comparado ao MTA, baixa infiltração e baixa citotoxicidade nos testes MTT e morfologia celular por microscopia de fluorescência [10]. Também a base de óxidos de cálcio e silicato de cálcio, surge recentemente o cimento CEM (mistura de cálcio enriquecida), semelhante ao MTA, como excelente propriedade antibacteriana e formação de hidroxiapatita após presa. A genotoxicidade e citotoxicidade do CEM foi avaliada em comparação ao MTA, mostrando uma citotoxicidade semelhante ao MTA, e genotoxicidade adequada pelo teste Cometa [11].

As propriedades biológicas de novas formulações de cimentos devem ser estudadas para possível aplicação na área odontológica. Por serem utilizados em contato com tecidos periodontiais ou pulpares, os materiais reparadores não devem apresentar citotoxicidade ou genotoxicidade, favorecendo o processo de reparo [12,13].

O teste MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide) é um ensaio padrão para avaliação de citotoxicidade de materiais em cultura de células. O processo de morte celular relacionada ao contato com materiais é importante. A apoptose representa um mecanismo fisiológico de morte celular programada. Necrose significa morte celular por uma lesão celular excessiva, decorrente normalmente de um estímulo externo [14]. Assim, testes de genotoxicidade podem ser definidos como testes *in vitro* e *in vivo* concebidos para detectar

compostos que induzem danos genéticos, incluindo danos no DNA, mutação de genes, quebra de cromossomos, reparação de DNA alterado e transformação celular [15].

A integridade no DNA depois do tratamento de células pelos cimentos MTA e Portland para concentrações acima de 100µg/ml tem sido demonstrada [7]. Zeferino *et al.* [16] também demonstraram que os cimentos Portland e MTA acrescidos de 15% de óxido de bismuto não apresentaram cito e genotoxicidade quando expostos aos fibroblastos através do teste azul de trypan e teste cometa, respectivamente. Resultados semelhantes com o cimento Portland mostraram que nenhum desses materiais foram citotóxicos quando avaliados sozinhos ou em associação com agentes radiopacificadores [17,18].

A proposta deste estudo foi investigar através do teste Cometa se as novas formulações de cimentos a base de silicato de cálcio puro e modificados, induzem a quebra do DNA ou algum outro tipo de dano em células de osteosarcoma humano (SAOS-2). Para monitorar os efeitos citotóxicos, o ensaio MTT e ensaio de apoptose foram realizados na presença dos mesmos extratos dos cimentos avaliados em diferentes concentrações.

Material e Métodos

Cultura de células

Células osteoblásticas humanas (Saos-2 ATCC HTB-85) foram cultivadas em frascos T-75 (Corning, Union City, CA) 22 substituído meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium-Sigma/Aldrich), suplementado com 10% Soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 IU/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) até a confluência. As células foram cultivadas 3 vezes por semana a 37°C, 95% umidade, 5% CO₂. As células em fase logarítmica de crescimento foram destacadas através de uma mistura de tripsina/EDTA (0.25%)(Sigma/Aldrich) a 37°C por 3 minutos.

Preparo dos extratos

Seguimos a metodologia descrita por Gomes-Cornélio *et al.* [18]. Foram pesados 1g de cada cimento experimental e manipulados com água destilada em suas devidas proporções em placas de vidro estéreis (Tabela 1). Após a manipulação, os materiais foram novamente pesados (1g) e acondicionados em tampas de tubo Falcon de 50mL. Todos os materiais devidamente identificados e embebidos com gaze estéril umedecida foram levados ao fluxo laminar onde permaneceram por 30 minutos na luz UV para prevenção de contaminação.

Após este período, os tubos Falcon foram preenchidos com 10mL de meio de cultura DMEM com 10% FBS e as tampas encaixadas em cada tubo vertido, de modo que os materiais entrassem em contato com o meio de cultura por 3 horas em estufa à 37°C, 95% umidade e 5% CO₂. Três eluídos foram preparados após o contato dos materiais com o meio de cultura: 50mg/mL; 10mg/mL e 2mg/mL antes da exposição celular.

Ensaio MTT

O ensaio é baseado na habilidade da enzima desidrogenase mitocondrial em converter o sal que tem a cor amarela e é solúvel em água 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma Chemicals, St. Louis, MO) em compostos coloridos de formazan, cuja absorbância é proporcional a quantidade de células vivas. Foram plaqueadas 2×10^5 céls/mL em placas de cultura de 24 poços em triplicata.

Após 24 horas em cultura celular com os 3 diferentes eluídos dos cimentos e controles, (C+: peróxido de Hidrogênio 3% e C-: Controle negativo, células sem tratamento) os eluídos foram aspirados e substituídos por 900µl de D-MEM acrescidos de 5mg/mL de sal MTT, e as placas, incubadas por adicionais 3 horas em estufa a 37°C, 95% umidade e 5% CO₂. Após este período, cada poço foi lavado com 1mL de tampão fosfato (PBS 1X) e aspirados. Foi adicionado 500µl de álcool isopropílico acificado (HCl: isopropylalcohol, 0.04N) ao extrato para solubilizar os cristais de formazan. As amostras foram transferidas para placa de 96 poços em triplicata para leitura e a densidade óptica (OD) 570nm foi mensurada em leitor de microplacas automático (Elx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT).

Ensaio Cometa

Preparo das lâminas

Foram plaqueadas 2×10^6 céls/mL em placas de cultura de 24 poços em triplicata. Após 24 horas, as células foram expostas aos 3 diferentes eluídos de cada cimento experimental e controles e mantidas por adicionais 24 horas em estufa a 37°C, 95% umidade e 5% CO₂. O experimento foi baseado na técnica descrita por Sigh et al. [19]. Após o tratamento das células com os diferentes eluídos dos cimentos, 200µl de tripsina/EDTA 0.25% (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) foi adicionada a cada poço da placa durante 2 minutos para descolamento das células. Após a centrifugação (2000 rpm/3min), cada grupo de células foi resuspenso em 200µl de agarose LMP (*Lowmelting point*, Sigma/Aldrich, St Louis, MO) e transferidos para lâminas recém-preparadas com 1,5% agarose (Sigma/Aldrich,

St Louis, MO). As lâminas foram mergulhadas em solução de lise (NaCl 2,5 M, EDTA 100mM, Tris 10mM/ 1% Triton X-100, 10% DMSO) e mantidas à 4°C overnight.

Eletroforese

As lâminas já preparadas foram organizadas na cuba de eletroforese horizontal, deixando por 20min na solução de eletroforese (10mL 0,2M EDTA + 60mL 10M NaOH, pH13, e milliQ H₂O até completar 2000mL) para o relaxamento do DNA. A fonte foi regulada para 25 volts e a corrida realizada por mais 20 minutos. As lâminas foram removidas e mergulhadas na solução de neutralização (0,4M Tris pH7,5) por 15 minutos, fixadas em etanol puro e deixadas em temperatura ambiente para secagem.

Coloração e Análise

Para corar as lâminas, 80µl de Brometo de Etídio (0,02mg/mL) foi adicionado e as leituras foram imediatamente realizadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 50i-H550S) em aumento de 400x. Foram contadas 100 células/ grupo, fotografando cada campo escolhido. As imagens foram analisadas no programa Comet Score e analisadas estatisticamente através do programa Graphpad Prism 5.03. As células contadas foram analisadas comparando o mesmo grupo de materiais em relação aos controles positivo e negativo. Para o controle positivo foi utilizado o peróxido de hidrogênio (0,001M).

Ensaio de Apoptose

Foram plaqueadas 1×10^6 células SAOS-2 após o contato com os eluídos dos cimentos (10mg/mL) em placas de cultura de 24 poços. O teste foi realizado através do kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Pharmingen, San Jose, CA) no período de 24 horas. Em seguida, as células foram lavadas e coletadas dos poços das placas de cultura com reagente não enzimático (*Cell dissociation buffer*- Gibco/Life Technologies), ressuspendidas em tampão *Binding Buffer* 1X (0.1M HEPES/NaOH; 1.4M NaCl; 25mM CaCl₂ – pH: 7.4) e coradas com os marcadores para apoptose: FITC Annexin V e/ou PI (*Propidium Iodide Staining Solution*)- 50µg/mL, além dos controles não marcados e controle positivo (Camptotecina 1mM- Sigma/Aldrich). Todos os tubos *ependorfs* foram incubados por 15 minutos em ambiente escuro e adicionados 400µl de *Binding Buffer* 1X em cada amostra. As análises foram realizadas em Citômetro de fluxo (BD FACS Verse 4C) de acordo com os parâmetros do kit: Células viáveis (FITC-/ PI-); Células em apoptose inicial (FITC+/ PI-); Células em apoptose final (FITC+/ PI+) e Necrose celular (FITC+/ PI+).

Resultados

2. Ensaio de viabilidade celular- MTT

Os cimentos avaliados apresentaram biocompatibilidade, com resultados semelhantes ao controle negativo ($P<0.05$), exceto CSC 50mg/mL e CSCR3 10mg/mL conforme figura 1.

3. Ensaio Cometa

Todos os CSCs avaliados, com exceção do CSC puro, apresentaram genotoxicidade na concentração de 50mg/mL em relação ao controle. Já na concentração de 10mg/mL, destacaram-se o CSC e CSCR2 que não apresentaram genotoxicidade quando comparados ao controle negativo. E na última concentração de 2mg/mL, todos os cimentos, exceto CSCM, foram similares ao grupo controle negativo ($P<0.05$). Figura 2.

4. Ensaio de Apoptose- coloração com Annexin-V-FITC/PI

Histogramas foram utilizados para representar a porcentagem de células osteoblásticas (Saos-2) viáveis, em estágio inicial e final de apoptose e necrose em 24 horas. Em relação a viabilidade celular, os grupos CSCR1 e CSCR2 mostraram semelhança com o controle negativo (células sem tratamento), diferente do CSCR3, onde a viabilidade foi diminuída ($P<0.05$). Os grupos CSC e CSCM apresentaram valores de viabilidade ligeiramente superiores ao controle negativo. Foi observado que na fase de apoptose inicial, todos os grupos se mostraram diferentes do controle negativo, com maiores porcentagens que este, sendo o grupo CSCR3 com a maior taxa de apoptose inicial ($P<0.05$). Na apoptose tardia e/ou necrose ocorreu o inverso, sendo o controle negativo superior aos grupos experimentais ($P<0.05$). Figura 3 (A,B,C).

Discussão

Aditivos têm sido incorporados ao cimento Portland com o intuito de melhorar suas características físico-químicas, assim como novos cimentos a base de silicato de cálcio tem sido estudados [20,21]. Deste modo, alguns cimentos de silicato de cálcio modificados e

resinosos podem apresentar potencial para uso clínico. O CSCM é um cimento de silicato de cálcio modificado, que contém agregados minerais, aditivos e pigmentos. Ainda, os cimentos de silicato de cálcio resinosos (CSCRs) apresentam na composição além de agregados minerais, aditivos e pigmentos, componentes resinosos com a tentativa de melhorar a manipulação e tempo de presa. Porém, a adição de compostos nos cimentos, podem interferir e/ou prejudicar suas propriedades biológicas e bioatividade [9].

A linhagem imortalizada de células osteoblásticas foi usada neste estudo pela sua capacidade de reprodutibilidade, sendo escolhida para ensaios *in vitro* para novos materiais endodônticos e retrobturadores devido a sua relação com o processo de reparo ósseo nos tecidos [22-24]. Modareszadeh et al. [25] avaliaram a citotoxicidade e bioatividade do material biocerâmico Endosequence (Brasseler USA, Savannah GA) em células osteoblásticas humanas (SAOS-2) relatando a importância dessa célula no processo de mineralização e reparo. Gandolfi et al. [26] confirmam que cimentos a base de silicato de cálcio e MTA são bons substratos para o crescimento de osteoblastos e induzem a proliferação celular mesmo quando utilizado cimentos frescos, como realizado no presente estudo.

Os resultados obtidos, demonstram que os cimentos à base de silicato de cálcio não apresentaram citotoxicidade, quando comparados ao controle positivo (peróxido de hidrogênio 3%) e ficaram muito próximos ao controle negativo (células sem tratamento), principalmente nas concentrações de 10 e 2mg/mL. Resultados favoráveis para os cimentos a base de silicato de cálcio puros e/ou modificados associados ou não a agentes radiopacificadores têm sido observados [18,27,28]. Todavia, o ensaio MTT pode mostrar resultado falso-positivo [29], sendo importante a realização de outros testes de citotoxicidade.

Alguns estudos já demonstraram que o MTA não induz apoptose e/ou necrose de forma significativa em linhagens celulares distintas [30,31]. O experimento de citometria de fluxo utilizando o kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Pharmingen, San Jose, CA), analisou: células intactas; células em apoptose inicial, onde o FITC se liga a fosfatidil serina (componente da membrana celular) que se encontra invertida em células neste estágio; células em apoptose final e necrose, onde além da ligação positiva do FITC, o PI (Iodeto de propídio) se liga ao material genético da célula, já que a membrana foi totalmente lesada neste estágio de morte celular, permitindo a entrada do marcador. Gorduysus et al. [31] utilizaram a mesma metodologia para avaliar o tipo de morte celular em diferentes materiais endodônticos em fibroblastos humanos. MTA se comportou de forma muito semelhante ao controle com altas porcentagens de células viáveis, porém os materiais testados (Diaket,

Endion e CYMED 8410), induziram altas porcentagens de apoptose e necrose comparados ao controle.

Os cimentos CSCR1 e CSCR2 foram semelhantes ao controle em relação a viabilidade celular, diferente do CSCR3, com menor porcentagem de viabilidade celular ($P < 0.05$). Os grupos CSC e CSCM apresentaram valores de viabilidade superiores ao controle negativo ($P < 0.05$). Na fase de apoptose inicial, todos os grupos se mostraram estatisticamente diferentes do controle negativo. Já na apoptose tardia e necrose ocorreu o inverso, sendo o controle negativo superior aos grupos experimentais ($P < 0.05$). Sabendo que o estresse do retículo endoplasmático causado por excesso de íons Ca^{+2} pode levar a apoptose [32], esta seria uma das explicações dos grupos tratados com diferentes cimentos a base de silicato de cálcio ter aumentado o processo de apoptose inicial de forma significativa. Eid et al. [33] também acharam maior porcentagem de apoptose nos materiais a base de silicato de cálcio MTA Plus e MTA Angelus sugerindo que os sítios iniciais de danos irreversíveis por agentes citotóxicos são extracelulares, enquanto que as membranas nucleares dessas células ainda permanecem intactas.

O teste Cometa sugere a presença de danos no DNA, quebra de cromossomos, reparação de DNA alterado e transformação celular [17]. Entre os vários parâmetros calculados por este método, um dos indicadores de danos no DNA mais utilizados é o comprimento da cauda do cometa, que é uma medida virtual calculada pelo sistema de análise de imagem computadorizada considerando tanto a duração de migração do DNA na cauda do cometa e a intensidade da cauda [34].

Os resultados deste estudo revelaram que na concentração de 10 mg/mL, os cimentos CSC e CSCR2 se destacaram, já que não apresentaram genotoxicidade quando comparados ao controle negativo. Estes resultados para o CSC puro corroboram com outros estudos que demonstram a biocompatibilidade do mesmo [16,17]. Os diferentes CSCs modificados apresentaram bons resultados de viabilidade celular. Ainda, os resultados de genotoxicidade observados puderam ser utilizados na seleção dos materiais que não apresentaram citotoxicidade às SAOS-2, com probabilidade de maior potencial para uso, sendo necessários estudos adicionais.

Frente a testes de citotoxicidade e genotoxicidade, e diferentes respostas entre os diferentes cimentos a base de silicato de cálcio modificados, destacamos os materiais CSC e CSCR2 com melhores resultados, sendo necessários estudos adicionais para proposta de elaboração de novos cimentos a base de silicato de cálcio.

Agradecimentos

Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- número dos processos 2011/13116-1 e 2011/18239-4.

Referências

1. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR (2013) In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA FillapexI and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J* 24:111-6.
2. Tanomaru-Filho M, Bosso R, Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru JM (2013) Radiopacity and flow of different endodontic sealers. *Acta Odontol Latinoam* 26:121-5.
3. Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH (2007) Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J* 18:3-7.
4. Antonijevic D, Medigovic I, Zrilic M, Jokic B, Vukovic Z, Todorovic L, (2014) The influence of different radiopacifying agents on the radiopacity, compressive strenght, setting time, and porosity of Portland cement. *Clin Oral Investig* 18:1597-604.
5. Holland R, Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Junior ED (2001) Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 27:281-4.
6. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T (2005) Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J* 38:604-9.
7. Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, Marques ME, Salvadori DM (2005) Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod* 31:605-7.
8. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N (2006) Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod* 32:897-900.
9. Bramante CM, Kato MM, Assis GF, Duarte MA, Bernardineli N, Moraes IG, et al. (2013) Biocompatibility and setting time of CPM-MTA and white Portland cement clinker with or without calcium sulfate. *J Appl Oral Sci* 21:32-6.
10. Lee SJ (2013) Characteristics of novel root-end filling material using epoxy resin and Portland cement. *Clin Oral Investig* 17:1009-15.
11. Naghavi N, Ghoddusi J, Sadeghnia HR, Asadpour E, Asgary S (2014) Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and calcium enriched mixture cements on L929 mouse fibroblast cells. *Dent Mater J* 33:64-9.

12. De Deus QD (1975) Frequency, location, and direction of the lateral, secondary, and accessory canals. *J Endod* 1:361-6.
13. Willershausen B, Marroquin BB, Schafer D, Schulze R (2000) Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. *J Endod* 26:703-7.
14. Nikitakis NG, Sauk JJ, Papanicolaou SI (2004) The role of apoptosis in oral disease: mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutic opportunities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97:476-90.
15. Auletta A AJ (1988) Workshop on the relationship between short- term information and carcinogenicity. *Environ Mol Mutagen* 11:10.
16. Zeferino EG, Bueno CE, Oyama LM, Ribeiro DA (2010) Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *Int Endod J* 43:843-8.
17. Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM (2006) Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101:258-61.
18. Gomes Cornelio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M (2011) Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod* 2011 37:203-10.
19. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1998) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175:184-91.
20. Camilleri J (2008) The biocompatibility of modified experimental Portland cements with potential for use in dentistry. *Int Endod J* 41:1107-14.
21. Kang JY, Lee BN, Son HJ, Koh JT, Kang SS, Son HH, et al. (2013) Biocompatibility of mineral trioxide aggregate mixed with hydration accelerators. *J Endod* 39:497-500.
22. Salles LP, Gomes-Cornelio AL, Guimaraes FC, Herrera BS, Bao SN, Rossa-Junior C, et al. (2012) Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod* 38:971-6.
23. Gomes-Filho JE, Gomes AC, Watanabe S, Oliveira SH, Bernabe PF, Percinoto C (2011) Evaluation of tissue reaction, cell viability and cytokine production induced by Sealapex Plus. *J Appl Oral Sci* 19:329-36.
24. Hirschman WR, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. (2012) Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod* 38:385-8.
25. Modareszadeh MR, Di Fiore PM, Tipton DA, Salamat N (2012) Cytotoxicity and alkaline phosphatase activity evaluation of endosequence root repair material. *J Endod* 38:1101-5.

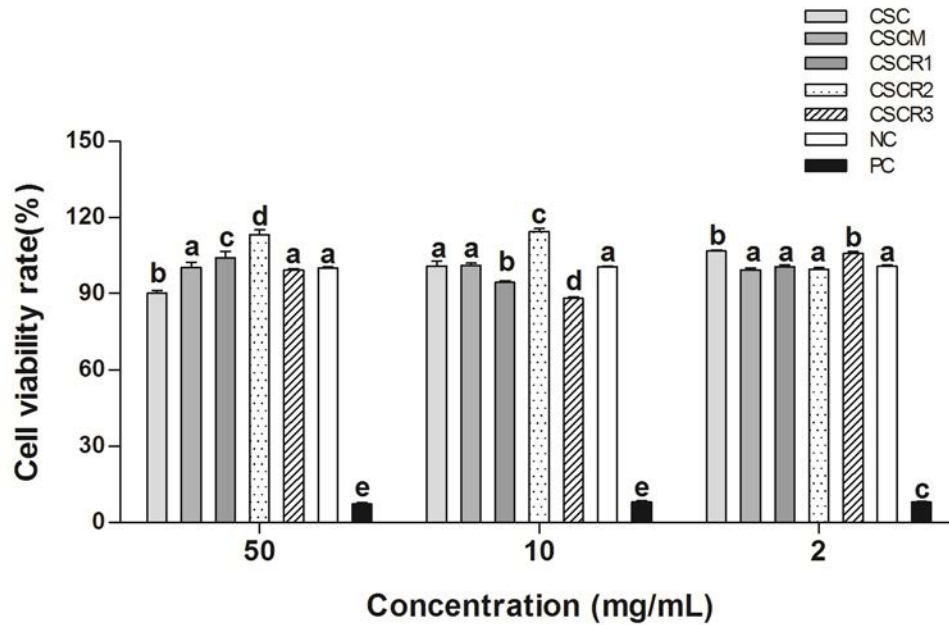
26. Gandolfi MG, Shah SN, Feng R, Prati C, Akintoye SO (2011) Biomimetic calcium-silicate cements support differentiation of human orofacial mesenchymal stem cells. *J Endod* 37:1102-8.
27. Ji DY, Wu HD, Hsieh SC, Teng NC, Chen CC, Ke ES, et al. (2011) Effects of a novel hydration accelerant on the biological and mechanical properties of white mineral trioxide aggregate. *J Endod* 37:851-5.
28. Lee SJ, Chung J, Na HS, Park EJ, Jeon HJ, Kim HC (2013) Characteristics of novel root-end filling material using epoxy resin and Portland cement. *Clin Oral Investig* 17:1009-15.
29. Berridge MV, Tan AS (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303:474-82.
30. Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nor JE (2005) Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. *J Endod* 31:387-91.
31. Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, et al. (2007) Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 33:1450-4.
32. Franco R, Cidlowski JA (2009) Apoptosis and glutathione: beyond an antioxidant. *Cell Death Differ* 16:1303-14.
33. Eid AA, Gosier JL, Primus CM, Hammond BD, Susin LF, Pashley DH, et al. (2014) In vitro biocompatibility and oxidative stress profiles of different hydraulic calcium silicate cements. *J Endod* 40:255-60.
34. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-21.

Tabela*Tabela 1*- Materiais experimentais, procedência e proporções empregadas.

Material	Fabricante
Cimento de silicato de cálcio (CSC)	CP, CPB-40 estrutural Votoran, Votorantin cimentos, Camargo Correa Cimentos S.A., Pedro Leopoldo, MG, Brasil Proporção: 1g: 0,36 mL
Cimento de silicato de cálcio modificado (CSCM)	Usina Fortaleza ICMF Ltda., Barueri, SP, Brasil -composição: agregados minerais, aditivos e pigmentos Proporção: 1 g: 0,25 mL
Cimento de silicato de cálcio resinoso 1 (CSCR1)	Usina Fortaleza ICMF Ltda., Barueri, SP, Brasil -composição: agregados minerais, resinas, aditivos e pigmentos Proporção: 1 g: 0,36 mL
Cimento de silicato de cálcio resinoso 2 (CSCR2)	Ligatex Ind. E Com. Ltda., Rio Claro, SP, Brasil -composição: agregados minerais, resinas, aditivos e pigmentos Proporção: 1 g: 0,28 mL
Cimento de silicato de cálcio resinoso 3 (CSCR3)	Cimentolit Ind. E Com. Ltda., Charqueada, SP, Brasil -composição: agregados minerais, resinas, aditivos e pigmentos Proporção: 1 g: 0,30 mL

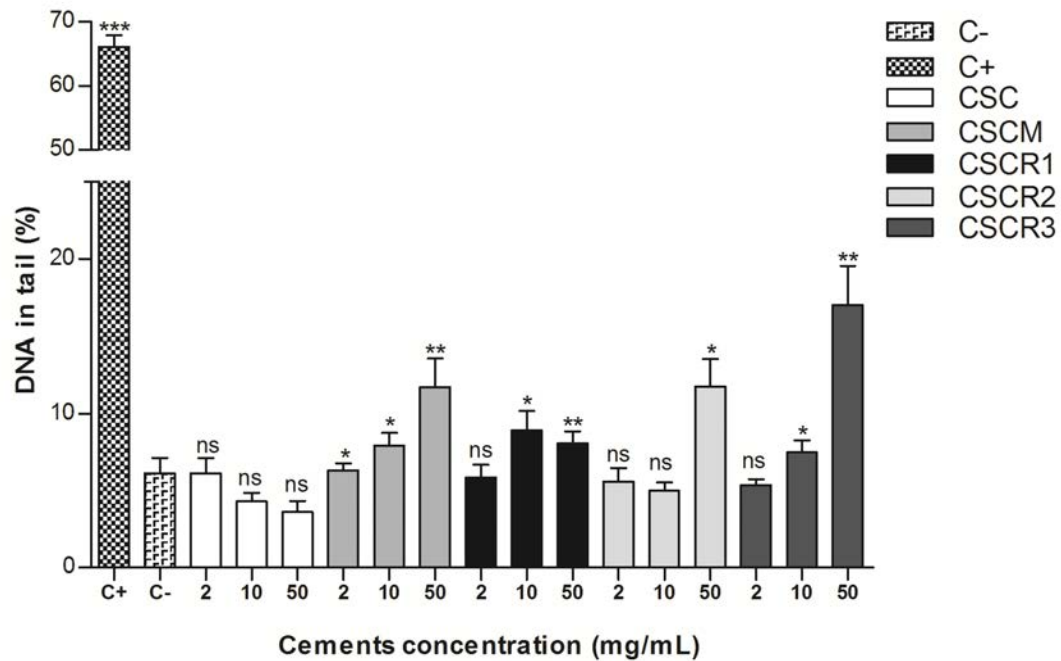
Figuras

Figura 1.



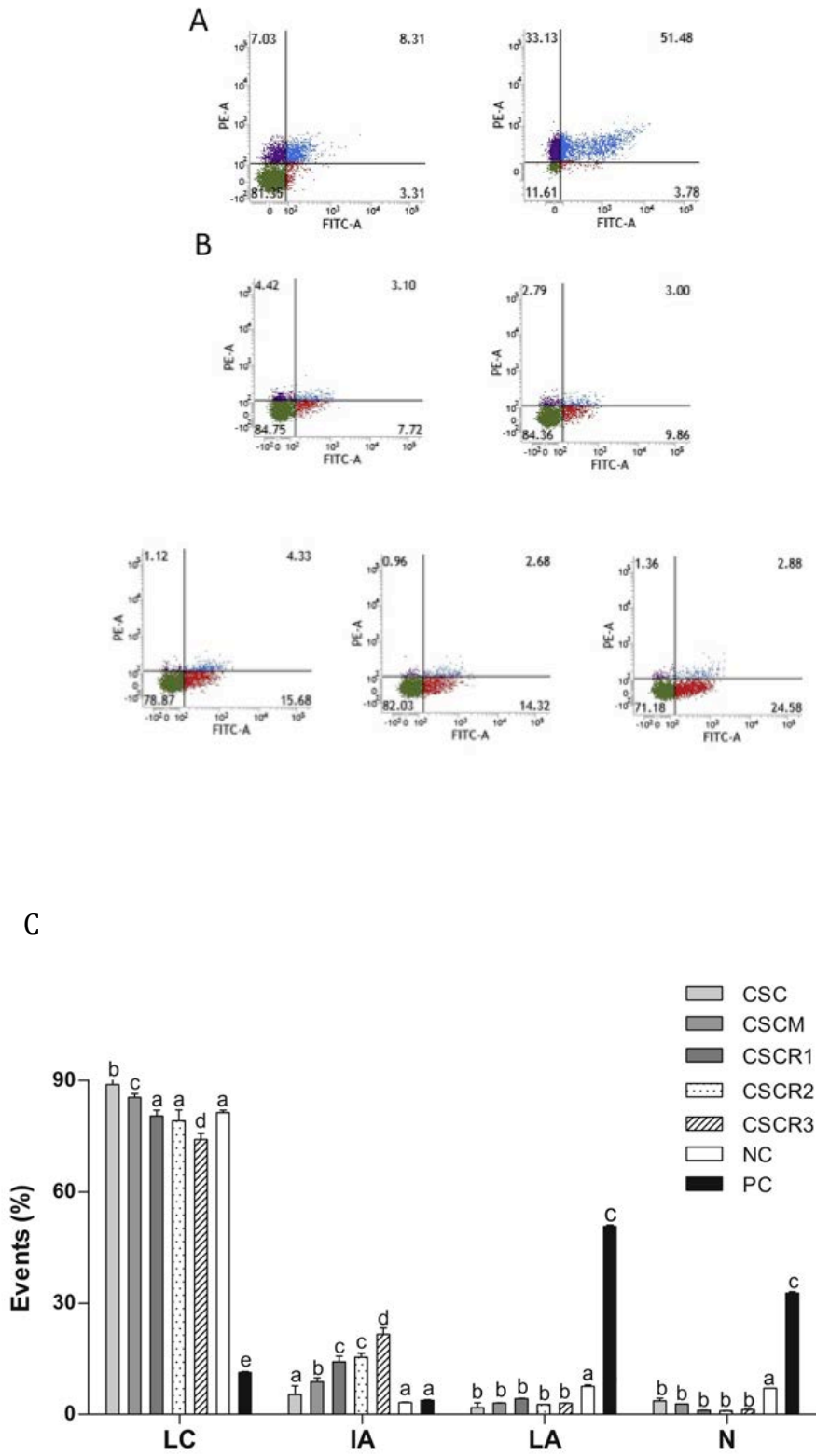
Viabilidade celular de Saos-2 após serem cultivadas com os eluídos dos cimentos nas diferentes concentrações (50mg/mL; 10mg/mL; 2mg/mL) num período de 24 horas. CSC= Cimento de silicato de cálcio puro, CSCM= Cimento de silicato de cálcio modificado, CSCR1= Cimento de silicato de cálcio resinoso 1, CSCR2= Cimento de silicato de cálcio resinoso 2, CSCR3= Cimento de silicato de cálcio resinoso 3. NC representa o controle negativo (células sem tratamento) e PC representa o controle Positivo (células expostas ao peróxido de hidrogênio 3%) por 10 min. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre si dentro da mesma concentração.

Figura 2.



Genotoxicidade representada pela % de DNA na cauda em linhagem celular Saos-2 tratadas com eluídos de 50, 10 e 2 mg/mL por 24 horas. CSC= Cimento de silicato de cálcio puro, CSCM= Cimento de silicato de cálcio modificado, CSCR1= Cimento de silicato de cálcio resinoso 1, CSCR2= Cimento de silicato de cálcio resinoso 2, CSCR3= Cimento de silicato de cálcio resinoso 3. C-: Controle negativo (Células não tratadas), C+: Controle positivo (1mM de peróxido de hidrogênio). Tratados vs C- (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Figura 3.



Análise em citômetro de fluxo de viabilidade, apoptose inicial, apoptose final e necrose de Saos-2 após a exposição aos eluídos dos cimentos na concentração de 10mg/mL por 24 horas. **(A)** Histogramas representativos do controle negativo e positivo (peróxido de hidrogênio 1mM) respectivamente **(B)** Histogramas representativos dos grupos experimentais CSC, CSCM, CSCR1, CSCR2 e CSCR3 na ordem da esquerda para direita respectivamente. Populações de células viáveis: verde (annexin V-, PI), apoptose: vermelho (annexin V+), apoptose tardia: azul e necrose: roxo (annexin V +; PI+) estão representadas no quadrante esquerdo inferior, direito inferior, direito superior e esquerdo superior respectivamente **(C)** Gráfico representativo de três experimentos independentes, onde observamos: LC: living cells (células viáveis); IA: initial apoptosis (apoptose inicial); LA: late apoptosis (apoptose tardia); N: necrose. CSC= Cimento de silicato de cálcio puro, CSCM= Cimento de silicato de cálcio modificado, CSCR1= Cimento de silicato de cálcio resinoso 1, CSCR2= Cimento de silicato de cálcio resinoso 2 e CSCR3= Cimento de silicato de cálcio resinoso 3. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes dentro de um mesmo grupo de eventos.

4 CAPÍTULO 2

Citotoxicidade, Genotoxicidade e Bioatividade de Cimentos Portlands modificados acrescidos de diferentes agentes radiopacificadores nas forma micro e nanoparticuladas *

* Artigo nas normas do periódico *Dental Materials*.

Resumo

Objetivos: Avaliar a citotoxicidade e bioatividade de novos cimentos a base de silicato de cálcio e associação com radiopacificadores micro e nanoparticulados. *Métodos:* Foram avaliados: CSCM (Cimento de Silicato de cálcio modificado) e CSCR (Cimento de silicato de cálcio resinoso) acrescidos de: óxido de zircônio (ZrO_2) e óxido de nióbio (Nb_2O_5) micro (μ) e nanoparticulados (η), óxido de bismuto (Bi_2O_3) e tungstato de cálcio ($CaWO_4$). MTA Angelus foi usado como controle. A linhagem osteoblástica humana Saos-2 foi utilizada para avaliação da viabilidade celular (MTT) após 24h de exposição, apoptose por citometria de fluxo, análise de fosfatase alcalina (ALP) após 24, 48 e 72 h e depósitos de cálcio pelo corante vermelho de Alizarina (ARS) após 21 dias. *Resultados:* MTT demonstrou citocompatibilidade similar para os materiais e controle (1:8). Em diluição 1:2, CSCR μZrO_2 , CSCR ηZrO_2 e CSCR μNb_2O_5 foram citotóxicos ($P < 0.05$). No ensaio de apoptose, todos CSCM e CSCR apresentaram viabilidade e apoptose semelhante ao controle ($P < 0.05$). Valores de necrose foram maiores que o controle, para os grupos CSCM μZrO_2 , CSCM ηZrO_2 , CSCM ηNb_2O_5 , CSCM $CaWO_4$ e MTA, e todos CSCR ($P < 0.05$). ALP demonstrou maior atividade com os radiopacificadores ZrO_2 , Nb_2O_5 e $CaWO_4$, tanto para CSCM quanto CSCR, após 72 h. Na coloração ARS, os materiais que se destacaram foram: CSCR ηNb_2O_5 , CSCR μZrO_2 , CSCR ηZrO_2 e CSCR μNb_2O_5 . *Conclusões e relevância clínica:* Os materiais CSCM e CSCR, principalmente nas associações com μZrO_2 , ηZrO_2 , μNb_2O_5 e ηNb_2O_5 podem ser considerados potenciais materiais reparadores.

Palavras-chave: citotoxicidade, bioatividade, silicato de cálcio, nanopartículas.

1. Introdução

Um material reparador ideal deve apresentar biocompatibilidade, capacidade de selamento, estimular a reparação tecidual, ter radiopacidade e fácil manipulação. Finas partículas de silicato tricálcio, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de bismuto e outros óxidos minerais fazem parte da composição do MTA (Agregado trióxido mineral), material de escolha para tratamentos de perfurações e obturações retrógradas [1]. Apesar do material se destacar por suas propriedades biológicas, a consistência fluida e elevado tempo de presa dificultam o seu uso clínico. Tentativas para melhorar a consistência e aplicabilidade clínica do MTA, são realizadas, como adição de aceleradores de presa, intensificador de viscosidade, ou ambos [2], visando aprimorar manipulação e inserção do material. No entanto, mudanças nos componentes do material, podem afetar suas propriedades biológicas, comprometendo seu potencial de estimular reparação.

O MTA é um material à base de silicato de cálcio composto por cimento Portland e agente radiopacificador óxido de bismuto (Bi_2O_3). Cimento Portland (CP) com modificações e agentes radiopacificadores alternativos são avaliados, uma vez que Bi_2O_3 demonstra afetar propriedades do CP. Camilleri et al. [3] demonstraram que o óxido de bismuto (Bi_2O_3) interfere na reação de presa do material, e a porosidade do cimento Portland é aumentada podendo afetar a longevidade do material [4]. Este radiopacificador também mostra interferir na viabilidade celular [5], e promover citotoxicidade nos períodos iniciais quando associado ao CP em células da polpa dentária humana [6].

Agentes radiopacificadores alternativos, como óxido de zircônio e óxido de nióbio [7] têm merecido destaque por não promoveram citotoxicidade frente a duas linhagens celulares testadas [8], não promover citotoxicidade em Saos-2, e ainda estimular a produção de fosfatase alcalina (ALP), importante marcador de mineralização [9]. CP demonstrou resultados similares ao ProRoot MTA quando incorporado diferentes concentrações de ZrO_2 em testes de radiopacidade, resistência à compressão, tempo de presa, absorção de água e solubilidade [10]. Também demonstrou aumento de pH, liberação de íons cálcio e bioatividade, quando foi acrescido 30% deste radiopacificador ao cimento Portland [11]. Além disso, o ZrO_2 na forma nanoparticulada, tem demonstrado melhores propriedades mecânicas e excelente biocompatibilidade [12,13]. Óxido de nióbio é outro material promissor, utilizado em ligas de titânio de implantes ósseo-integrados, devido a sua excelente biocompatibilidade, resistência a corrosão e desintegração, além da satisfatória radiopacidade [12], o que torna possível seu estudo em cimentos retrobturadores. Já foi demonstrado que a radiopacidade do

CP + 30% Nb₂O₅, foi adequada, promoveu atividade antimicrobiana semelhante ao CP puro, e também pode promover pH alcalino [14]. Viapiana et al. [7] também encontraram altos valores de pH para um cimento experimental a base de CP associado ao μNb₂O₅ e ηNb₂O₅. Além disso, foi observada liberação de íons cálcio e a deposição dos cristais de forma hexagonal para a associação CP + μNb₂O₅. Formas nanoparticuladas destes também têm sido avaliadas, principalmente por serem apropriadas para as interações celulares, tais como a adesão dos osteoblastos [15]. O radiopacificador tungstato de cálcio (CaWO₄) adicionado ao CP proporcionou pH alcalino nas primeiras 24 horas e liberação de íons cálcio [16], não sendo citotóxico frente a células de fibroblastos de camundongos e osteosarcoma de ratos [8] e também demonstrando atividade antimicrobiana [17].

O objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e bioatividade de dois cimentos a base de silicato de cálcio, um modificado (CSCM) e outro contendo resinas (CSCR), acrescido de diferentes agentes radiopacificadores: μZrO₂, ηZrO₂, μNb₂O₅, ηNb₂O₅, CaWO₄ e Bi₂O₃ em células osteoblásticas humanas Saos-2.

2. Material e métodos

2.1 Preparo dos materiais e eluídos

Os materiais, proporções e fabricantes se encontram nas tabelas 1 e 2.

1g de cada material foram pesados em balança de precisão, manipulados com água destilada nas devidas proporções em placas de vidro estéreis e acomodados no fundo de placas de cultura de 12 poços devidamente identificados e hidratados com gaze umedecida. As placas foram então levadas em estufa a 37°C *overnight* para completa presa dos materiais. Após esse período, as placas foram expostas a luz U.V. durante 30 minutos para prevenção de contaminação e 5 mL de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino, preencheram cada poço das placas onde o material foi acomodado e permaneceram por mais 24 horas em estufa (37°C, 95% umidade e 5% CO₂) para formação do eluído de cada material. Após 24 horas, esse meio foi coletado e novas diluições foram feitas para a exposição às células e ensaios (1:2;1:4;1:8).

2.2 Cultura de células

Foram utilizadas células osteoblásticas humanas (Saos-2, linha ATCC HTB-85) por meio de monocamada em frascos T-75 (Jetbiofil, Elgin IL, USA), contendo meio de

cultura D-MEM (Sigma/Aldrich, St Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS- Gibco/Life Technologies), penicilina (100 UI / mL) e estreptomicina (100 mg/ml). As células foram cultivadas duas vezes por semana a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. As células aderentes em fase logarítmica de crescimento foram removidas por uma mistura de tripsina / EDTA 0,25% (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) a 37° C durante 3 minutos.

2.3 Ensaio da viabilidade celular

Esse ensaio é baseado na habilidade da enzima desidrogenase mitocondrial em converter o sal que tem a cor amarela e é solúvel em água 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma Chemicals, St Louis, MO) em compostos coloridos de formazan, cuja absorbância é proporcional a quantidade de células vivas. Após contagem e plaqueamento das células osteoblásticas Saos-2 (7×10^4 céls/mL) em placas de 96 poços com meio de cultura D-MEM 5% SFB (Soro fetal bovino- Gibco/Invitrogen), as mesmas foram expostas durante 24 horas com os eluídos dos cimentos (200µl/cada) nas diluições de 1:2; 1:4 e 1:8 e controles (negativo: D-MEM sem SFB; positivo: Peróxido de hidrogênio 3%). Após o período de 24 horas, o meio de cultura foi trocado por 100µl de D-MEM sem SFB contendo 5 mg/mL de MTT e as células incubadas por 3 horas. Depois disso, cada poço foi lavado com 200µl de tampão fosfato (PBS 1 X) e 100 µl de álcool isopropílico acidificado (HCl: isopropylalcohol, 0.04N) foi adicionado ao extrato para solubilizar o formazan. A densidade óptica (OD) 570nm, foi mensurada em leitor de microplacas automático (ELx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT).

2.4 Ensaio de Apoptose e Necrose

Foram plaqueadas células osteoblásticas humanas Saos-2 (1×10^6 céls/mL) em placas de cultura de 24 poços. O teste foi realizado através do kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, Pharmingen, San Jose, CA). Após 24 horas de contato com o eluído dos cimentos na diluição 1:8, as células foram lavadas e coletadas dos poços das placas de cultura com um detergente não enzimático (*Cell dissociation buffer*- Gibco/Life Technologies), resuspendidas em tampão *Binding Buffer* 1X (0.1M HEPES/NaOH; 1.4M NaCl; 25mM CaCl₂ – pH: 7.4) e coradas com os marcadores para apoptose: FITC Annexin V e/ou PI (*Propidium Iodide Staining Solution*- 50 µg/mL), além dos controles não marcados e controle positivo (Peróxido de Hidrogênio 3%). As mesmas foram incubadas por 15 minutos fora da luz e adicionados mais 400 µl de *Binding Buffer* 1X em cada amostra. Os resultados e as análises foram realizados em Citômetro de fluxo (BD FACS Verse 4C) de acordo com os

parâmetros do kit: Células viáveis (FITC-/ PI-); Células em apoptose inicial (FITC+/ PI-); Células em apoptose final (FITC+/ PI+); Necrose celular.

2.5 Atividade de Fosfatase Alcalina

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada através do kit comercial da Labtest (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). O princípio da metodologia está na hidrólise da timolftaleína monofosfato pela fosfatase alcalina produzida pelas células, que deverá liberar a timolftaleína de cor azul em meio alcalino, sendo a intensidade de cor diretamente proporcional à atividade enzimática. Após 24 horas da contagem e incubação das células (7×10^4) em placas de 96 poços, houve a exposição das mesmas com os diferentes eluídos de cimentos retrobturadores já previamente preparados nas diluições de 1:4 e 1:8, durante o período de 24, 48 e 72h. Após cada período experimental, o meio de cultura foi removido e a monocamada de células foi lavada com 200µl de PBS 1X. Em seguida, foi acrescentado 200µl de uma solução de Lauril sulfato de sódio/água destilada 1% (Sigma/Aldrich) a cada poço das placas de cultura de células. Após 30 min a temperatura ambiente, 12,5 µl dessas amostras foram transferidas para tubos eppendorf contendo o substrato e o tampão da enzima, conforme o procedimento padrão do KIT. Os eppendorfs foram mantidos em banho maria a 37°C durante 10 min e 500 µl do reagente de cor foram adicionados. As amostras foram então, passadas para uma placa de 96 poços para leitura em leitor de microplacas automático (ELx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT). A absorbância foi medida a 590nm .

A quantificação da enzima foi dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Fosfatase Alcalina (U/L)} = \text{Abs da amostra/Abs padrão} \times 45.$$

2.6 Vermelho de Alizarina

Vermelho de alizarina, pode ser usado para identificar o depósito de cálcio em cultura de células. O cálcio forma um complexo vermelho de alizarina S em um processo de quelação. Com intuito de avaliar a quantidade de cálcio depositado por diferentes materiais retrobturadores a base de cimento de silicato de cálcio, células osteoblásticas Saos-2 foram contadas e plaqueadas (1×10^4) em placas de cultura de 12 poços. Durante 21 dias, o meio de cultura DMEM osteogênico (DMEM 10% SFB; 100 IU/mL penicilina; 100 mg/mL estreptomicina; 0.023 g/mL β-glicerolfosfato; 0.055 mg/mL ácido ascórbico – Sigma Chemicals St Louis MO) com o eluídos dos materiais na diluição 1:8 (previamente preparados) foi sendo renovado a cada 2 dias, totalizando 21 dias em contato com os eluídos dos cimentos. O meio então, foi aspirado, 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 então lavadas duas vezes com água destilada anteriormente a adição de 1 mL 40mM Alizarin Red S (2%, pH 4.1). As células foram incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos. Após a aspiração do corante, os poços foram lavados 3 vezes com 1mL de água destilada/poço cuidadosamente por 5 minutos. As placas foram então deixadas anguladas por 2 minutos, para facilitar a remoção do excesso de água e imediatamente analisadas em microscópio invertido em aumento de 40 X (Axiovert 100, Carl Zeiss, Jena, Germany) e fotografadas (Canon EOS-1D, Canon Inc, Tokyo, Japan). As imagens processadas foram analisadas no programa UTHSCSA Image Tool for Windows version 3.0 (San Antonio, TX, USA) em relação a área corada.

2.7 Análise Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos em três tempos independentes e os dados foram apresentados na forma de média e desvio padrão da média. Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software In., San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados dos ensaios de MTT e da atividade da fosfatase alcalina foram analisados empregando two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Comparações dos resultados dos ensaios de necrose e apoptose e do vermelho de alizarina foram feitas por one-way ANOVA e pós teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

3. Resultados

3.1 Ensaio de viabilidade celular

Os cimentos do grupo CSCM, foram estatisticamente semelhantes ao controle negativo nas diluições de 1:2 e 1:4. Na diluição de 1:8, também foram semelhantes, com exceção dos grupos CSCM $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$, CSCM Bi_2O_3 e CSCM CaWO_4 , que aumentaram a viabilidade de Saos-2 ($P < 0.05$). Todos os materiais do grupo CSCR, na diluição de 1:2, foram citotóxicos frente ao controle, exceto os grupos CSCR CaWO_4 e MTA. Na diluição 1:4, todos se assemelharam ao controle, com exceção do CSCR μZrO_2 , e na diluição 1:8 todos os grupos se mostraram estatisticamente semelhantes ao controle ($P < 0.05$), com exceção do CSCR CaWO_4 , que aumentou a viabilidade de Saos-2, em comparação com o controle. Figura 1 (A,B).

3.2 Ensaio de apoptose e necrose

Todos os cimentos à base de silicato de cálcio modificado apresentaram viabilidade celular e tiveram um percentual de células viáveis semelhante ao grupo controle negativo e MTA, com exceção dos grupos CSCM μZrO_2 , ηZrO_2 e $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$ ($P < 0.05$). Todos os CSCMs apresentaram apoptose inicial semelhante ao controle negativo, exceto MTA que obteve menores valores que este. Na apoptose tardia, houve diferença para os grupos CSCM ηZrO_2 e $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$. Os grupos CSCM μZrO_2 , ηZrO_2 , e $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$, além do MTA demonstraram os maiores valores de necrose, quando comparados ao controle negativo ($P < 0.05$). Os materiais do grupo CSCR apresentaram alto percentual de células viáveis semelhante ao controle negativo e ao MTA ($P < 0.05$), com exceção dos materiais CSCR μZrO_2 e ηZrO_2 . Todos os cimentos do grupo CSCR apresentaram apoptose celular em percentual inferior ao controle negativo ($P < 0.05$), enquanto que a necrose de todos os grupos testados foi superior ao controle negativo ($P < 0.05$). Fig 2 e 3.

3.3 Atividade de fosfatase alcalina

Houve atividade de ALP em todos os períodos avaliados, sendo a maior atividade para os radiopacificadores ZrO_2 , Nb_2O_5 e CaWO_4 , tanto para CSCM quanto CSCR, no período de 72 horas, na diluição 1:8, sem diferença estatística com os demais grupos. Figuras 4 (A,B,C,D,E,F).

3.4 Vermelho de Alizarina

A figura 5A mostra os grupos CSCM, onde CSCM μZrO_2 , ηZrO_2 se mostraram semelhantes ao CT (Controle) e MTA, embora, os nódulos parecem ser menos intensos. CSCM $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$ e $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$, produziram poucos nódulos e foram semelhantes entre si, e diferentes do CT. CSCM Bi_2O_3 e CaWO_4 , produziram menos nódulos ainda, sendo semelhantes entre si e diferentes de todos os grupos ($P < 0.05$). A figura 5B mostra os grupos de CSCR, onde CSCR μZrO_2 , ηZrO_2 e $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$, foram semelhantes ao MTA, e diferentes do CT. O grupo CSCR $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$ se assemelhou ao CT, e CSCR Bi_2O_3 e CaWO_4 produziram muitos poucos nódulos, e foram estatisticamente semelhantes entre si, porém diferentes dos demais grupos ($P < 0.05$).

4. Discussão

Células osteoblásticas (Saos-2) têm sido utilizadas em ensaios *in vitro* para novos materiais endodônticos e reparadores [9,18]. Os cimentos MTA e Portland não apresentam citotoxicidade ou genotoxicidade [19]. No entanto, formulações modificadas de cimentos à base de silicato de cálcio devem ser avaliadas, assim como sua associação à agentes radiopacificadores. O presente estudo mostra que todos os cimentos Portland modificados demonstram viabilidade celular. Também os materiais à base de CSCM na menor concentração (1:8) apresentaram melhores resultados em relação aos materiais CSCR na mesma concentração. A adição de resina ao cimento puro pode estar relacionada à menor viabilidade. Os radiopacificadores ZrO_2 , Bi_2O_3 e $CaWO_4$ demonstraram ser biocompatíveis quando associados com o cimento CP, não alterando a morfologia das células mPDL e ROS, mantendo a viabilidade destas [8]. Mestieri et al. [9] encontraram citotoxicidade para PC + Nb_2O_5 em 24 horas, porém utilizaram eluídos frescos e maiores concentrações dos materiais, sendo a viabilidade celular aumentada com o passar do tempo.

Todavia, alguns estudos mostram que o ensaio MTT não é tão sensível, e que a redução do sal pode ser catalisada por enzimas não mitocondriais, como por exemplo, enzimas presentes no retículo endoplasmático, podendo mostrar um resultado falso-positivo [20], sendo assim outros testes de citotoxicidade e/ou viabilidade são importantes para complementação da metodologia e comparação do comportamento frente aos novos materiais.

A maioria dos materiais retrobturadores pode diminuir o crescimento de vários tipos de células [21,22], mas o mecanismo exato ainda é pouco conhecido. O crescimento celular é estritamente regulado por progressão do ciclo celular, e a perturbação deste ciclo por agentes tóxicos normalmente levam à inibição do crescimento, citotoxicidade, e mesmo a apoptose [23]. Além do estudo de viabilidade celular por MTT, o eluído dos cimentos na diluição 1:8 foram avaliados pelo kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection I* (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA) no período de 24 horas, podendo assim, detectar: Células viáveis (FITC- / PI-); Células em apoptose inicial (FITC+ / PI-); Células em apoptose final (FITC+ / PI+) e Necrose celular. Os achados deste estudo apontam que em geral, todos os CSCMs e CSCRs demonstraram viabilidade celular com percentual de células viáveis semelhante ao grupo controle negativo. As avaliações com CSCM apresentaram percentual de apoptose inicial e final semelhante ao controle negativo, enquanto que os valores de necrose foram maiores principalmente para os grupos CSCM (μZrO_2 , ηZrO_2 e μNb_2O_5) semelhantes ao MTA. Já para os CSCR, todos os grupos foram similares ao controle em termos de

viabilidade, com exceção do CSCR μZrO_2 e CSCR ηZrO_2 . Em relação a apoptose inicial, todos os grupos foram estatisticamente inferiores ao controle, e na apoptose tardia, foram similares com exceção do CSCR Bi_2O_3 que foi inferior ao controle ($P < 0.05$). Maiores valores de necrose foram observados para todos os grupos, inclusive o MTA. Alto índice de necrose pode estar associados ao elevado pH que estes materiais proporcionam, levando a uma indução de estresse bioquímico e ruptura da membrana [24]. Gomes-Cornélio et al. [8] observaram, por meio de teste de apoptose/necrose em microscopia de fluorescência, que as células mPDL e ROS após exposição ao CP associado aos radiopacificadores ZrO_2 , Bi_2O_3 ou CaWO_4 apresentaram alterações morfológicas semelhantes ao controle negativo.

A capacidade de biomateriais para promover a mineralização pode ser avaliada por meio da expressão de marcadores bioquímicos celulares diferentes. A fosfatase alcalina (ALP) é um dos marcadores bioquímicos mais frequentemente utilizados na atividade osteoblástica [25]. ALP libera íons livres de fosfato, os quais por sua vez reagem com os íons cálcio, formando precipitado de fosfato de cálcio, uma unidade molecular da hidroxiapatita [26]. ALP está presente nos fragmentos de membrana plasmática de osteoblastos, e a sua presença também indica diferenciação celular após injúria [27]. No presente estudo, os materiais avaliados promoveram liberação da ALP, com destaque a menor diluição 1:8 e no tempo de 72 horas, corroborando com Salles et al. [18], que avaliaram um cimento a base de MTA, encontrando valores de expressão de ALP maiores em 72h e 7 dias. Ainda, frente aos radiopacificadores, a associação que menos favoreceu a liberação da proteína ALP foi ZrO_2 , em 24 e 48h, porém houve uma recuperação em 72 horas. A associação de ambos os CSC ao Nb_2O_5 , favoreceu a liberação de ALP, com pico da proteína em 72 horas. Resultados semelhantes foram encontrados com a mesma associação, porém com o CP puro [9]. A bioatividade do nióbio associado a um cimento tipo ionômero fluoretado foi avaliado sobre células mesenquimais humanas (hMSCs) e observaram que houve excelente adesão, proliferação e diferenciação destas, resultando em liberação de ALP, principalmente em 8 dias, nódulos de mineralização também puderam ser observados e confirmados na microscopia eletrônica de varredura [28].

A deposição de nódulos de mineralização por meio do corante vermelho de Alizarina também foi avaliada frente aos materiais em células osteoblásticas após 21 dias com o meio osteogênico. Dentre os materiais com CSCM, houve destaque para os CSCM μZrO_2 , CSCM ηZrO_2 , seguidos do CSCM $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$ e CSCM $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$. Para os grupos do CSCR, foi observado maior depósito de mineralização e com mais intensidade, com destaque para CSCR μZrO_2 , CSCR $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$ e CSCR $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$. Já foi demonstrado que ZrO_2 libera íons cálcio na

hidratação que reagem com os fosfatos presentes nos fluidos simulados, resultando em aumento de pH e bioatividade para o mesmo, características que favorecem seu uso como material retrobturador [11]. Ainda, nanopartículas de ZrO_2 na proporção de 20% com o CP, mostrou acelerar o tempo de presa do material, diminuir a solubilidade das fases de silicato de cálcio e ainda atividade antimicrobiana semelhante ao CP puro, porém melhores resultados contra *P. aeruginosa* [29]. Já Viapiana *et al.* [7] não encontraram diferenças nas características químicas e bioatividade entre micro e nanopartículas de ZrO_2 e Nb_2O_5 . No presente estudo, também não houve diferenças entre os tamanhos das partículas dos radiopacificadores, ambos mostraram viabilidade e bioatividade para Saos-2.

Zanini *et al.* [30] confirmaram que um material a base de silicato de cálcio (Biodentine) que apresenta óxido de zircônio como radiopacificador, induziu células da polpa a diferenciarem em odontoblastóides estimulando a mineralização através da expressão de genes como fosfatase alcalina (ALP), Colágeno tipo 1 (COL I) e osteocalcina (OC), ainda houve depósitos minerais por meio do ensaio vermelho de Alizarina no decorrer do tempo. Outro material promissor a base de alumino-silicato de cálcio (Quick-set) formou depósitos de cálcio quando expostos a células MDPC-23 (odontoblastóides de murinos) e foi similar ao grupo MTA, mostrando ser um material bioativo [31]. O depósito de cálcio pelo vermelho de Alizarina, pode também estar associado aos fatores acumulativos do meio de cultura osteogênico e os íons liberados durante a reação de hidratação do material. Cimentos a base de silicato de cálcio, como o MTA, demonstram liberar cálcio durante a reação de hidratação do material, e induzir pH alcalino, favorecendo assim, a atividade de ALP e nódulos de ARS [32].

As metodologias propostas neste estudo são modelos *in vitro*, reproduzíveis para avaliar propriedades citotóxicas e bioatividade de materiais. Os resultados obtidos permitiram a comparação dos cimentos experimentais em relação ao MTA Angelus, e poderão contribuir para o desenvolvimento de novos materiais reparadores.

6. Referências

- [1] Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex(R) and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J*, 2013; 24:111-6.
- [2] Ji DY, Wu HD, Hsieh SC, Teng NC, Chen CC, Ke ES, et al. Effects of a novel hydration accelerant on the biological and mechanical properties of white mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 2011; 37:851-5.
- [3] Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*, 2007; 40:462-70.
- [4] Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod*, 2007; 33:295-8.
- [5] Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*, 2004; 37:699-704.
- [6] Min KS, Chang HS, Bae JM, Park SH, Hong CU, Kim EC. The induction of heme oxygenase-1 modulates bismuth oxide-induced cytotoxicity in human dental pulp cells. *J Endod*, 2007; 33:1342-6.
- [7] 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.
- [8] Gomes Cornelio 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.
- [9] Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornelio 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.
- [10] 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.
- [11] Camilleri J, Cutajar 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.
- [12] Gillani R, Ercan B, Qiao A, Webster TJ. Nanofunctionalized zirconia and barium sulfate particles as bone cement additives. *Int J Nanomedicine*, 2010; 5:1-11.

- [13] Saldana L, Mendez-Vilas A, Jiang L, Multigner M, Gonzalez-Carrasco JL, Perez-Prado MT, et al. In vitro biocompatibility of an ultrafine grained zirconium. *Biomaterials*, 2007; 28:4343-54.
- [14] Guerreiro Tanomaru JM, Storto I, Da Silva GF, Bosso R, Costa BC, Bernardi MI, et al. Radiopacity, pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with micro- and nanoparticles of zirconium oxide and niobium oxide. *Dent Mater J*, 2014; 33:466-70.
- [15] Eisenbarth E, Velten D, Muller M, Thull R, Breme J. Nanostructured niobium oxide coatings influence osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res A*, 2006; 79:166-75.
- [16] Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M, et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod*, 2012; 38:394-7.
- [17] Guerreiro-Tanomaru JM, Cornelio AL, Andolfatto C, Salles LP, Tanomaru-Filho M. pH and Antimicrobial Activity of Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents. *ISRN Dent*, 2012; 2012:1-5.
- [18] Salles LP, Gomes-Cornelio AL, Guimaraes 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.
- [19] De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J*, 2005; 38:604-9.
- [20] Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 1993; 303:474-82.
- [21] Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. *Int Endod J*, 2005; 38:137-43.
- [22] Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod*, 2000; 26:288-91.
- [23] Eastman A, Rigas JR. Modulation of apoptosis signaling pathways and cell cycle regulation. *Semin Oncol*, 1999; 26(5 Suppl 16):7-16; discussion 41-2.
- [24] Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 2008; 44:205-21.
- [25] Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, Davie MW, Sharp CA. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res*, 1999; 14:1926-33.

- [26] Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. Alkaline phosphatase activity is upregulated in regenerating human periodontal cells. *J Periodontal Res*, 1999; 34:123-7.
- [27] Morris DC, Masuhara K, Takaoka K, Ono K, Anderson HC. Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. *Bone Miner*, 1992; 19:287-98.
- [28] Kushwaha M, Pan X, Holloway JA, Denry IL. Differentiation of human mesenchymal stem cells on niobium-doped fluorapatite glass-ceramics. *Dent Mater*, 2012; 28:252-60.
- [29] Li Q, Coleman NJ. Hydration kinetics, ion-release and antimicrobial properties of white Portland cement blended with zirconium oxide nanoparticles. *Dent Mater J*, 2014; 33:805-10.
- [30] 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.
- [31] Eid AA, Niu LN, Primus CM, Opperman LA, Pashley DH, Watanabe I, et al. In vitro osteogenic/dentinogenic potential of an experimental calcium aluminosilicate cement. *J Endod*, 2013; 39:1161-6.
- [32] 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.

5. Tabelas

5.1 Tabela 1- Composição dos CSCs.

Cimento de silicato de cálcio	Composição
Cimento de silicato de cálcio modificado (CSCM)	Agregados minerais, aditivos e pigmentos
Cimento de silicato de cálcio resinoso (CSCR)	Agregados minerais, resinas, aditivos e pigmentos

5.2 Tabela 2- Materiais experimentais e proporções pó/líquido.

Material	Proporção pó/líquido
MTA Branco*	Segundo o fabricante
1- CSCM** + 30% Óxido de Zircônio (ZrO_2) microparticulado (micro)****	1g - 200 μ l
2- CSCM+ 30% ZrO_2 nanoparticulado (nano)*****	1g - 360 μ l
3- CSCM + 30% Óxido de Nióbio (Nb_2O_5) micro****	1g - 340 μ l
4- CSCM + 30% Nb_2O_5 nano*****	1g - 390 μ l
5- CSCM + 20% Óxido de Bismuto (Bi_2O_3) micro****	1g - 260 μ l
6- CSCM + 30% Tungstato de cálcio ($CAWO_4$) micro*****	1g - 200 μ l
7- CSCR*** + 30% ZrO_2 micro	1g - 235 μ l
8- CSCR + 30% ZrO_2 nano	1g - 340 μ l
9- CSCR + 30% Nb_2O_5 micro	1g - 380 μ l
10- CSCR + 30% Nb_2O_5 nano	1g - 380 μ l
11- CSCR + 20% Bi_2O_3 micro	1g - 250 μ l
12- CSCR + 30% $CAWO_4$ micro	1g - 220 μ l

*MTA, Angelus, Londrina, PR, Brasil

**Cimento de silicato de cálcio modificado (CSCM), Usina Fortaleza ICMF Ltda., Barueri, SP, Brasil

*** Cimento de silicato de cálcio resinoso (CSCR), Ligatex Ind. e Com. Ltda., Rio Claro, SP, Brasil

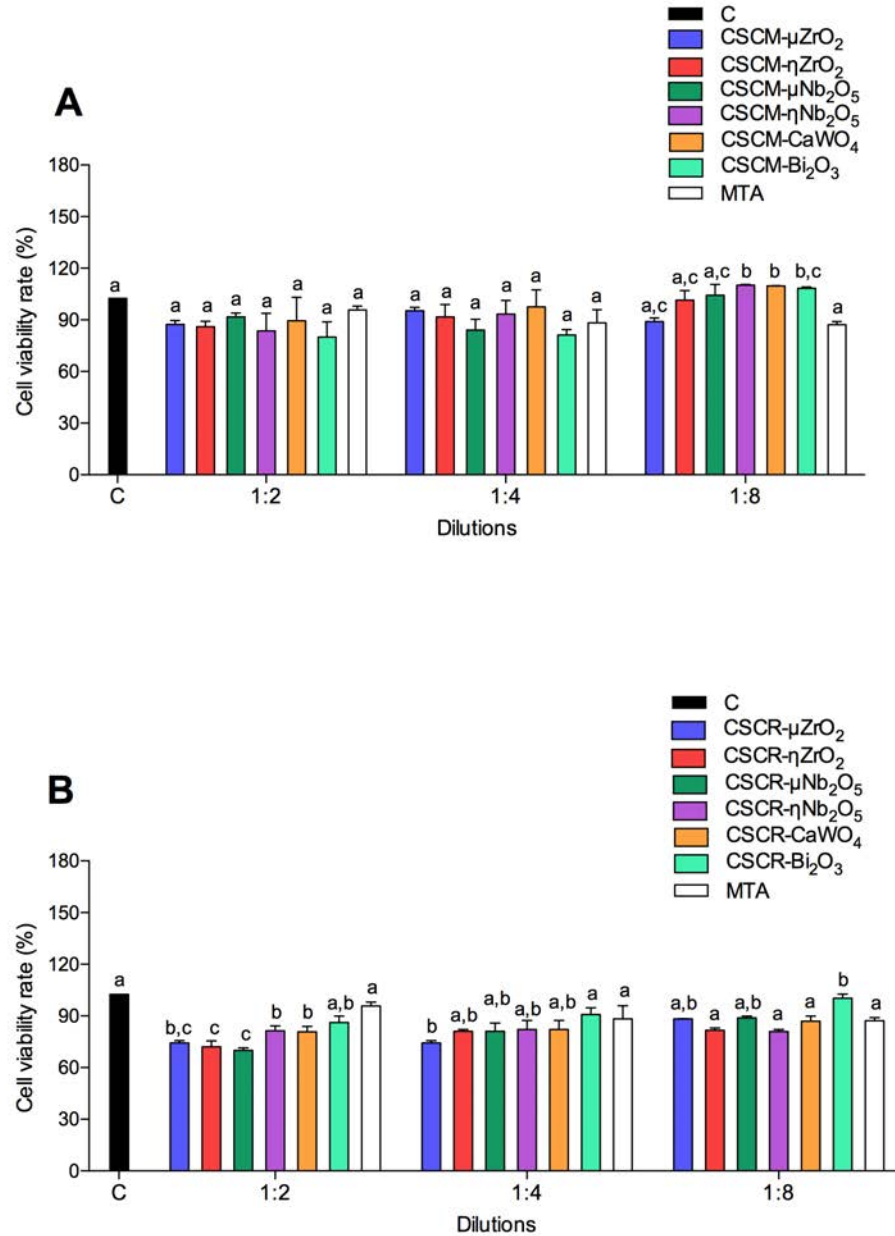
****Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil

*****Laboratório de nanotecnologia, Instituto de Física de São Carlos, SP, Brasil

*****Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA

7. Figuras

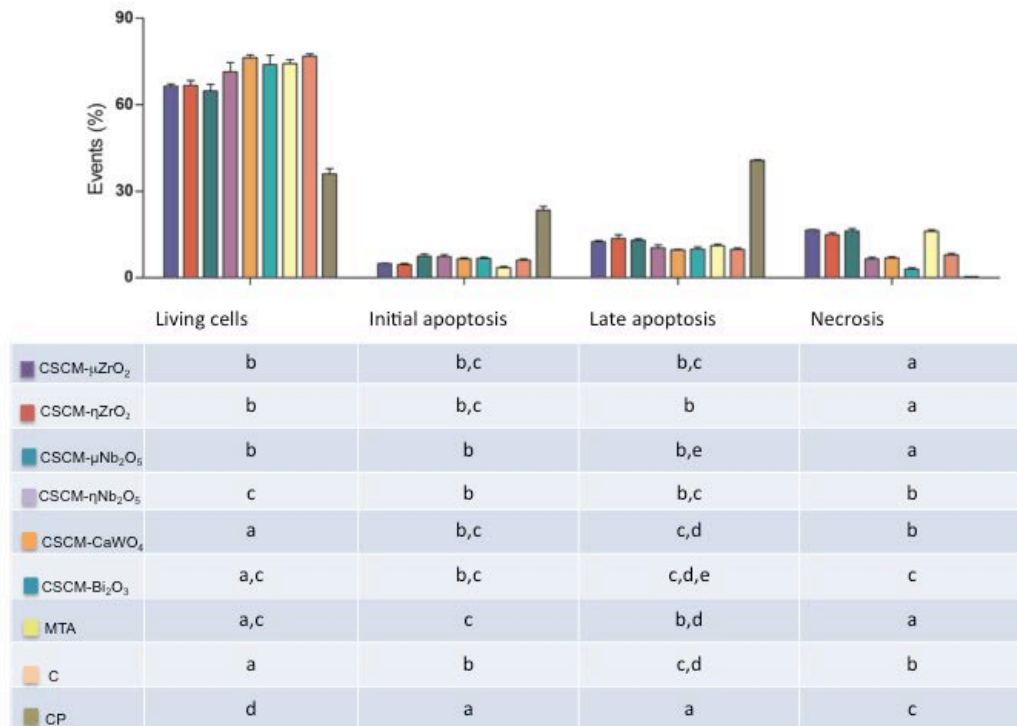
Figura 1.



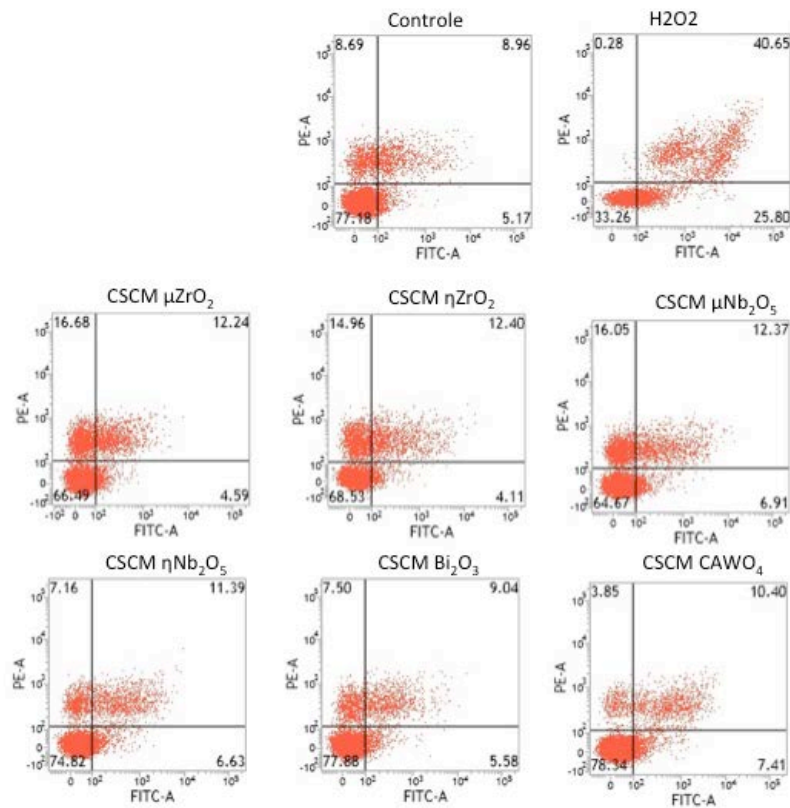
Viabilidade de Saos-2 após exposição aos eluídos dos cimentos CSCM + radiopacificadores (A) e CSCR + radiopacificadores (B) nas diluições 1:2, 1:4 e 1:8 por 24 horas. C = grupo controle, MTA = Agregado trióxido mineral. CSCM = Cimento de silicato de cálcio modificado, CSCR = Cimento de silicato de cálcio resinoso, μZrO_2 = óxido de zircônio microparticulado, ηZrO_2 = óxido de zircônio nanoparticulado, $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$ = óxido de nióbio microparticulado, $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$ = óxido de nióbio nanoparticulado, CAWO_4 = tungstato de cálcio, Bi_2O_3 = óxido de bismuto. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os grupos dentro de cada diluição e o grupo controle.

Figura 2.

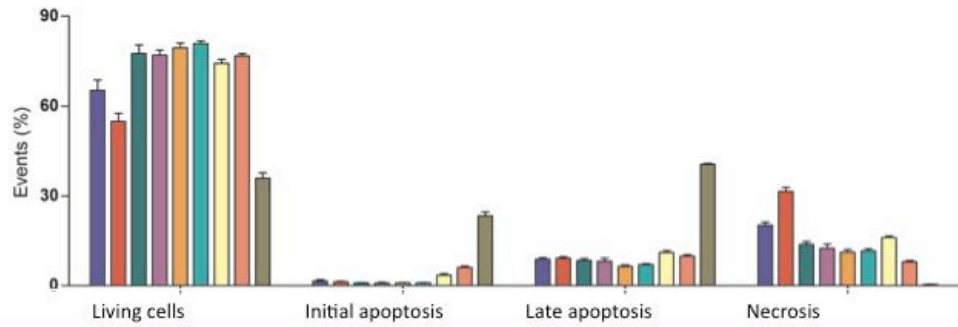
A



B

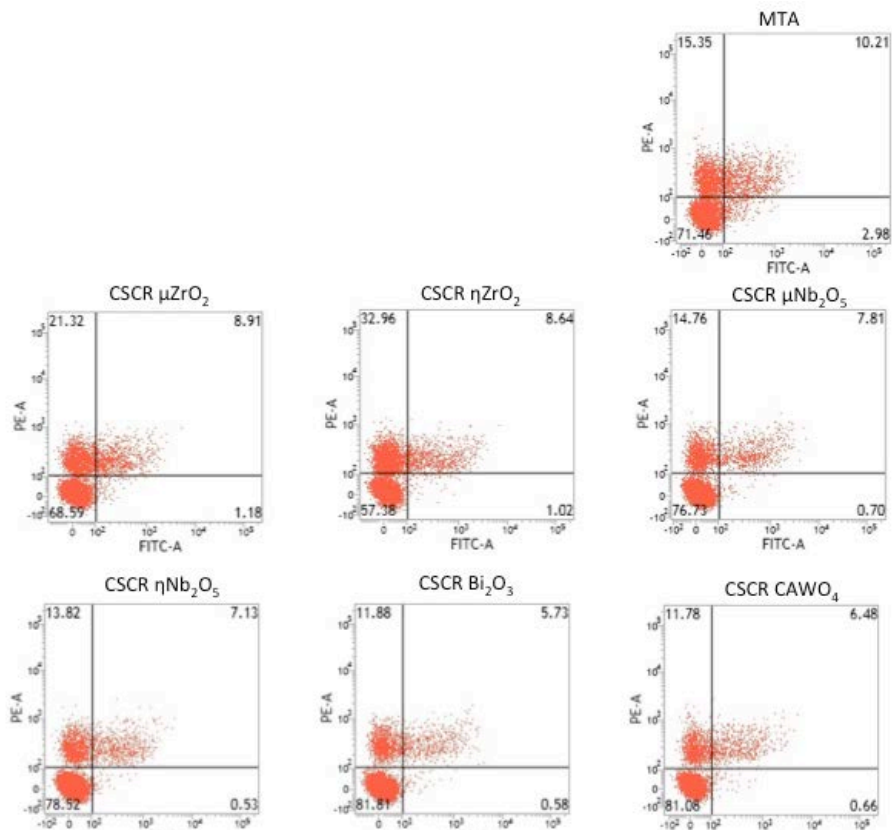


C



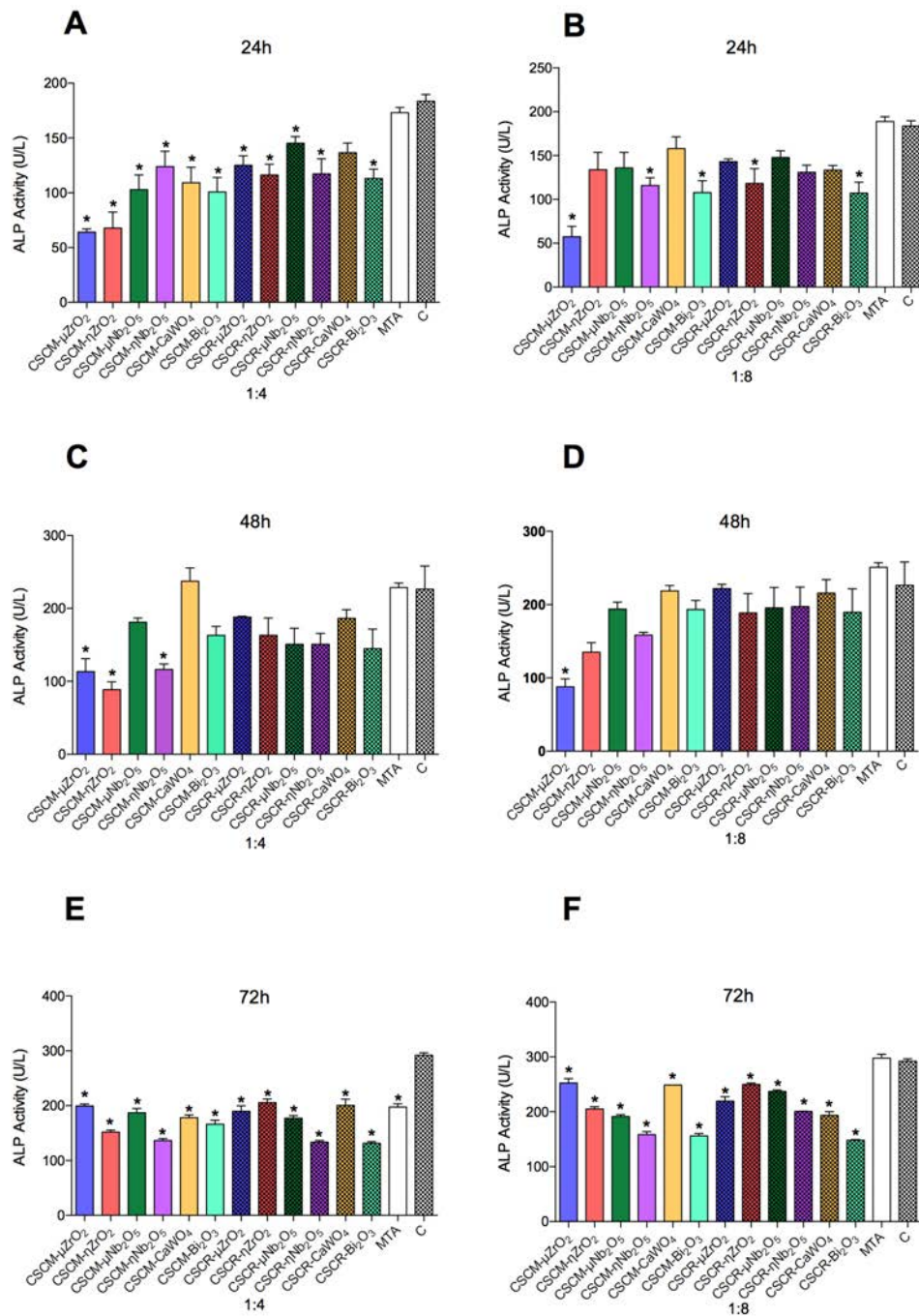
	Living cells	Initial apoptosis	Late apoptosis	Necrosis
CSCR- μ ZrO ₂	e	b	a,b,c	b
CSCR- η ZrO ₂	f	b	a,b,c	c
CSCR- μ Nb ₂ O ₅	a	b	a,b,c	d,e
CSCR- η Nb ₂ O ₅	a,c	b	a,b,c	d
CSCR-CaWO ₄	a,d	b	c	d
CSCR-Bi ₂ O ₃	d	b	a,c	d
MTA	b,c	a,b	b	e
C	a,c	a	a,b	a
CP	g	a	c	a

D



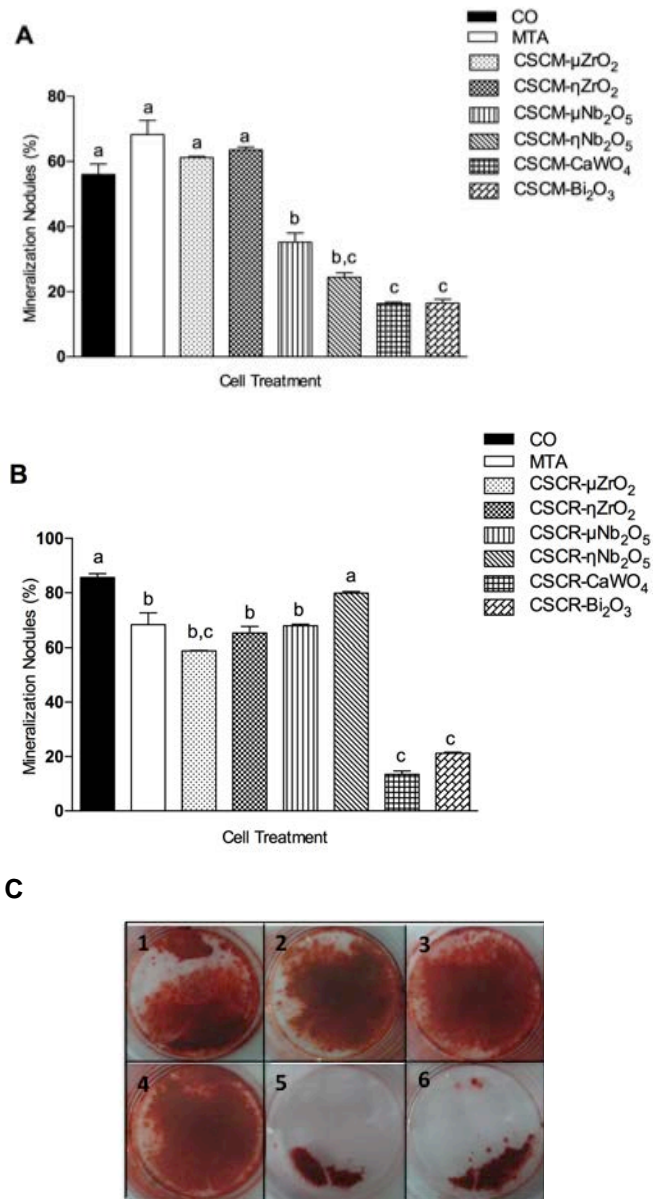
Análise em citômetro de fluxo de viabilidade, apoptose inicial, apoptose final e necrose de Saos-2 após a exposição aos eluídos dos cimentos na diluição 1:8 por 24 horas. **(A)** Materiais do grupo CSCM + radiopacificadores, **(B)** histogramas representativo dos grupos CSCM + μZrO_2 = óxido de zircônio microparticulado, ηZrO_2 = óxido de zircônio nanoparticulado, $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$ = óxido de nióbio microparticulado, $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$ = óxido de nióbio nanoparticulado, CAWO_4 = tungstato de cálcio, Bi_2O_3 = óxido de bismuto. **(C)** Materiais do grupo CSCR + radiopacificadores e **(D)** histogramas representativo dos grupos CSCR + μZrO_2 = óxido de zircônio microparticulado, ηZrO_2 = óxido de zircônio nanoparticulado, $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$ = óxido de nióbio microparticulado, $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$ = óxido de nióbio nanoparticulado, CAWO_4 = tungstato de cálcio, Bi_2O_3 = óxido de bismuto. Populações de células viáveis (annexin V-, PI-), apoptose (annexin V+), apoptose tardia e necrose (annexin V +; PI+) estão representadas no quadrante esquerdo inferior, direito inferior, direito superior e esquerdo superior respectivamente. C = controle negativo (células não expostas aos cimentos), PC = controle positivo (peróxido de hidrogênio-1mM). Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes dentro de um mesmo grupo de eventos.

Figura 3.



Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de Saos-2 após a exposição aos cimentos por 24h nas diluições de 1:4 (A) e 1:8 (B), 48h nas diluições de 1:4 (C) e 1:8 (D) e 72h nas diluições de 1:4 (E) e 1:8 (F). * = $P < 0.05$ em relação ao controle negativo. CSCM = Cimento de silicato de cálcio modificado, CSCR = Cimento de silicato de cálcio resinoso, μZrO_2 = óxido de zircônio microparticulado, ηZrO_2 = óxido de zircônio nanoparticulado, $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$ = óxido de nióbio microparticulado, $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$ = óxido de nióbio nanoparticulado, CAWO_4 = tungstato de cálcio, Bi_2O_3 = óxido de bismuto. C = controle negativo (células não expostas aos cimentos).

Figura 4.



Nódulos de mineralização de Saos-2 após a exposição aos eluídos dos cimentos na diluição de 1:8 durante 21 dias em meio osteogênico. (A) CSCM + radiopacificadores e (B) CSCR + radiopacificadores. CSCM = Cimento de silicato de cálcio modificado, CSCR = Cimento de silicato de cálcio resinoso, μZrO_2 = óxido de zircônio microparticulado, ηZrO_2 = óxido de zircônio nanoparticulado, $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$ = óxido de nióbio microparticulado, $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$ = óxido de nióbio nanoparticulado, CAWO_4 = tungstato de cálcio, Bi_2O_3 = óxido de bismuto. (C) Figura representativa dos nódulos de mineralização do grupo CSCR + radiopacificadores. 1= μZrO_2 ; 2= ηZrO_2 ; 3= $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$; 4= $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$; 5= CAWO_4 e 6 = Bi_2O_3 . CO representa o grupo controle osteogênico (células sem exposição). MTA= representa o Agregato trióxido mineral. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre si.

5 CAPÍTULO 3

Citotoxicidade e genotoxicidade do Biodentine, MTA Plus e cimento de silicato de cálcio com óxido de zircônio ou óxido de nióbio

* Artigo submetido para publicação em periódico Clinical Oral Investigation.

Resumo:

O objetivo deste estudo foi avaliar citotoxicidade e genotoxicidade por meio da viabilidade celular, expressão gênica de fatores da apoptose (BAX e BCL2) e ensaio Cometa do cimento experimental de silicato de cálcio resinoso (CSCR) acrescido dos radiopacificadores óxido de zircônio (ZrO_2) ou óxido de nióbio (Nb_2O_5) e compará-los ao Biodentine (Septodont) e MTA Plus (Avalon). A citotoxicidade foi avaliada por teste MTT em células osteoblásticas humanas Saos-2 (1, 3 e 7 dias). Foi realizada avaliação por qPCR dos genes anti e pró-apoptótico BCL2 e BAX (3 e 5 dias), e a genotoxicidade pelo ensaio Cometa após 24 horas. Os dados de MTT foram submetidos a análise de variância e Bonferroni, os de qPCR aos testes ANOVA e *Tukey* e os do teste Cometa forma analisados por *Kruskal-Wallis* e *Dunn* ($P < 0.05$). No ensaio MTT, os materiais apresentaram resposta tempo-dependente, sendo similares ao controle. Na expressão gênica, houve expressão de BAX em 3 dias para os grupos CSCR ZrO_2 e CSCR Nb_2O_5 e em 5 dias, para MTAP e CSCR ZrO_2 . Para o BCL2, em 3 dias somente MTAP mostrou elevada expressão do gene. Aos 5 dias, MTAP e CSCR Nb_2O_5 apresentaram maior expressão. Quanto a genotoxicidade, após 24 horas nenhum dos materiais induziu quebra do DNA, sendo semelhantes ao controle ($P < 0.05$). Conclui-se que os materiais à base de silicato de cálcio avaliados experimentais ou comerciais foram viáveis as Saos-2, não foram genotóxicos e apresentaram mecanismo de morte celular mais associado a apoptose.

Introdução

As excelentes propriedades biológicas e bioatividade do cimento MTA (Mineral trióxido agregado) leva ao desenvolvimento de novos materiais de silicato de cálcio [1,2], que é o principal componente deste cimento. Assim, com a perspectiva de melhorar nas propriedades de manipulação, e tempo de presa, surgem novos materiais à base de silicato de cálcio. Biodentine (Septodont, Saint Maur des Fosses, France) é um cimento composto de silicato tricálcio, silicato dicálcio, carbonato de cálcio, óxido de ferro e óxido de zircônio, e o líquido composto de cloreto de cálcio e um polímero hidrossolúvel [3]. Suas indicações são semelhantes às de MTA incluindo reparo de perfurações radiculares e obturação retrógrada [4]. A principal vantagem relatada pelo fabricante é seu reduzido tempo de presa, quando comparado ao MTA [5], e melhores propriedades químicas e de manipulação [3].

Outro material recentemente lançado no mercado à base de silicato de cálcio é o MTA Plus (Prevest Denpro limitada, Jammu, Índia, por Avalon Biomed Inc), composto por silicatos de cálcio e partículas finas [6], sendo indicado tanto para tratamentos pulpares (pulpotomia, capeamento pulpar) quanto para tratamentos reparadores endodônticos (retrobturações, perfurações, reabsorções) [7]. MTA Plus é um material bioativo com boas propriedades físico-químicas, indicado como material reparador [7].

Novas formulações de materiais à base de silicato de cálcio são desenvolvidas a partir de aditivos como resinas [8]. Ainda, agentes radiopacificadores são estudados para os materiais reparadores [9]. A adição de resina epóxi ao MTA melhora o escoamento e características de manuseio do material [10]. O tipo de resina utilizada e a composição do radiopacificador podem afetar a capacidade de liberação de íons cálcio e a sua bioatividade [11]. O óxido de bismuto, presente no MTA, tem sido relacionado com maior degradação de propriedades físico-químicas [12] e efeitos biológicos negativos [13]. Óxido de zircônio tem mostrado ser uma boa alternativa para uso como agentes radiopacificador em cimentos reparadores à base de silicato de cálcio [14]. Óxido de nióbio também é uma alternativa de radiopacificador, principalmente por sua excelente biocompatibilidade, resistência a corrosão e desintegração [15], além de ter demonstrado capacidade para promover a formação de hidroxiapatita [16].

Já foi demonstrado que Biodentine e MTA Plus não são citotóxicos frente a várias linhagens celulares [17-19], assim como Cimento Portland (CP) acrescido de Nb₂O₅ micro e nanoparticulados, frente a linhagem celular osteoblástica Saos-2 [20]. No entanto, é importante verificar o mecanismo da morte celular, assim como genotoxicidade promovida pelos materiais. Apoptose é a morte celular programada, que representa um mecanismo

fisiológico, visando eliminar células senescentes ou alteradas que são inúteis ou prejudiciais ao organismo [21]. Assim, a expressão de genes envolvidos nesse processo contribui para o conhecimento do tipo de morte celular frente aos novos materiais *in vitro*. BAX é um gene da família BCL2, que promove a apoptose. Sendo o BCL2 uma proteína antiapoptótica, que ajuda a preservar a integridade da membrana, impedindo a liberação inapropriada de proteínas da mitocôndria e Ca^{++} do retículo endoplasmático [22]. Ainda, se ligam a BAX e BAK inibindo a liberação do citocromo c e outras proteínas intermembranas importantes para a apoptose [23].

A avaliação da genotoxicidade pode ser realizada por testes *in vivo* e *in vitro* que detectam compostos que induzem danos genéticos, incluindo danos no DNA, mutação gênica e transformação celular [24]. Ensaios de genotoxicidade são amplamente aceitos como um indicador importante de carcinogenicidade [25].

Não havendo estudos anteriores do mecanismo de morte celular e genotoxicidade frente aos materiais citados, o objetivo do estudo foi avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de duas formulações experimentais de cimentos à base de silicato de cálcio, comparando aos cimentos Biodentine e MTA Plus em linhagem celular osteoblástica Saos-2.

Metodologias

Cultura celular e manipulação dos materiais:

Os materiais que foram avaliados e as proporções utilizadas estão descritos na Tabela 1.

Foram utilizadas células osteoblásticas humanas (Saos-2, linha ATCC HTB-85) por meio de monocamada em frascos T-75 (Jetbiofil, Elgin IL, USA), contendo meio de cultura D-MEM (Sigma/Aldrich, St Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS-Gibco/Life Technologies), penicilina (100UI / mL) e estreptomicina (100 mg / ml). As células foram cultivadas duas vezes por semana a 37 °C, 95% de umidade, 5% de CO₂. As células aderentes em fase logarítmica de crescimento foram removidas por uma mistura de tripsina / EDTA 0,25% (Gibco- BRL, Gaithersburg, MD) a 37°C durante 3 minutos.

Nessa etapa, 1g de cada material foram pesados em balança de precisão, manipulados com água destilada ou veículo do material nas devidas proporções em placas de vidro estéreis e acomodados no fundo de placas de cultura de 12 poços devidamente identificados e hidratados com gaze umedecida. As placas foram então levadas em estufa a 37°C durante 15 horas para completa presa dos materiais. Após esse período, as placas foram expostas a luz U.V. durante 30 minutos para prevenção de contaminação e 5 mL de meio de cultura DMEM

sem soro fetal bovino (Sigma/Aldrich) preencheram cada poço das placas onde o material foi acomodado e permaneceram por 24 horas em estufa (37°C, 95% umidade e 5% CO₂) para formação do eluído de cada material. Após 24 horas, esse meio foi coletado e novas diluições foram feitas para a exposição às células e ensaios.

1. *Ensaio de viabilidade celular*

Esse ensaio é baseado na habilidade da enzima desidrogenase mitocondrial em converter o sal que tem a cor amarela e é solúvel em água 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma Chemicals, St Louis, MO) em compostos coloridos de formazan, cuja absorbância é proporcional a quantidade de células vivas. Após contagem e plaqueamento das células osteoblásticas SAOS-2 (7×10^4 células/mL) em placas de 96 poços com meio de cultura D-MEM 5% SFB (Soro fetal bovino- Gibco/Invitrogen), as mesmas foram expostas durante 1, 3 e 7 dias com o eluído dos cimentos (200µl/cada) na diluição de 1:8 e controles (negativo: DMEM sem SFB; positivo: Peróxido de hidrogênio 3%). Após o período de 1, 3 e 7 dias, o meio de cultura foi trocado por 100µl de DMEM sem SFB contendo 5 mg/mL de MTT e as placas incubadas por 3 horas. Depois disso, cada poço foi lavado com 200µl de tampão fosfato (PBS 1 X) e 100 µl de álcool isopropílico acidificado (HCl: isopropylalcohol, 0.04N) foi adicionado ao extrato para solubilizar o formazan. A densidade óptica (OD) 570 nm, foi mensurada em leitor de microplacas automático (ELx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT). As planilhas foram importadas para o Excel (Office 2007; Microsoft Corporation, Redmond, WA).

2. *qPCR*

As células expostas aos eluídos por 3 e 5 dias foram coletadas e as amostras de RNA total extraídas com o reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). A concentração e a qualidade das amostras de RNA foram avaliadas com o espectrofotômetro NanoDrop 8000 (Fischer Scientific, Wilmington, DE, EUA). A partir de cada amostra, 2µg de RNA foram submetidos à transcrição reversa em cDNA utilizando o Kit de Transcrição Reversa QuantiTect (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os cDNAs obtidos foram utilizados como molde para qPCR, a fim de avaliar a expressão diferencial dos marcadores BAX e BCL2.

As reações foram realizadas no sistema de módulo óptico iCycler (Bio-Rad, Philadelphia, PA, EUA) em placas de qPCR de 96 poços (ABgene, Epsom, Surrey County, Reino Unido) com um volume de reação final de 20 µL/poço. Cada amostra de reação incluiu Sybr-Green PCR Master Mix 1X (Bio- Rad), 50ng de cDNA e 0.25 M de primers sense e

anti-sense (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para o gene alvo BAX (NM_001291428), o desenho do primer *sense* foi 5' GTTGTCGCCCTTTTCTACTTTG 3' e o desenho do primer *anti-sense* 5' AAGGAAGTCCAATGTCCAGC 3'. Para o gene alvo Bcl2 (NM_000633), o primer *sense* foi 5' GTTGTCGCCCTTTTCTACTTTG 3' e primer antisense foi 5' AAGGAAGTCCAATGTCCAGC 3'. GAPDH (NM_001289745) foi: *sense* 5' ATCATCTCTGCCCCCTCTGCTGA 3' primer antisense foi 5' TCATGACCACAGTCCATGCCATCA 3'.

As condições otimizadas de ciclos térmicos foram: 95 °C durante 7 min, seguido por 45 ciclos de 95 °C por 10 s, 55 °C durante 15 s, 72 °C durante 15 s e ciclos finais de 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, 80 ciclos de 55 °C durante 10 s. Triplicatas idênticas foram preparadas para cada reação e o experimento foi repetido 3 vezes de forma independente (n=9/grupo). Os resultados foram apresentados de acordo com a média dos valores de expressão dos genes, normalizados pelo controle interno *gapdh* pelo método da comparação do limiar dos ciclos ($\Delta\Delta CT$).

3. Ensaio cometa

3.1 Preparo das lâminas

Foram plaqueadas 2×10^6 céls/mL em placas de cultura de 24 poços em triplicata. Após 24 horas, as células foram expostas aos eluídos dos cimentos (1:2 e 1:8) e mantidas por adicionais 24 horas em estufa a 37°C, 95% umidade e 5% CO₂. A técnica descrita por Singh et al.[26] foi baseada para a quantificação de baixos níveis de danos no DNA em células. Após o tratamento das células com os eluídos dos cimentos, 200µl de tripsina/EDTA 0.25% (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) foi adicionado a cada poço da placa durante 2 minutos para remover as células. Após a centrifugação (2000rpm /3min), cada grupo de células foi resuspendido em 200µl de agarose LMP (*Lowmelting point*- Sigma/Aldrich, St Louis, MO) e transferidos para lâminas recém preparadas e identificadas com agarose ponto de fusão normal (Sigma/Aldrich, St Louis, MO).

As lâminas foram então, mergulhadas em solução de lise {5mL Triton X-100 + 50mL DMSO + Solução de lise estoque- completar para 500mL [500mL Água destilada; 73,05g NaCl (2,5M); 18,6g EDTA (100mM); 0,6g Tris (1-mM) recém preparada e à 4°C *overnight*.

3.2 Eletroforese

As lâminas foram preparadas na cuba de eletroforese horizontal, deixando por 20min na solução de eletroforese [2000mL de Água destilada; 10mL EDTA (A); 60mL NaOH (B)], acertando o pH para > 13 com NaOH ou HCl, para haver o relaxamento do DNA. (A) Solução de EDTA: 50mL Água destilada, 3,72g EDTA – Acertar o pH para 10 utilizando NaOH/HCl. (B) Solução de NaOH: 250mL de Água destilada, 100g NaOH. A fonte foi regulada para 25volts e a corrida por mais 20 minutos. As lâminas foram removidas cuidadosamente e mergulhadas na solução de Neutralização (Água destilada; Tris 0,4M- pH 7,5) por 15 minutos. As lâminas foram então fixadas em etanol puro para posterior secagem em temperatura ambiente.

3.3 Coloração e Análise

Para corar as lâminas, 80 μ l de Brometo de Etídio (0,02mg/mL) foi adicionado. Uma nova lamínula foi acomodada por cima da lâmina e as leituras foram imediatamente realizadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 50i- h550S) em aumento de 40x. Foram contadas 100 células/ grupo, fotografando cada campo escolhido. As imagens foram analisadas no programa Comet Score em relação a porcentagem de DNA na cauda (fragmentação do DNA) e analisadas estatisticamente através do programa Graphpad Prism 5.03. As células contadas foram analisadas comparando o mesmo grupo de materiais em relação aos controles positivo e negativo. Para o controle positivo foi utilizado o Peróxido de Hidrogênio (0,001M).

4. Análise Estatística

Os ensaios MTT e qPCR foram realizados em triplicata e repetidos em três tempos independentes e os dados foram apresentados na forma de média e desvio padrão da média. Para o ensaio Cometa, 100 células por concentração e controles foram analisados. Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software In., San Diego, Califórnia, EUA). O resultado do ensaio de MTT e qPCR foram analisados empregando two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. O ensaio Cometa foi analisado empregando *Kruskal-Wallis* com pós-teste *Dunn*. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados:

1. Ensaio de viabilidade celular- MTT

A viabilidade celular de Saos-2 após o cultivo com os eluídos de MTA P, BIO, CSCR ZrO₂ e Nb₂O₅ e em 1, 3 e 7 dias estão representados na figura 1. Em 1 dia de exposição, não houve diferença estatística para os grupos testados e o controle, com exceção do CSCR Nb₂O₅. Já nos períodos de 3 e 7 dias, todos os grupos foram semelhantes ao controle ($P < 0.05$).

2. qPCR

Os resultados de qPCR indicaram que em 3 dias de exposição, houve expressão de BAX para os grupos CSCR ZrO₂ e CSCR Nb₂O₅ e em 5 dias de exposição, MTAP e CSCR ZrO₂ expressaram o gene BAX. Para o BCL2, em 3 dias somente MTAP promoveu grande expressão do gene, e em 5 dias, MTAP e CSCR Nb₂O₅ apresentaram maior expressão. A correlação entre os genes (BCL2/BAX) demonstra que MTAP apresenta alta expressão, cerca de 8 vezes a mais que o controle e em 5 dias, MTAP e CSCR Nb₂O₅ promoveram elevada expressão, seguidos de CSCR ZrO₂, Figura 2.

3. Ensaio Cometa

O ensaio Cometa foi utilizado para medir os danos no DNA de Saos-2 in vitro expostos a diluição dos materiais. Todos os materiais testados em ambas as diluições (1:2 e 1:8) permaneceram similar ao controle negativo, sem diferença estatística ($P < 0.05$). O controle positivo (peróxido de hidrogênio 3%) induziu quebra de DNA, muito superior a todos os grupos analisados como observamos na figura 3.

Discussão

Os resultados obtidos para viabilidade celular por MTT demonstraram resposta tempo dependente, com aumento da viabilidade celular com o tempo de avaliação. Somente o grupo CSCR Nb₂O₅, foi diferente do controle negativo no período de 24 horas, com baixa viabilidade celular. Mestieri et al. [20] observaram resultados semelhantes, quando avaliaram a viabilidade de Saos-2 frente ao cimento Portland associado ao óxido de nióbio micro e nanoparticulados no decorrer de 1, 3 e 7 dias. Estudando a viabilidade das células da polpa hDPSCs frente ao Biodentine, Luo et al. [27] observaram resposta tempo/diluição dependente, durante 1, 3, 5 e 7 dias. MTA Plus branco e cinza também mostraram biocompatibilidade *in vitro* proporcional ao tempo/ diluição em células MDPC-23 (células tipo-odontoblastóides de ratos) [19].

Vários métodos são usados para avaliação da citotoxicidade de novos materiais e drogas. Apesar do teste MTT ser rotineiramente usado como teste *in vitro*, ele pode levar a resultados falso-positivos [28]. A análise do tipo de morte celular (apoptose/necrose) visa melhor compreensão do mecanismo de morte celular, e da influência dos materiais nesses mecanismos. Proteínas BCL2 regulam a via intrínseca da apoptose, e a principal classe de reguladores intracelulares da apoptose é a família de proteínas BCL2 [22]. Existem proteínas pró e anti-apoptóticas, o BCL2 é uma proteína anti-apoptótica, que ajuda a preservar a integridade da membrana, limitando os efeitos pró-apoptóticos do BAX e bloqueando a liberação de citocromo-C pela mitocôndria [23]. BAX é um gene da família BCL2 que promove a apoptose por se ligar e antagonizar a proteína BCL2 [29]. O aumento de BAX em 3 dias e a não expressão de BCL2 observado para os grupos CSCR ZrO₂ e Nb₂O₅, sugere indução de apoptose para esses grupos em Saos-2. Para o MTAP, a expressão de BCL2 em 3 dias, é maior que BAX, sugerindo a citocompatibilidade deste material, não sendo necessário a ativação de apoptose e nem a liberação inapropriada de proteínas da mitocôndria e de Ca⁺⁺ do retículo pra dar início a cascata da apoptose. Já no período de 5 dias, MTAP e CSCR ZrO₂ induziram o aumento de BAX, porém houve maior expressão de BCL2 para MTAP, CSCR ZrO₂ e CSCR Nb₂O₅, sugerindo um efeito “protetor” para estes materiais nestes períodos, já que foi relatado que BCL2 prolonga a sobrevivência das células.

A indução de apoptose é influenciada pela proporção BCL2/BAX [29]. Em 3 dias, MTAP mostrou altos valores de proporção BCL2/BAX, aumentando em 5 dias. CSCR Nb₂O₅ também obteve altos valores na relação BCL2/BAX em 5 dias, seguidos de CSCR ZrO₂. Em 5 dias, parece que a apoptose já não é recrutada como nos primeiros dias de exposição,

quando provavelmente, ocorre liberação de íons Ca^{++} e elevação de pH induzido pelos materiais, como mostrado por Zanini et al. [30] frente ao Biodentine nos primeiros dias de exposição. Assim, BCL2 se liga ao BAX, não ativando a apoptose e preservando a integridade da membrana, mostrando elevada expressão nos resultados do presente estudo. Ao contrário foi observado para um potente medicamento natural extraído de raízes secas denominado Matrine inibição da proliferação e indução de apoptose de Saos-2 por meio da expressão de Fas/FasL e BAX, e baixa expressão de BCL2, ativação de caspase-3, -8 e -9, desencadeando a cascata de apoptose [29]. Já foi demonstrado em citometria de fluxo, que a citotoxicidade inicial de MTA Plus parece estar mais associada a apoptose que a necrose, pela detecção da fosfatidilserina na superfície das células, que sugere que os danos irreversíveis pelos agentes citotóxicos são extracelulares, enquanto que as membranas nucleares ainda permanecem intactas [31]. Além disso, Eid et al. [19] mostraram que a exposição dos cimentos de silicato de cálcio resultou na diminuição dos níveis de ROS tanto para MTA Plus cinza e branco, quando comparados aos níveis de células não expostas. Uma explicação plausível é que a elevação do pH causada pela liberação de hidróxido de cálcio a partir dos materiais pode diminuir a formação de ROS. Estes achados corroboram com resultados do presente estudo uma vez que os materiais diminuindo os níveis de estresse oxidativo (“efeito protetor”), podem aumentar a capacidade das células para diferenciação e deposição de matriz mineralizada quando as células são cultivadas em meio osteogênico.

Além da viabilidade celular, materiais reparadores não devem promover genotoxicidade, que é a característica de provocar danos ao material genético da célula, seja por quebra no DNA, mutações, transformação celular, entre outros. A técnica do teste Cometa é considerada simples, reprodutível e confiável quando avaliado em células de mamíferos [32]. O princípio básico do teste Cometa é a migração dos fragmentos do DNA em uma matriz de agarose sob eletroforese. Quando as lâminas são vistas no microscópio de fluorescência, as células tem a aparência de Cometa com a cabeça (núcleo) e cauda (fragmentos de DNA), ou simplesmente de forma esférica quando não induziram a quebra do DNA. Todos os materiais avaliados, nas diluições escolhidas (1:2 e 1:8), não induziram genotoxicidade, permanecendo similar ao controle negativo ($P < 0.05$). Resultados similares foram encontrados para o cimento Portland puro e acrescido de 15% de óxido de bismuto, além do MTA, que não foram genotóxicos a fibroblastos de ratos [33].

Desta forma, os materiais à base de silicato de cálcio avaliados experimentais ou comerciais foram viáveis as Saos-2, não foram genotóxicos e apresentaram mecanismo de morte celular mais associado a apoptose, mantendo a membrana celular sem alterações.

Referências:

1. Zhou HM, Du TF, Shen Y, Wang ZJ, Zheng YF, Haapasalo M (2015) In Vitro Cytotoxicity of Calcium Silicate-containing Endodontic Sealers. *J Endod* 41:56-61.
2. Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC (2014) Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *J Endod* 40:1194-200.
3. Septodont.
Septodont.BiodentineActiveBiosilicateTechnologyScientificFile.Availableat:http://www.septodont.fr/fichiers_upload/biodentinescientificfile.pdf. . Accessed January, 2015.
4. Septodont. Package insert. Available at: <http://www.septodont.co.uk/sites/default/files/Package%20insert%209%20languages.pdf>. Accessed December 1, 2013. Accessed January, 2015.
5. Asgary S, Shahabi S, Jafarzadeh T, Amini S, Kheirieh S (2008) The properties of a new endodontic material. *J Endod* 34:990-3.
6. Camilleri J, Formosa L, Damidot D (2013) The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J* 46:831-40.
7. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C (2014) Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate. *J Endod* 40:1632-7.
8. Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M (2014) Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *Int Endod J* 47:437-48.
9. Gomes Cornelio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M (2011) Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod* 37:203-10.
10. Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru JM, Hungaro-Duarte MA, Tanomaru-Filho M, Camilleri J (2014) Chemical characterization and bioactivity of epoxy resin and Portland cement-based sealers with niobium and zirconium oxide radiopacifiers. *Dent Mater* 30:1005-20.
11. Camilleri J (2014) Tricalcium silicate cements with resins and alternative radiopacifiers. *J Endod* 40:2030-5.
12. Camilleri J (2007) Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 40:462-70.
13. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR (2004) Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 37:699-704.

14. Camilleri J, Cutajar A, Mallia B (2011) Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dent Mater* 27:845-54.
15. Denry IL, Holloway JA, Nakkula RJ, Walters JD (2005) Effect of niobium content on the microstructure and thermal properties of fluorapatite glass-ceramics. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 75:18-24.
16. Karlinsey RL, Yi K, Duhn CW (2006) Nucleation and growth of apatite by a self-assembled polycrystalline bioceramic. *Bioinspir Biomim* 1:12-9.
17. Jang YE, Lee BN, Koh JT, Park YJ, Joo NE, Chang HS, et al. (2014) Cytotoxicity and physical properties of tricalcium silicate-based endodontic materials. *Restor Dent Endod* 39:89-94.
18. Attik GN, Villat C, Hallay F, Pradelle-Plasse N, Bonnet H, Moreau K, et al. (2014) In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine versus MTA((R)). *Int Endod J* 47:1133-41.
19. Eid AA, Gosier JL, Primus CM, Hammond BD, Susin LF, Pashley DH, et al. (2014) In vitro biocompatibility and oxidative stress profiles of different hydraulic calcium silicate cements. *J Endod* 40:255-60.
20. Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornelio AL, Salles LP, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM (2014) Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement associated with niobium oxide micro and nanoparticles. *J Appl Oral Sci* 22:554-9.
21. Nikitakis NG, Sauk JJ, Papanicolaou SI (2004) The role of apoptosis in oral disease: mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutic opportunities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97:476-90.
22. Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 29;335(6189):440-2.
23. Ackler S, Mitten MJ, Foster K, Oleksijew A, Refici M, Tahir SK, et al. (2010) The Bcl-2 inhibitor ABT-263 enhances the response of multiple chemotherapeutic regimens in hematologic tumors in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol.* 66:869-80.
24. Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM (2006) Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101:258-61.
25. Auletta A, Ashby J (1987) Workshop on the relationship between short-term information and carcinogenicity. *Environ Mol Mutagen* 11:135-45.
26. Singh NP, McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L (1998) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-91.

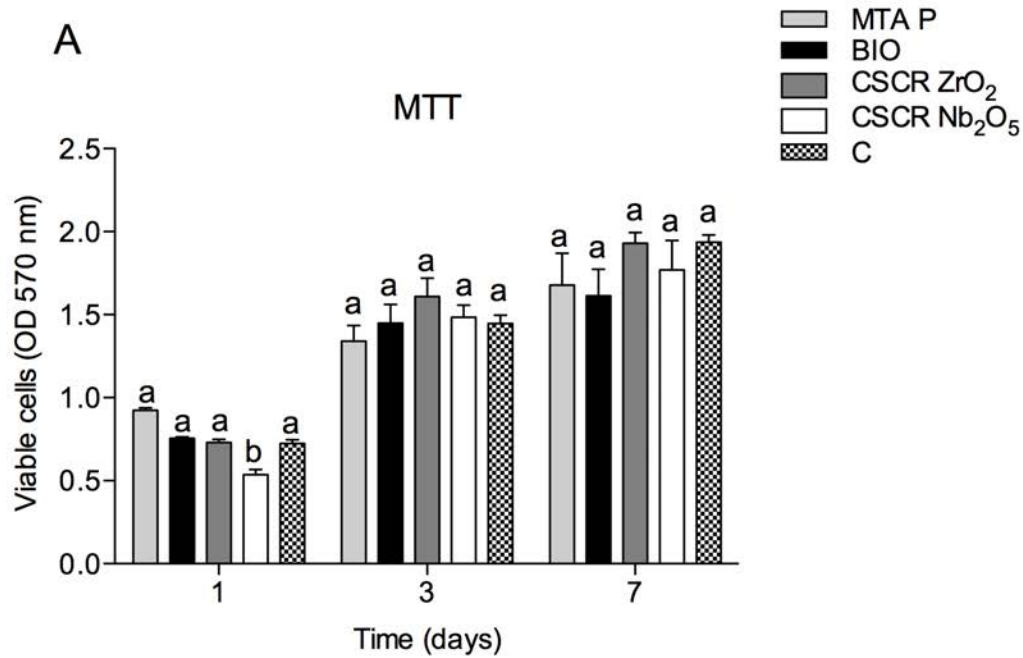
27. Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He WX (2014) Effect of Biodentine on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent* 42:490-7.
28. Berridge MV, Tan AS (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303:474-82.
29. Liang CZ, Zhang JK, Shi Z, Liu B, Shen CQ, Tao HM (2012) Matrine induces caspase-dependent apoptosis in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo through the upregulation of Bax and Fas/FasL and downregulation of Bcl-2. *Cancer Chemother Pharmacol* 69:317-31.
30. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S (2012) Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod* 38:1220-6.
31. Verhoven B, Schlegel RA, Williamson P (1995) Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 182:1597-601.
32. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-21.
33. Zeferino EG, Bueno CE, Oyama LM, Ribeiro DA (2010) Ex vivo assessment of genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to white MTA or white Portland cement with 15% bismuth oxide. *Int Endod J* 43:843-8.

Tabela 1. Materiais experimentais e proporção pó/líquido

Material	Fabricante/ Proporção
CSCR (Cimento de silicato de cálcio resinoso) + 30% ZrO ₂	Ligatex Ind. e Com. Ltda., Rio Claro, SP, Brasil Proporção: 1g - 235µl
CSCR (Cimento de silicato de cálcio resinoso) + 30% Nb ₂ O ₅	Ligatex Ind. e Com. Ltda., Rio Claro, SP, Brasil Proporção: 1g - 380µl
MTA Plus	Avalon Biomed Inc., Bradenton, FL, USA Proporção: relação água destilada-pó 0.35
Biodentine	Septodont, Saint-Maur-des-fosses's, France Proporção: 1g – 1 ampola água destilada

Figuras

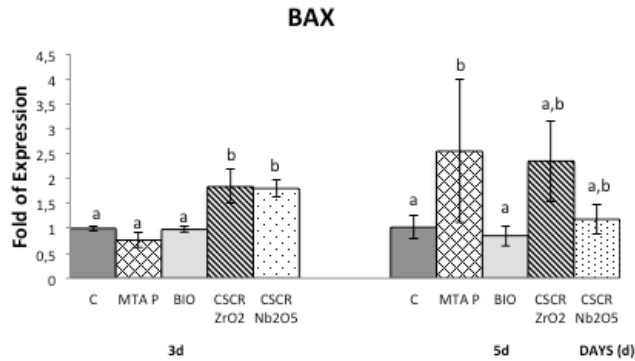
Figura 1.



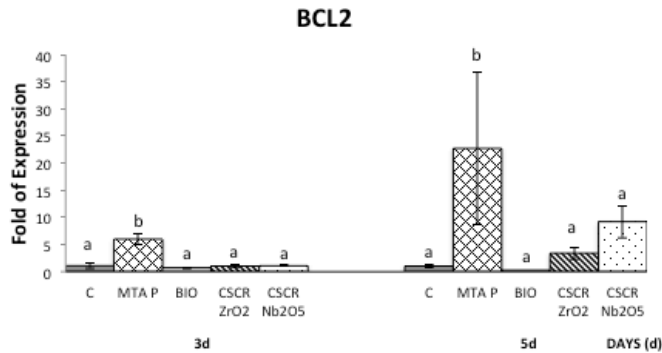
Viabilidade de Saos-2 após exposição ao eluído dos cimentos na diluição 1:8 por 1, 3 e 7 dias. MTA P = representa MTA Plus, BIO= Biodetine, CSCR ZrO₂ = Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% óxido de zircônio), CSCR + Nb₂O₅= Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% óxido de nióbio. C = grupo controle, Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre os grupos dentro de cada período e o grupo controle.

Figura 2.

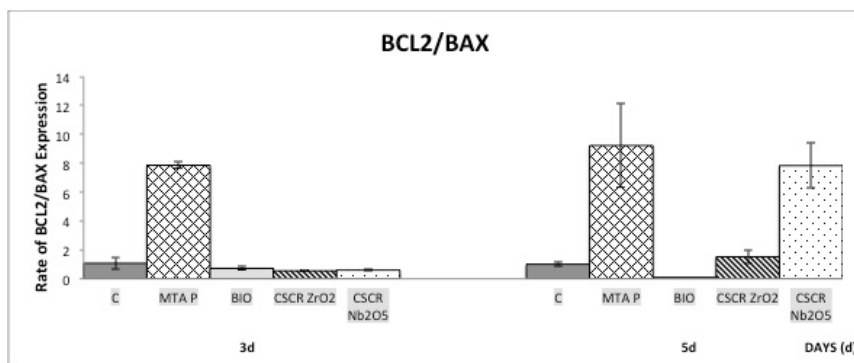
A



B

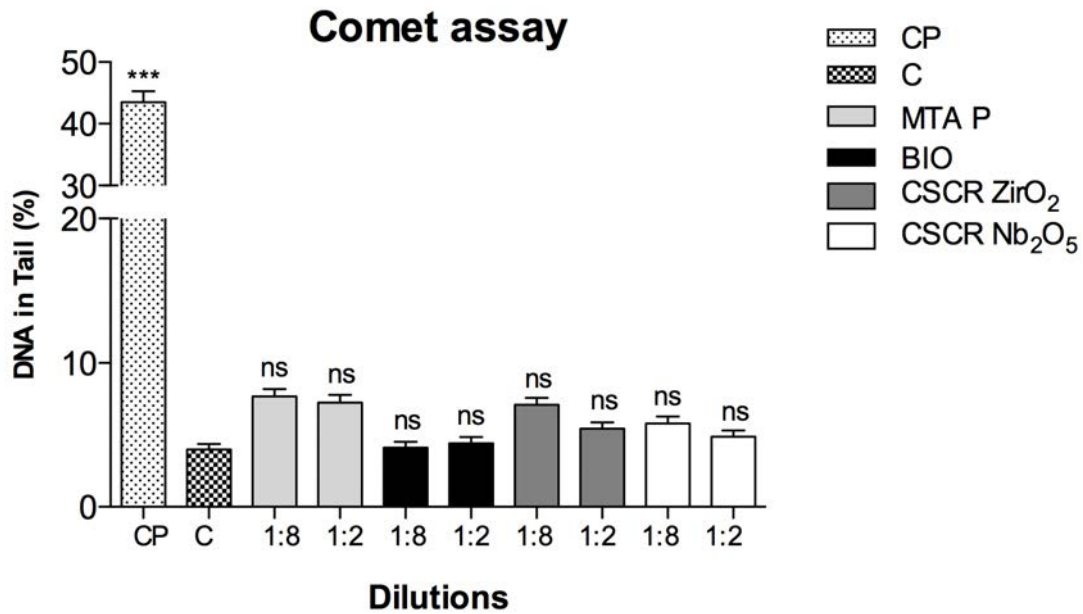


C



Níveis de expressão de RNAm dos genes alvo em células Saos-2, após exposição ao eluído dos cimentos na concentração 1:8 durante 3 e 5 dias. **A.** Representa a expressão do gene BAX em 3 e 5 dias **B.** Representa a expressão do gene BCL2 em 3 e 5 dias de exposição. **C.** Representa a relação BCL2/BAX em 3 e 5 dias. MTA P = representa o MTA Plus, BIO= Biodentine, CSCR ZrO₂= Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% óxido de zircônio, CSCR Nb₂O₅= Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% óxido de nióbio. C representa o controle. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes dentro do mesmo período.

Figura 3.



Genotoxicidade representada pela % de DNA na cauda em Saos-2 tratadas com diferentes eluídos dos cimentos na concentração de 1:2 e 1:8 após 24 horas em contato. MTA P = representa o MTA Plus, BIO= Biodentine, CSCR ZrO₂= Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% óxido de zircônio, CSCR Nb₂O₅= Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% óxido de nióbio. C representa o controle, CP representa o controle positivo (peróxido de hidrogênio 1mM). Resultados foram expressos por % de DNA na cauda de 100 células por concentração e controles. Tratados vs C, (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$); *** $P < 0.001$).

6 CAPÍTULO 4

Bioatividade do MTA Plus, Biodentine e cimentos modificados à base de silicato de cálcio com óxido de zircônio ou óxido de nióbio*

*Artigo nas normas do periódico *International Endodontic Journal*.

Resumo

Novos cimentos à base de silicato de cálcio e formulações modificadas são propostos.

Objetivo: Comparar a bioatividade dos materiais à base de silicato de cálcio Biodentine (Septodont) e MTA Plus (Avalon) e o cimento experimental de silicato de cálcio resinoso (CSCR) acrescido de óxido de zircônio (ZrO_2) ou óxido de nióbio (Nb_2O_5). **Metodologia:** Células osteoblásticas humanas Saos-2 foram utilizadas para avaliação da citotoxicidade (MTT), bioatividade pelos métodos de proliferação celular, atividade da enzima fosfatase alcalina (1, 3 e 7 dias) e análise da expressão gênica de fosfatase alcalina (*alp*) e osteocalcina (*ocn*). O corante vermelho de Alizarina detectou os depósitos de cálcio em meio osteogênico. Os dados de MTT, proliferação celular, fosfatase alcalina e qPCR foram submetidos a análise de variância e *Bonferroni*, e vermelho de Alizarina ao teste ANOVA, com pós-teste *Tukey* ($P < 0.05$). **Resultados:** No MTT, os materiais apresentaram comportamento dose-dependente, assimilando ao controle nas maiores diluições. Todos demonstraram atividade de ALP, com destaque aos 7 dias. No Vermelho de Alizarina, todos induziram depósitos de cálcio, destacando CSCR Nb_2O_5 . A expressão gênica de *alp* e *ocn* foi baixa para todos os grupos (1 dia). Aos 3 dias, a expressão de *alp* aumentou, sendo a maior para CSCR Nb_2O_5 e Biodentine ($P < 0.05$). Não houve expressão de *ocn*. **Conclusão:** Todos os materiais mostraram viabilidade e potencial osteogênico. Dentre os materiais comerciais destaca-se o Biodentine. O cimento experimental à base de silicato de cálcio CSCR e os radiopacificadores óxido de zircônio e de nióbio mostram potencial para o desenvolvimento de materiais reparadores.

Palavras-chave: Citotoxicidade, cultura celular, expressão gênica, silicato de cálcio, endodontia.

Introdução

O MTA (Mineral Trióxido Agregado) é indicado como material reparador de perfurações e em obturações retrógradas por apresentar excelente biocompatibilidade e capacidade de induzir tecido mineralizado (Yoshino *et al.* 2013). No entanto, algumas desvantagens como consistência fluida, dificuldade de manipulação e tempo de presa elevado podem dificultar sua aplicação clínica. O MTA é composto por cimento Portland e óxido de bismuto como radiopacificador (Danesh *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2007) sendo considerado cimento à base de silicato de cálcio (CSC). Formulações modificadas de cimentos de silicato de cálcio por meio de aditivos como resinas (CSCR) visam aperfeiçoar a manipulação e consistência do cimento.

Novos agentes radiopacificadores, como óxido de zircônio (ZrO_2) e óxido de nióbio (Nb_2O_5) merecem destaque na formulação de cimentos reparadores e endodônticos à base de silicato de cálcio (Viapiana *et al.* 2014). A associação do CP com 30% de ZrO_2 demonstra propriedades físico-químicas adequadas (Camilleri 2010) com liberação de íons cálcio e aumento do pH, além de apresentar bioatividade (Camilleri *et al.* 2011). O Nb_2O_5 tem sido utilizado em ligas de titânio de implantes endósseos, devido a sua biocompatibilidade e resistência a corrosão e desintegração (Gillani *et al.* 2010). A associação do óxido de nióbio como radiopacificador de cimentos de silicato de cálcio foi avaliada (Guerreiro Tanomaru *et al.* 2014) demonstrando que a associação de 30% de Nb_2O_5 micro e nanoparticulados no CP proporciona radiopacidade adequada de acordo com a ANSI/ADA, sem influenciar o efeito antimicrobiano do CP, e promovendo pH alcalino. O potencial bioativo da associação Nb_2O_5 e ZrO_2 com CP na formulação de um cimento endodôntico foi demonstrada pela deposição de cristais de hidroxiapatita (Viapiana *et al.* 2014). CP + Nb_2O_5 também apresenta viabilidade das células osteoblásticas humanas Saos-2 e estimula a produção de ALP em 7 dias com resultados melhores que MTA quando usado na forma microparticulada, demonstrando potencial de mineralização (Mestieri *et al.* 2014).

O Biodentine™ (Septodont), é um material a base de silicato de cálcio que consiste em um pó composto de silicato tricálcio, silicato dicálcio, óxido de cálcio, carbonato de cálcio e óxido de zircônio como radiopacificador. O líquido contém cloreto de cálcio (que diminui o tempo de presa) e um polímero hidrossolúvel (agente redutor de água) para manter a fluidez, com uma baixa proporção pó/água (Active Biosilicate Technology™ 2010). As indicações do Biodentine são similares ao MTA, porém suas principais vantagens são o tempo reduzido de presa e melhor propriedade mecânica (Camilleri *et al.* 2013). O radiopacificador deste material (óxido de zircônio) demonstra vantagem em relação ao óxido de bismuto

presente no MTA (Camilleri *et al.* 2013), uma vez que o óxido de bismuto promove deterioração da estabilidade mecânica e aumento da porosidade, podendo alterar a longevidade do material (Coomaraswamy *et al.* 2007). Biodentine tem se destacado em relação a propriedades biológicas *in vivo e in vitro*, como ausência de resposta inflamatória e formação de ponte de dentina quando utilizado no capeamento de dentes vitais (Nowicka *et al.* 2013), aumento de viabilidade celular quando exposto a células da polpa OD-21, além da indução de expressão de importantes marcadores moleculares envolvidos mineralização, como fosfatase alcalina e estímulo de depósitos de cálcio (Zanini *et al.* 2012).

MTA Plus (Avalon Biomed Inc., Bradenton, FL, USA) é um material à base de silicato de cálcio indicado tanto para terapias pulpares, como reparo de perfurações e como material retrobturador. Uma vantagem deste material em relação ao cimento MTA é o tamanho das partículas que chegam a ser 50% mais finas que o MTA, menores que 1µm (Neelakantan *et al.* 2013), com composição química à base de silicato de cálcio (Camilleri 2013). Quanto a viabilidade, quando exposto a células MDPC-23, o material foi tempo/concentração dependente, sendo que os riscos de citotoxicidade foram desprezíveis após a diluição dos componentes (Ashraf A. Eid 2013). As propriedades físico-químicas do MTA Plus, manipulado com água ou gel, demonstram reação de hidratação, pH e liberação de íons cálcio semelhantes. Porém em relação ao tempo de presa, compressão, porosidade e reabsorção de líquidos, o MTA Plus manipulado com gel mostra melhor resultado do que o manipulado com água destilada (Formosa *et al.* 2013).

Frente a novos materiais no mercado com poucos estudos em relação a bioatividade, e novas propostas de cimentos a base de silicato de cálcio e novos radiopacificadores, o objetivo deste estudo foi avaliar a citotoxicidade e bioatividade de materiais à base de silicato de cálcio comerciais e experimentais.

Material e Métodos

Cultura celular e manipulação dos materiais

Os materiais que foram avaliados e as proporções utilizadas estão descritos na Tabela 1.

Foram utilizadas células osteoblásticas humanas (Saos-2, linha ATCC HTB-85) por meio de monocamada em frascos T-75 (Jetbiofil, Elgin IL, USA), contendo meio de cultura D-MEM (Sigma/Aldrich, St Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS- Gibco/Life Technologies), penicilina (100UI / mL) e estreptomicina (100 mg / ml). As células foram cultivadas duas vezes por semana a 37 °C, 95% de umidade, 5% de CO₂. As

células aderentes em fase logarítmica de crescimento foram removidas por uma mistura de tripsina / EDTA 0,25% (Gibco- BRL, Gaithersburg, MD) a 37°C durante 3 minutos.

Nessa etapa, 1g de cada material foram pesados em balança de precisão, manipulados com água destilada ou veículo do material nas devidas proporções em placas de vidro estéreis e acomodados no fundo de placas de cultura de 12 poços devidamente identificados e hidratados com gaze umedecida. As placas foram então levadas em estufa a 37°C durante 15 horas para completa presa dos materiais. Após esse período, as placas foram expostas a luz U.V. durante 30 minutos para prevenção de contaminação e 5 mL de meio de cultura DMEM sem soro fetal bovino (Sigma/Aldrich) preencheram cada poço das placas onde o material foi acomodado e permaneceram por 24 horas em estufa (37°C, 95% umidade e 5% CO₂) para formação do eluído de cada material. Após 24 horas, esse meio foi coletado e novas diluições foram feitas para a exposição às células e ensaios.

Ensaio de viabilidade celular- MTT

Esse ensaio é baseado na habilidade da enzima desidrogenase mitocondrial em converter o sal que tem a cor amarela e é solúvel em água 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma Chemicals, St Louis, MO) em compostos coloridos de formazan, cuja absorbância é proporcional a quantidade de células vivas. Após contagem e plaqueamento das células osteoblásticas Saos-2 (7×10^4 céls/mL) em placas de 96 poços com meio de cultura D-MEM 5% SFB (Soro fetal bovino- Gibco/Invitrogen), as mesmas foram expostas durante 24 horas com os eluídos dos cimentos (200µl/cada) nas diluições de 1:1; 1:2; 1:4 e 1:8 e controles (negativo: DMEM sem SFB; positivo: Peróxido de hidrogênio 3%). Após o período de 24 horas, o meio de cultura foi trocado por 100µl de DMEM sem SFB contendo 5 mg/mL de MTT e as placas incubadas por 3 horas. Depois disso, cada poço foi lavado com 200µl de tampão fosfato (PBS 1 X) e 100 µl de álcool isopropílico acidificado (HCl: isopropylalcohol, 0.04N) foi adicionado ao extrato para solubilizar o formazan. A densidade óptica (OD) 570 nm, foi mensurada em leitor de microplacas automático (ELx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT). As planilhas foram importadas para o Excel (Office 2007; Microsoft Corporation, Redmond, WA) e os dados submetidos a análises estatísticas (n=9).

Proliferação celular

O ensaio de proliferação celular visa a avaliação das características de migração das células mantidas em diferentes condições de cultura. As células foram plaqueadas numa densidade de 6×10^5 células por poço em placas de cultura de 12 poços contendo meio de

cultura DMEM e mantidas nas mesmas condições já descritas anteriormente. Quando atingiram 80-90% de confluência (24 horas), as Saos-2 foram removidas por *scratching* num trecho linear de aproximadamente 350 μm , passando verticalmente pelo centro de cada poço, utilizando uma ponta de polipropileno estéril (Lipton *et al.* 1971). Imediatamente, as monocamadas foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e o meio de cultura foi substituído por 1.5 mL de eluídos dos materiais ou novo DMEM (grupo CT). Os eluídos de materiais e DMEM foram renovados no dia 3 após início da exposição das células. A proliferação celular foi observada em tempos de cultura determinados (0, 1, 2, 3 e 5 dias) utilizando microscópio invertido (Zeiss Axiovert 100, objetiva 10X) e os poços fotografados (Canon EOS-1D). As imagens digitais foram processadas e a mensuração da área coberta por células foi realizada utilizando o software ImageJ 1.45 (National Institutes of Health, NIH, EUA). Os experimentos foram realizados em triplicata e 35 campos diferentes foram fotografados/digitalizados para cada grupo (n=35/grupo).

Atividade de Fosfatase Alcalina

A atividade da fosfatase alcalina foi determinada por meio do kit comercial da Labtest (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). O princípio da metodologia está na hidrólise da timolftaleína monofosfato pela fosfatase alcalina produzida pelas células, que deverá liberar a timolftaleína de cor azul em meio alcalino, sendo a intensidade de cor diretamente proporcional à atividade enzimática. Após 24 horas da contagem e incubação das células (7×10^4) em placas de 96 poços, houve a exposição das mesmas com o eluído dos cimentos retrobturadores já previamente preparados na diluição 1:8, durante o período de 1, 3 e 7 dias. Após cada período experimental, o meio de cultura foi removido e as células lavadas com 200 μl de PBS 1X. Para o período de 7 dias, houve uma troca do eluído dos cimentos no 3º dia de exposição. Em seguida, foi acrescentado 200 μl de uma solução de Lauril sulfato de sódio/água destilada 1% (Sigma/Aldrich) a cada poço das placas de cultura de células. Após 30 min a temperatura ambiente, 12,5 μl dessas amostras foram transferidas para tubos tipo Eppendorf contendo o substrato e o tampão da enzima, conforme o procedimento padrão do KIT. Os sistemas foram incubados a 37⁰C durante 10 min e 500 μl do reagente de cor foi adicionado em cada tubo Eppendorf. As amostras foram então, passadas para uma nova placa de 96 poços para leitura em leitor de microplacas automático (ELx800; Instrumentos Bio-Tek, Winooski, VT). A absorbância foi medida a 590nm e os resultados obtidos submetidos a análises estatísticas. O experimento foi realizado em triplicata.

A quantificação da enzima é dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Fosfatase Alcalina (U/L)} = \text{Abs da amostra/Abs padrão} \times 45.$$

Vermelho de Alizarina

O corante vermelho de alizarina é usado para identificar o depósito de cálcio em cultura de células. O cálcio forma um complexo vermelho de alizarina S em um processo de quelatação. Com intuito de avaliar a quantidade de cálcio depositado por diferentes materiais a base de silicato de cálcio, células osteoblásticas SAOS-2 foram contadas e plaqueadas (1×10^4) em placas de cultura de 12 poços. Durante 21 dias, o meio de cultura DMEM osteogênico contendo o eluído dos materiais (previamente preparados) na diluição 1:8 foi renovado a cada 2 dias, totalizando 21 dias em contato com os eluídos. O meio então, foi aspirado, 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 então lavadas duas vezes com água destilada anteriormente a adição de 1mL do corante Alizarin Red S 40 mM (pH 4.1) e assim mantidas a temperatura ambiente por 20 minutos. Após o período, o corante foi aspirado e os poços lavados 4 vezes com 1mL de água destilada/poço cuidadosamente. As placas foram então deixadas anguladas por 2 minutos, para facilitar a remoção do excesso de água e imediatamente fotografadas e analisadas no programa ImageTool (n=3/grupo). Os resultados foram submetidos a análise estatística.

Expressão gênica de marcadores moleculares de osteogênese

A análise foi realizada pela quantificação relativa utilizando o aparelho Real Time Polymerase Chain Reaction (Real Time PCR, StepOnePlus Real Time PCR System, Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). SAOS-2 foram coletadas após cultivo com os eluídos dos cimentos durante 1 e 3 dias, e submetidas à extração de RNA total de acordo com o procedimento padrão do reagente Trizol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e utilizando o kit SuperScript III (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). A reação de incubação do RNA total foi realizada junto com primer dT 0,5 mg/mL e água por 5 minutos a 25°C para posterior obtenção do cDNA utilizando o kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Em termociclador (My Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), foram realizados os seguintes ciclos de temperatura: 42°C por 60 minutos para anelamento do primer, 70°C por 15 minutos para extensão da fita de cDNA e 4°C para armazenamento do cDNA. As

referências das sondas foram: Osteocalcina, OC (Hs01587814_g1); Fosfatase Alcalina, ALP (Hs01029144_m1) e GAPDH (Hs02758991_g1) (Applied Biosystems, Life technologies). Triplicatas foram feitas para cada reação, e o experimento foi repetido por 3 vezes independentes. Os resultados foram apresentados de acordo com a média dos valores de expressão dos genes, normalizados pelo controle interno *gapdh* pelo método da comparação do limiar dos ciclos ($\Delta\Delta CT$). (n=9/grupo).

Análise estatística:

Os ensaios MTT, ALP, qPCR e Vermelho de Alizarina foram realizados em triplicata e repetidos em três tempos independentes e os dados foram apresentados na forma de média e desvio padrão da média. O ensaio de proliferação foi realizado em triplicata e 35 campos diferentes foram fotografados/digitalizados para cada grupo (n=35/grupo). Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico Graph Pad Prism 5 (Graph Pad Software In., San Diego, Califórnia, EUA). O resultado do ensaio de MTT, Proliferação celular, ALP e qPCR foram analisados empregando two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. O ensaio Vermelho de Alizarina, foi analisado empregando one-way ANOVA com pós-teste *Tukey*. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados:

Ensaio de viabilidade celular- MTT

MTA Plus e Biodentine apresentaram citotoxicidade dose-dependente, com maior taxa de viabilidade celular nas maiores diluições. CSCR ZrO₂, em todas diluições, manteve a viabilidade próxima ao controle ($P < 0.05$). CSCR Nb₂O₅ apresentou menores valores de viabilidade celular nas diferentes diluições ($P < 0.05$). (Fig.1)

Proliferação celular

As células nos diferentes grupos experimentais apresentaram proliferação maior que o grupo controle, nos períodos de 1, 2 e 3 dias, com diferença estatística entre alguns materiais. Porém aos 5 dias, todos materiais foram similares, havendo total cobertura da área de proliferação. (Fig.2)

Atividade de Fosfatase Alcalina

Foi realizada a avaliação em relação a viabilidade celular. A maior produção da enzima ALP foi observada para todos os grupos e controle aos 7 dias. (Fig.3)

Vermelho de Alizarina

Todos os materiais e o controle demonstraram produção de nódulos de mineralização. CSCR Nb₂O₅ apresentou melhores resultados entre os materiais avaliados ($P < 0.05$). (Fig.4)

qPCR

Os resultados de qPCR indicaram que em 1 dia de exposição, houve baixa expressão do gene *alp*, e não houve expressão para *ocn*. Quando usado meio osteogênico, após 1 dia de exposição, a expressão aumentou para ALP, porém abaixo do controle, e *ocn* não apresentou expressão.

Após 3 dias de exposição, em meio convencional, MTAP apresentou expressão baixa de *alp*. No entanto, Bio e CSCR ZrO₂ foram similares ao controle e CSCR Nb₂O₅ demonstrou alta expressão, cerca de 3 vezes maior que o controle ($P < 0.05$). Em meio osteogênico, todos os materiais tiveram expressão de *alp*, com semelhança em relação ao controle ($P < 0.05$). Biodentine apresentou elevada expressão superior ao controle. (Fig.5)

Discussão

A viabilidade celular por meio de teste MTT no período de 24 horas demonstrou que Biodentine e MTA Plus apresentaram comportamento dose-dependente, sendo mais citotóxicos nas menores diluições. Este resultado corrobora com Zanini *et al.* (Zanini *et al.* 2012) que demonstraram diminuição significativa das células OD-21 (células pulpares de murinos) frente ao Biodentine nos dois primeiros dias de exposição, que poderia ser causado pela liberação de íons Ca⁺⁺ e aumento de pH, principalmente em 24 horas confirmado pela mudança de coloração do meio de cultura. Luo *et al.* (Luo *et al.* 2014) observaram citotoxicidade para Biodentine, após 24 horas de exposição, e aumento da viabilidade celular progressiva em 3, 5 e 7 dias. No entanto, Attik *et al.* (Attik *et al.* 2014) mostraram alta viabilidade celular para o Biodentine quando exposto as células MG63 após 24 horas, sendo similar ao MTA. As diferenças nos resultados podem estar relacionadas aos diferentes tipos celulares, além do método de contato e diferentes tempos de exposição.

A viabilidade celular para o MTA Plus foi semelhante ao controle mesmo nas menores diluições, resultado similar obtido por Eid *et al.* (Eid *et al.* 2014) após teste XTT, com células

MDPC-23. No presente estudo, CSCR ZrO₂ demonstrou viabilidade celular, mantendo os valores próximos ao controle, independente da diluição. No entanto, CSCR Nb₂O₅ mostrou menores valores de viabilidade celular, diferindo do controle. Mestieri *et al.* (Mestieri *et al.* 2014), observaram que em 1 dia de exposição, os menores valores de viabilidade para Nb₂O₅ associado ao CP em todas as concentrações testadas, aumentando a viabilidade com o aumento do tempo. Ainda, no mesmo estudo, foram avaliados os materiais na forma micro e nanoparticulada do radiopacificador, que foram similares na viabilidade das células Saos-2. Além da viabilidade, a proliferação, migração e adesão das células são fases importantes a serem analisadas, frente a regeneração de tecidos (Fitzgerald 1979). Os resultados demonstraram que as Saos-2 expostas aos diferentes eluídos proliferaram de forma mais rápida que o controle. Luo *et al.* (Luo *et al.* 2014) utilizaram as menores concentrações de Biodentine na proliferação e adesão das células pulpares humanas e observaram que houve aumento significativo nesses processos celulares, corroborando com resultados do presente estudo e justificando a citocompatibilidade de todos os materiais analisados na maior diluição.

A partir dos resultados de MTT, a concentração de 1:8 foi selecionada para a análise da bioatividade dos materiais realizada por meio da atividade de fosfatase alcalina (ALP), coloração com vermelho de Alizarina e a expressão de 2 importantes genes envolvidos na mineralização (*alp* e *ocn*). A atividade da ALP foi determinada após períodos de 1, 3 e 7 dias e normalizada pela viabilidade celular de acordo com Salles *et al.* (Salles *et al.* 2012). Após 1 dia, a produção de ALP foi baixa para todos os materiais, o que pode estar relacionado ao elevado pH nas primeiras 24 horas (Green *et al.* 1988). A partir do 3° dia, os valores aumentam e no 7° dia de exposição, foi observada maior atividade de ALP para todos os materiais, com destaque ao Biodentine. Biodentine já havia demonstrado altos valores da proteína (Chang *et al.* 2014), que é associada com a mineralização biológica (Parfitt 1976). Biodentine foi capaz de formar ponte de dentina em dentes humanos submetidos ao capeamento pulpar, estimulando proliferação celular (Laurent *et al.* 2012; Nowicka *et al.* 2013). Biodentine também mostra ser bioativo ao aumentar a proliferação, migração e adesão das células da polpa dental humana HDPCs (Chang *et al.* 2014).

ALP libera íons fosfato livres que por sua vez, reagem com íons cálcio para formar um precipitado de fosfato de cálcio, uma unidade molecular da hidroxiapatita (Kuru *et al.* 1999). Para os materiais experimentais Nb₂O₅ e ZrO₂, apesar da maior expressão ter sido em 7 dias sem diferença estatística entre eles, melhores resultados foram observados para o Nb₂O₅ em 3 dias, corroborando com resultados de Mestieri *et al.* (Mestieri *et al.* 2014), que observaram melhor atividade de Nb₂O₅ microparticulado, comparado ao MTA para Saos-2 após 3 dias de

exposição. Salles et al. (Salles et al. 2012) também observaram maior atividade de ALP para Saos-2 no 7° dia de exposição a um material à base de MTA.

Vermelho de Alizarina é um corante que identifica depósitos de cálcio em cultura celular. Após 21 dias de cultura com os diferentes eluídos dos cimentos em meio osteogênico foi observado que todos os materiais induziram depósitos de cálcio, sendo MTA P e Bio semelhantes ao controle ($P < 0.05$), e CSCR Nb₂O₅ superior aos demais, produzindo maior quantidade de nódulos de mineralização. CSCR ZrO₂ apresentou menor atividade. Estes resultados são consistentes com o aumento da atividade de AL expressa para todos os materiais avaliados.

Apesar da influência do agente radiopacificador ainda não ser muito clara na bioatividade dos cimentos, óxido de zircônio e óxido de nióbio tem sido relatados na literatura por serem utilizados em superfície de implantes e próteses, favorecendo a deposição óssea (Shapira *et al.* 2009; Ozkurt & Kazazoglu 2011). No presente estudo, a associação CSCR Nb₂O₅ merece destaque. Óxido de nióbio já demonstrou capacidade de enuclear minerais sobre a superfície (Karlinsey *et al.* 2006). Viapiana et al. (Viapiana *et al.* 2014) estudaram esses dois radiopacificadores em cimentos de silicato de cálcio e sugeriram que apesar de ambos mostrarem serem inertes na reação de hidratação (Camilleri *et al.* 2011), Nb₂O₅ proporcionou deposição de cristais de hidroxiapatita na análise de microscopia eletrônica de varredura, ressaltando o potencial bioativo do material.

A expressão dos genes *alp* e *ocn* foram mensurados por qPCR na presença dos eluídos dos cimentos na diluição 1:8 em 1 e 3 dias de exposição em meio de cultura convencional e osteogênico. Este método é indicado para quantificar a expressão gênica ao longo do tempo por ser sensível e preciso (VanGuilder *et al.* 2008). O gene *alp*, fosfatase alcalina, é uma proteína que desempenha um importante papel na mineralização da matriz. A osteocalcina, codificada *ocn*, é uma proteína não colagenosa, expressa na matriz extracelular, durante a mineralização dos osteoblastos (Rodan & Noda 1991). O nível de expressão de ambos os genes foi baixo no 1° dia, sendo *alp* superior para todos os materiais, principalmente em meio osteogênico. Isto pode ser explicado, pela mudança do pH nas primeiras 24 horas, de todos os materiais a base de silicato de cálcio inibindo a expressão gênica (Green *et al.* 1988; Torabinejad *et al.* 1995; Spector *et al.* 2001) corroborando com Yuan *et al.* (Yuan *et al.* 2010) que mostraram expressões muito baixas de *ocn* em 1 dia de exposição do MTA e Bioaggregate expostos as células MC3T3-E1. No 3° dia, a expressão de *ocn* continuou baixa, mesmo em meio osteogênico. No entanto, a expressão de *alp* aumentou consideravelmente em todos os grupos, com exceção do MTAP, havendo uma elevada expressão no grupo CSCR

Nb_2O_5 ($P < 0.05$). Já em meio osteogênico, para *alp*, todos os grupos expressaram e foram semelhantes ao controle negativo, com exceção do Biodentine, que mostrou elevada expressão no meio osteogênico ($P < 0.05$). Este resultado é consistente com estudos prévios, onde mostram que Biodentine induz a mineralização (Laurent *et al.* 2012; Zanini *et al.* 2012; Lee *et al.* 2014). Estes resultados reforçam o potencial do Nb_2O_5 como radiopacificador quando associado ao CSC, sendo promissor para desenvolvimento de biomateriais.

A diferente expressão entre os genes pode estar relacionada à fase do desenvolvimento celular (Zanini *et al.* 2012). ALP e Colágeno tipo I são marcadores protéicos no desenvolvimento precoce dos osteoblastos, e são portanto, associados a uma intensa atividade secretora da célula, enquanto que os marcadores de proteínas de desenvolvimento tardio, tais como osteoclastina (*ocn*), indicam que as células entram numa fase de repouso (Simon *et al.* 2009). A expressão de *ocn* nas células osteoblásticas MG63 só foi evidente a partir do 7º dia de exposição ao MTA e cimento de silicato (Li *et al.* 2014), justificando os resultados obtidos no presente estudo.

Conclusão:

Todos os cimentos a base de silicato de cálcio, de uma forma geral, foram citocompatíveis, principalmente nas maiores diluições, e induziram a bioatividade de Saos-2, com destaque aos materiais Biodentine, e o cimento experimental de silicato de cálcio com óxido de nióbio, que mostram maior potencial de mineralização. Desta forma, os materiais apresentam potencial biológico para ser usado como materiais reparadores. Estudos adicionais são necessários, especialmente para os materiais experimentais.

Referências:

- Active Biosilicate Technology™ S (2010). Biodentine™ Scientific file. *Saint-Maur-des-Fossés Cedex, France R&D Department*.
- Ashraf A, Eid JLG, Johnny L, Gosier, Barry D, Hammond, Lisiane F, Susin, David H, Pashley, Franklin R, Tay. (2013). In Vitro Biocompatibility and Oxidative Stress Profiles of Different Hydraulic Calcium Silicate Cements. *J Endod*.
- Attik GN, Villat C, Hallay F et al. (2014). In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine versus MTA((R)). *Int Endod J* **47**, 1133-1141.
- Camilleri J (2010). Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *Int Endod J* **43**, 231-240.
- Camilleri J, Cutajar A and Mallia B (2011). Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dent Mater* **27**, 845-854.
- Camilleri J, Formosa L and Damidot D (2013). The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J* **46**, 831-840.
- Camilleri J, Sorrentino F and Damidot D (2013). Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater* **29**, 580-593.
- Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY and Kim EC (2014). Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *J Endod* **40**, 1194-1200.
- Coomaraswamy KS, Lumley PJ and Hofmann MP (2007). Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod* **33**, 295-298.
- Danesh G, Dammaschke T, Gerth HU, Zandbiglari T and Schafer E (2006). A comparative study of selected properties of ProRoot mineral trioxide aggregate and two Portland cements. *Int Endod J* **39**, 213-219.
- Eid AA, Gosier JL, Primus CM et al. (2014). In vitro biocompatibility and oxidative stress profiles of different hydraulic calcium silicate cements. *J Endod* **40**, 255-260.
- Fitzgerald M (1979). Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. *J Dent Res* **58**, 2198-2206.
- Formosa LM, Mallia B and Camilleri J (2013). Mineral trioxide aggregate with anti-washout gel - properties and microstructure. *Dent Mater* **29**, 294-306.
- Gillani R, Ercan B, Qiao A and Webster TJ (2010). Nanofunctionalized zirconia and barium sulfate particles as bone cement additives. *Int J Nanomedicine* **5**, 1-11.

- Green J, Yamaguchi DT, Kleeman CR and Muallem S (1988). Cytosolic pH regulation in osteoblasts. Interaction of Na⁺ and H⁺ with the extracellular and intracellular faces of the Na⁺/H⁺ exchanger. *J Gen Physiol* **92**, 239-261.
- Guerreiro Tanomaru JM, Storto I, Da Silva GF et al. (2014). Radiopacity, pH and antimicrobial activity of Portland cement associated with micro- and nanoparticles of zirconium oxide and niobium oxide. *Dent Mater J* **33**, 466-470.
- Karlinsey RL, Hara AT, Yi K and Duhn CW (2006). Bioactivity of novel self-assembled crystalline Nb₂O₅ microstructures in simulated and human salivas. *Biomed Mater* **1**, 16-23.
- Kuru L, Griffiths GS, Petrie A and Olsen I (1999). Alkaline phosphatase activity is upregulated in regenerating human periodontal cells. *J Periodontal Res* **34**, 123-127.
- Laurent P, Camps J and About I (2012). Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J* **45**, 439-448.
- Lee BN, Lee KN, Koh JT et al. (2014). Effects of 3 endodontic bioactive cements on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J Endod* **40**, 1217-1222.
- Li D, Fu L, Zhang Y et al. (2014). The effects of LPS on adhesion and migration of human dental pulp stem cells in vitro. *J Dent* **42**, 1327-1334.
- Lipton A, Klinger I, Paul D and Holley RW (1971). Migration of mouse 3T3 fibroblasts in response to a serum factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 2799-2801.
- Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S and He WX (2014). Effect of Biodentine on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent* **42**, 490-497.
- Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornelio AL, Salles LP, Bernardi MI and Guerreiro-Tanomaru JM (2014). Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement associated with niobium oxide micro and nanoparticles. *J Appl Oral Sci* **22**, 554-559.
- Neelakantan P, Grotra D and Sharma S (2013). Retreatability of 2 mineral trioxide aggregate-based root canal sealers: a cone-beam computed tomography analysis. *J Endod* **39**, 893-896.
- Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M et al. (2013). Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod* **39**, 743-747.
- Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT and Pozza DH (2007). Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J* **18**, 3-7.
- Ozkurt Z and Kazazoglu E (2011). Zirconia dental implants: a literature review. *J Oral Implantol* **37**, 367-376.
- Parfitt AM (1976). The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone disease. Part IV of IV parts: The state of the bones in uremic hyperparathyroidism--the mechanisms of skeletal

resistance to PTH in renal failure and pseudohypoparathyroidism and the role of PTH in osteoporosis, osteopetrosis, and osteofluorosis. *Metabolism* **25**, 1157-1188.

Rodan GA and Noda M (1991). Gene expression in osteoblastic cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **1**, 85-98.

Salles LP, Gomes-Cornelio AL, Guimaraes FC et al. (2012). Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod* **38**, 971-976.

Shapira L, Klinger A, Tadir A, Wilensky A and Halabi A (2009). Effect of a niobium-containing titanium alloy on osteoblast behavior in culture. *Clin Oral Implants Res* **20**, 578-582.

Simon S, Smith AJ, Lumley PJ et al. (2009). Molecular characterization of young and mature odontoblasts. *Bone* **45**, 693-703.

Spector JA, Mehrara BJ, Greenwald JA et al. (2001). Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C72-80.

Torabinejad M, Hong CU, McDonald F and Pitt Ford TR (1995). Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* **21**, 349-353.

VanGuilder HD, Vrana KE and Freeman WM (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* **44**, 619-626.

Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J and Tanomaru-Filho M (2014). Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *Int Endod J* **47**, 437-448.

Viapiana R, Guerreiro-Tanomaru JM, Hungaro-Duarte MA, Tanomaru-Filho M and Camilleri J (2014). Chemical characterization and bioactivity of epoxy resin and Portland cement-based sealers with niobium and zirconium oxide radiopacifiers. *Dent Mater* **30**, 1005-1020.

Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF and Sipert CR (2013). In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex(R) and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J* **24**, 111-116.

Yuan Z, Peng B, Jiang H, Bian Z and Yan P (2010). Effect of bioaggregate on mineral-associated gene expression in osteoblast cells. *J Endod* **36**, 1145-1148.

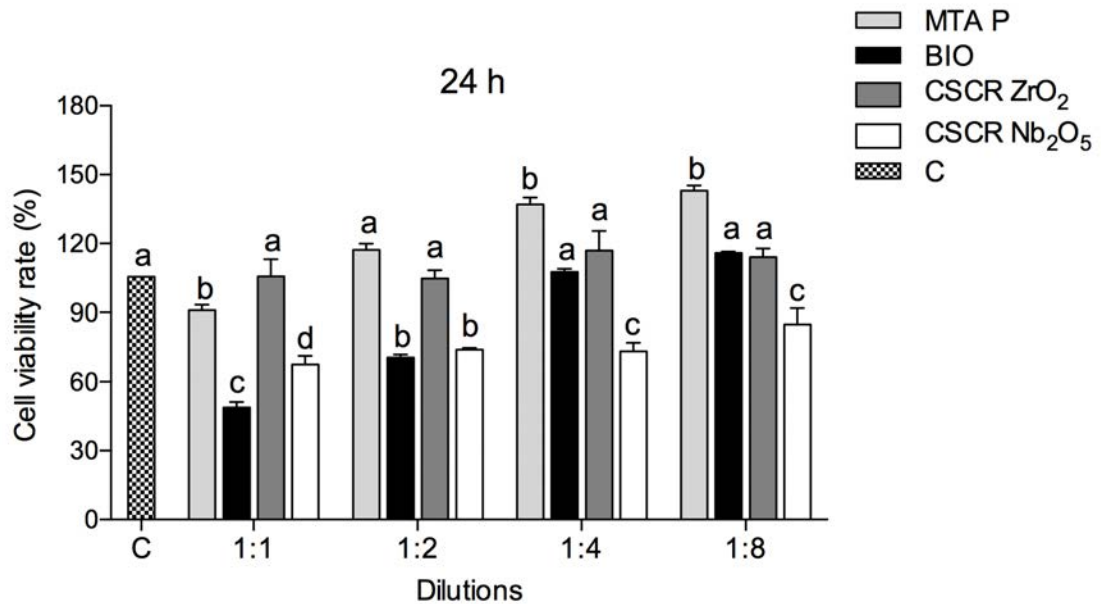
Zanini M, Sautier JM, Berdal A and Simon S (2012). Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod* **38**, 1220-1226.

Tabela 1. Materiais utilizados e proporção.

Material	Fabricante/ Proporção
CSCR (Cimento de silicato de cálcio resinoso) + 30% Zr ₂ O	Ligatex Ind. e Com. Ltda., Rio Claro, SP, Brasil Proporção: 1g - 235µl
CSCR (Cimento de silicato de cálcio resinoso) + 30% Nb ₂ O ₅	Ligatex Ind. e Com. Ltda., Rio Claro, SP, Brasil Proporção: 1g - 380µl
MTA Plus	Avalon Biomed Inc., Bradenton, FL, USA Proporção: relação água destilada-pó 0.35
Biodentine	Septodont, Saint-Maur-des-fosses's, France Proporção: 1g – 1 ampola água destilada

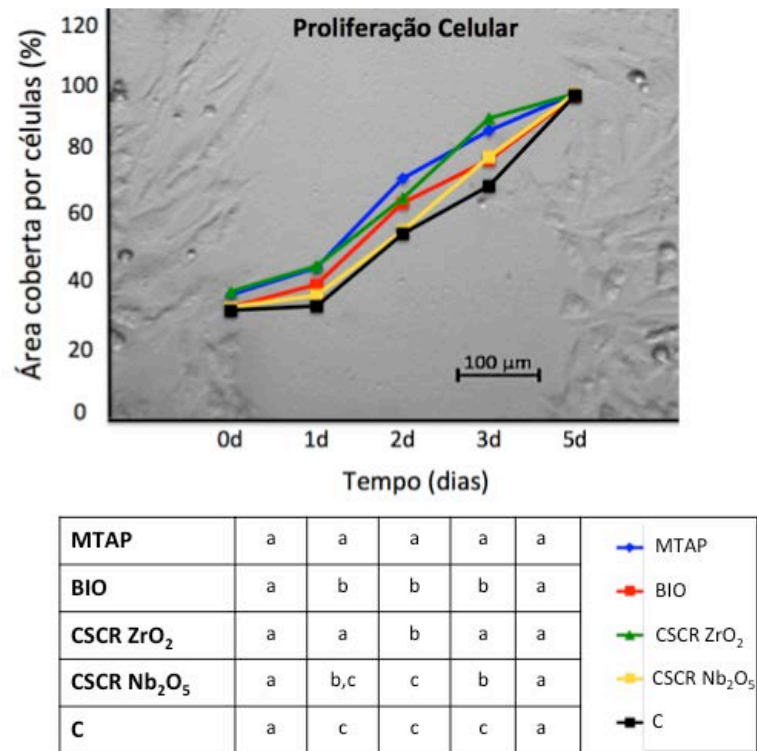
Figuras

Figura 1.



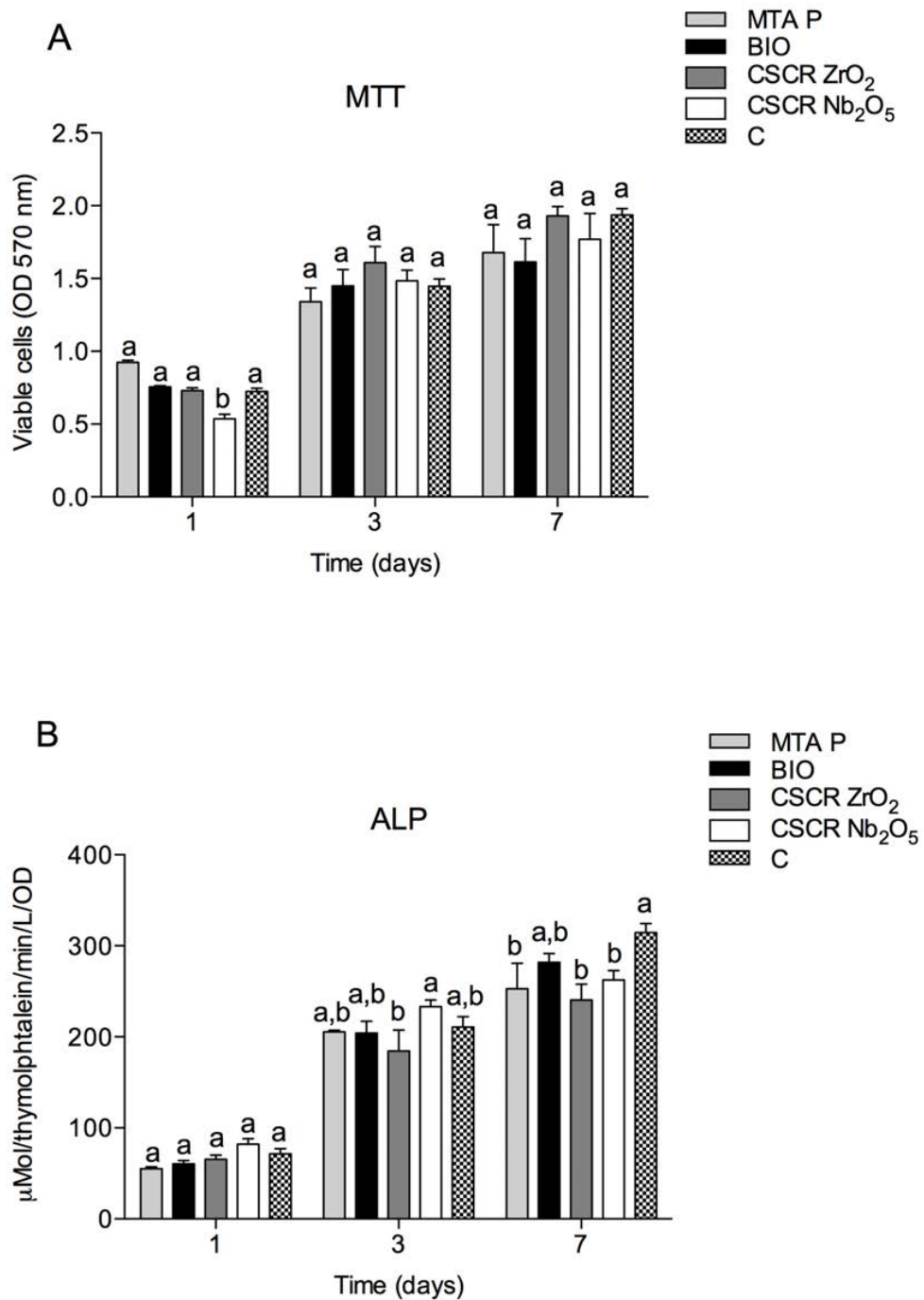
Viabilidade celular de Saos-2 com os eluídos dos cimentos nas diferentes diluições (1:1; 1:2; 1:4 e 1:8) no período de 24 horas. MTA P representa o MTA Plus, BIO o Biodentine, CSCR ZrO₂ (Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% óxido de zircônio), CSCR Nb₂O₅ (Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% óxido de nióbio) e C representa o controle negativo (células sem tratamento). Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre si dentro da mesma concentração, comparando-os ao controle. ($P < 0.05$).

Figura 2.



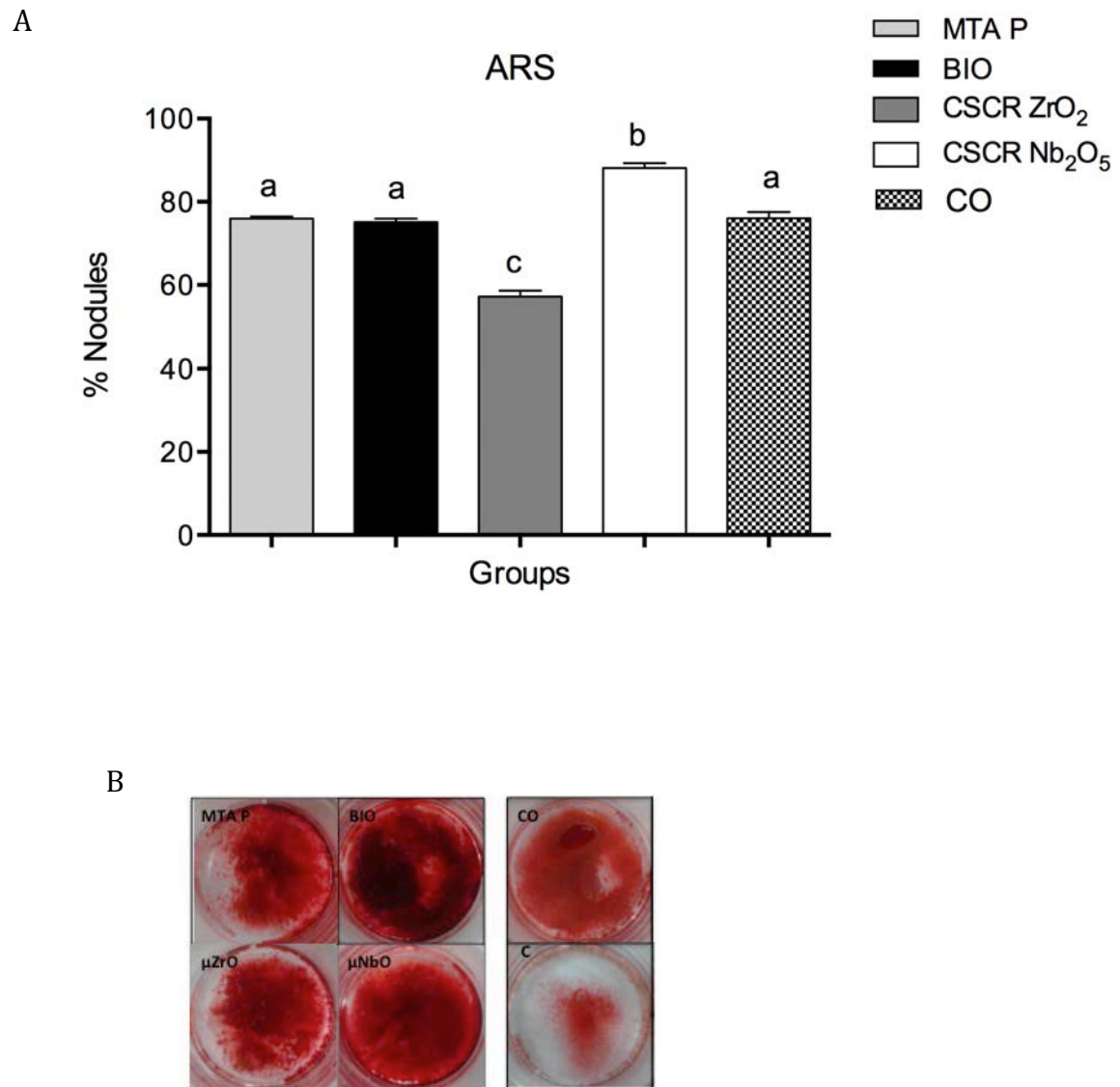
Ensaio de proliferação celular sobre as células Saos-2 após a exposição ao eluído dos materiais na diluição 1:8 nos períodos de 1, 2, 3 e 5 dias. MTA P indica o cimento MTA Plus, BIO o Biodentine, CSCR + ZrO₂ (Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% de óxido de zircônio), CSCR + Nb₂O₅ (Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% de óxido de bismuto). Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre si, dentro do mesmo período. C representa o controle negativo.

Figura 3.



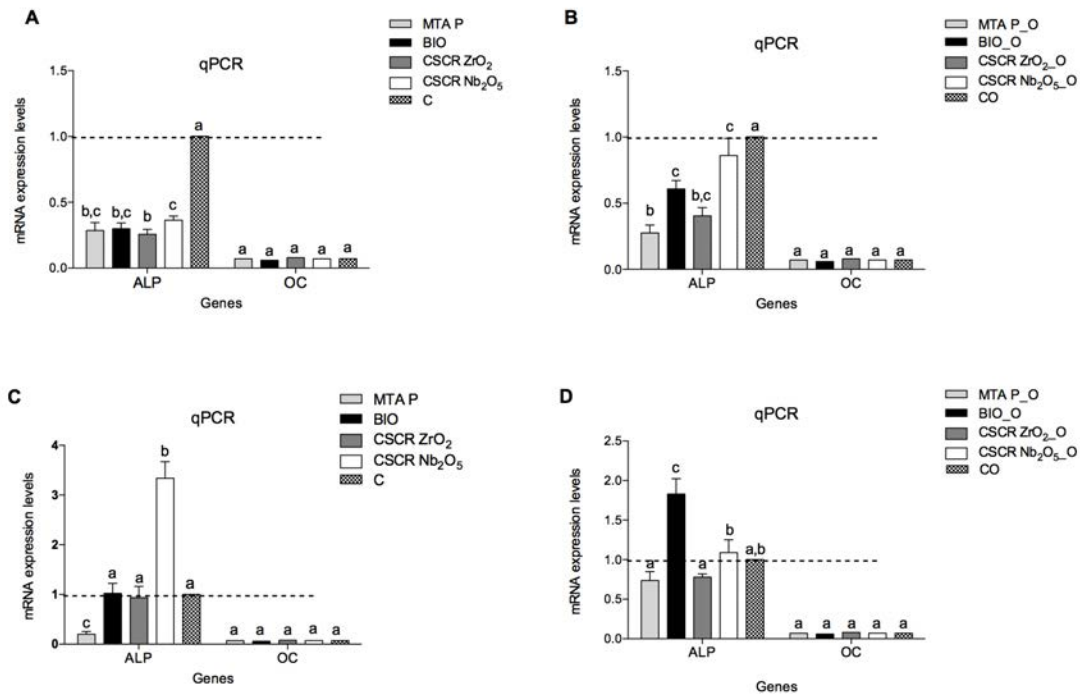
Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP) em relação a viabilidade celular de Saos-2 após exposição ao eluído dos cimentos na concentração de 1:8 em 1, 3 e 7 dias. MTA P indica o MTA Plus, BIO indica o cimento Biodentine, CSCR ZrO₂ (Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% Zr₂O), CSCR Nb₂O₅ (Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% Nb₂O₅). Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre si, dentro do mesmo período de tempo. C representa o grupo controle.

Figura 4.



A. Porcentagem de nódulos de mineralização para Saos-2 após exposição aos eluídos dos cimentos na concentração 1:8 durante 21 dias em meio osteogênico. MTA P representa o MTA Plus, BIO, o Biodentine, CSCR ZrO₂ (Cimento de silicato de cálcio + 30% de óxido de zircônio) e CSCR Nb₂O₅ (Cimento de silicato de cálcio + 30% de óxido de nióbio). CO representa o controle osteogênico e C o controle normal. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre si. **B.** Aspecto dos Nódulos de mineralização formados após 21 dias em cultura.

Figura 5.



Níveis de expressão de RNAm dos genes alvo em células Saos-2, após exposição ao eluído dos cimentos na concentração 1:8 durante 1 e 3 dias. ALP, gene fosfatase alcalina, OC, gene osteocalcina. A e B representam 1 dia de exposição em meio convencional (A) e meio osteogênico (B). C e D representam 3 dias de exposição em meio convencional (C) e osteogênico (D). MTA P Representa o MTA Plus e MTA P_O, MTA Plus osteogênico, BIO o Biodentine, e BIO_O o Biodentine osteogênico, CSCR ZrO₂ (Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% óxido de zircônio) e CSCR ZrO₂_O (Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% óxido de zircônio em meio osteogênico) e CSCR Nb₂O₅ (Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% óxido de nióbio) e CSCR Nb₂O₅_O (Cimento de silicato de cálcio resinoso + 30% de óxido de nióbio em meio osteogênico). C representa o controle e CO o controle osteogênico.

7 DISCUSSÃO

Considerando-se que a composição base do MTA é o cimento Portland (CP), utilizado na engenharia civil⁴⁸, estudos para formulação de um novo cimento a base de silicato de cálcio são propostos. Além do cimento de silicato de cálcio puro (CSC), o CSCM (modificado) e mais 3 resinosos (CSCR1, CSCR2 e CSCR3) foram inicialmente estudados quanto à cito e genotoxicidade em cultura de Saos-2. Os cimentos puros (sem o agente radiopacificador) foram analisados quanto à citotoxicidade, tipo de morte celular e genotoxicidade como critérios de seleção no cap.1, já que são materiais á base de CP, e podendo conter metais pesados ou outras substâncias genotóxicas, comprometendo a possibilidade de uso clínico. A escolha dos dois melhores (CSCM e CSCR2), levando em consideração principalmente a resposta ao teste de genotoxicidade avaliada através do teste Cometa foi usado para a continuidade dos testes com adição de radiopacificadores.

Apesar das propriedades físicas, mecânicas e biológicas dos CPs e MTA se mostrarem semelhantes^{12,17,40}, há uma ampla sugestão de radiopacificadores para estes cimentos a base de silicato de cálcio, para possibilitar a sua utilização na prática clínica. No segundo capítulo: óxido de zircônio (ZrO_2) e óxido de nióbio (Nb_2O_5) foram avaliados nas formas micro (μ) e nanoparticuladas (η), além do óxido de bismuto (Bi_2O_3) e tungstato de cálcio ($CAWO_4$). O Bi_2O_3 (radiopacificador do MTA), não apresentou bons resultados em nosso estudo, principalmente em relação a bioatividade, produção de ALP e nódulos de mineralização. Suas desvantagens já tinham sido relatadas por outros estudos^{7,9}. Já óxido de zircônio (ZrO_2) e óxido de nióbio (Nb_2O_5), apresentaram os melhores resultados, nas forma micro e nanoparticulada. Ainda, nos ensaios de bioatividade, como produção de ALP, qPCR e vermelho de Alizarina, o óxido de nióbio se destacou, corroborando com estudo de Viapiana et al.⁴⁹ que demonstram potencial bioativo para este material. Outros estudos também indicam excelentes propriedades ao óxido de zircônio e nióbio^{3,37,38}. Embora as formas micro e nanoparticuladas tenham demonstrado resultados similares, estudos adicionais com formas nanoparticuladas devem ser conduzidos para complementar as informações do presente estudo, especialmente quanto a tentativa de melhorar a incorporação das substâncias durante a hidratação do material.

A maioria dos materiais retrobturadores suprimem o crescimento de vários tipos de células^{23,30}, mas o mecanismo exato ainda é vago. O crescimento celular é estritamente regulado por progressão do ciclo celular, e a desregulação deste ciclo por agentes tóxicos normalmente levam à inibição do crescimento, a citotoxicidade, e mesmo a apoptose¹⁴. No entanto, pouco se sabe sobre se a citotoxicidade de materiais retrobturadores é causada pela desregulação do ciclo celular. Assim, tentamos compreender melhor os mecanismos de morte celular que ocorre com os novos materiais, por meio de testes de citotoxicidade, qPCR investigando genes importantes que participam do processo de apoptose (BAX e BCL2) e teste de genotoxicidade através do ensaio Cometa. Comparamos no capítulo 3, os materiais experimentais que se destacaram na fase anterior (CSCR ZrO₂ e CSCR Nb₂O₅) com os comerciais Biodentine e MTA Plus, que tem se destacado pelas excelentes propriedades biológicas e manipulação. Apesar de nas primeiras horas os materiais mostrarem citotoxicidade, esta foi sendo eliminada com o passar dos períodos, e em 72h e 7 dias, vimos que todos os materiais foram semelhantes ao controle. Também não foram genotóxicos, mostrando biocompatibilidade in vitro. Pelos ensaios de bioatividade (capítulo 4), também pudemos concluir que os materiais tem grande potencial reparador e mineralizador, quando estimularam a produção de ALP tanto pela avaliação com kit para análise, quanto por qPCR, e nódulos de mineralização. Quando comparados aos cimentos comerciais Biodentine e MTA Plus, que já vem demonstrando bioatividade^{6,15}, vimos que principalmente o CSCR Nb₂O₅ se assemelhou ou foi superior a estes em testes bioativos, mostrando excelentes resultados e um grande potencial para uso clínico.

As metodologias propostas neste estudo permitiram uma análise in vitro de novas propostas de materiais a base de silicato de cálcio, com grande potencial para novos estudos. Propriedades físico-químicas e mecânicas estão sendo avaliadas por nosso grupos de pesquisa, assim como outros testes futuros são necessários, como testes in vivo, visando o desenvolvimento e adequação de novos materiais reparadores.

8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

1. Todos os cimentos à base de silicato de cálcio experimentais mostraram viabilidade celular pelo MTT. CSC e CSCR2 apresentaram melhor resposta na avaliação da apoptose e genotoxicidade com potencial para uso como materiais reparadores.
2. Os materiais CSCM e CSCR, principalmente nas associações com μZrO_2 , ηZrO_2 , $\mu\text{Nb}_2\text{O}_5$ e $\eta\text{Nb}_2\text{O}_5$ podem ser considerados potenciais materiais reparadores.
3. Os materiais à base de silicato de cálcio experimentais (CSCR ZrO_2 e CSCR Nb_2O_5) e os comerciais (Biodentine e MTA Plus) foram citocompatíveis, não foram genotóxicos e apresentaram mecanismo de morte celular associado a apoptose.
4. Biodentine (Septodont) e MTA Plus (Avalon) e o cimento experimental de silicato de cálcio resinoso (CSCR) acrescido de óxido de zircônio (ZrO_2) ou óxido de nióbio (Nb_2O_5) mostraram potencial bioativo.
5. Os materiais experimentais avaliados à base de silicato de cálcio acrescidos de óxido de zircônio e óxido de nióbio apresentam potencial biológico para ser utilizado como material reparador, sendo semelhantes aos materiais Biodentine e MTA Plus.

REFERÊNCIAS *

1. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod.* 2006; 32(9): 897-900.
2. Braz MG, Marcondes JP, Matsumoto MA, Duarte MA, Salvadori DM, Ribeiro DA. Genotoxicity in primary human peripheral lymphocytes after exposure to radiopacifiers in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19(2): 601-5.
3. Camilleri J, Cutajar 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. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. *Int Endod J.* 2010; 43(3): 231-40.
5. Camilleri J, Formosa L, Damidot D. The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J.* 2013; 46(9): 831-40.
6. Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *J Endod.* 2014; 40(8): 1194-200.
7. 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.
8. Corral Nunez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. *J Endod.* 2014; 40(3): 406-11.
9. 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.
10. De-Deus G, de Souza MC, Sergio Fidel RA, Fidel SR, de Campos RC, Luna AS. Negligible expression of arsenic in some commercially available brands of Portland cement and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2009; 35(6): 887-90.

11. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J*. 2005; 38(9): 604-9.
12. Dreger LA, Felipe WT, Reyes-Carmona JF, Felipe GS, Bortoluzzi EA, Felipe MC. Mineral trioxide aggregate and Portland cement promote biomineralization in vivo. *J Endod*. 2012; 38(3): 324-9.
13. Duarte MA, De Oliveira Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, De Campos Fraga S. Arsenic release provided by MTA and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 99(5): 648-50.
14. Eastman A, Rigas JR. Modulation of apoptosis signaling pathways and cell cycle regulation. *Semin Oncol*. 1999; 26(5 Suppl 16): 7-16; discussion 41-2.
15. Eid AA, Gosier JL, Primus CM, Hammond BD, Susin LF, Pashley DH, et al. In vitro biocompatibility and oxidative stress profiles of different hydraulic calcium silicate cements. *J Endod*. 2014; 40(2): 255-60.
16. Eisenbarth E, Velten D, Muller M, Thull R, Breme J. Nanostructured niobium oxide coatings influence osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 79(1): 166-75.
17. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J*. 2000; 11(1): 3-9.
18. Funteas UR, Wallace JA, Fochtman EW. A comparative analysis of Mineral Trioxide Aggregate and Portland cement. *Aust Endod J*. 2003; 29(1): 43-4.
19. Gillani R, Ercan B, Qiao A, Webster TJ. Nanofunctionalized zirconia and barium sulfate particles as bone cement additives. *Int J Nanomedicine*. 2010; 5: 1-11.
20. Gomes Cornelio 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(2): 203-10.
21. Goncalves JL, Viapiana R, Miranda CE, Borges AH, Cruz Filho AM. Evaluation of physico-chemical properties of Portland cements and MTA. *Braz Oral Res*. 2010; 24(3): 277-83.

22. Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, et al. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2007; 33(12): 1450-4.
23. Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nor JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages in vitro. *Int Endod J.* 2005; 38(2): 137-43.
24. Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabe PF, Otoboni Filho JA, et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J.* 2001; 12(2): 109-13.
25. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabe PF, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J.* 2001; 12(1): 3-8.
26. Holland R, Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Junior ED. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod.* 2001; 27(4): 281-4.
27. Hungaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivan RR, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru Filho M, de Moraes IG. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod.* 2009; 35(5): 737-40.
28. Jafarnia B, Jiang J, He J, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Evaluation of cytotoxicity of MTA employing various additives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107(5): 739-44.
29. Ji DY, Wu HD, Hsieh SC, Teng NC, Chen CC, Ke ES, et al. Effects of a novel hydration accelerant on the biological and mechanical properties of white mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2011; 37(6): 851-5.
30. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2000; 26(5): 288-91.
31. Lee BN, Lee KN, Koh JT, Min KS, Chang HS, Hwang IN, et al. Effects of 3 endodontic bioactive cements on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J Endod.* 2014; 40(8): 1217-22.
32. Lee SJ, Chung J, Na HS, Park EJ, Jeon HJ, Kim HC. Characteristics of novel root-end filling material using epoxy resin and Portland cement. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(3): 1009-15.

33. Liu X, Huang A, Ding C, Chu PK. Bioactivity and cytocompatibility of zirconia (ZrO₂) films fabricated by cathodic arc deposition. *Biomaterials*. 2006; 27(21): 3904-11.
34. Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He WX. Effect of Biodentine on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent*. 2014; 42(4): 490-7.
35. Matsunaga T, Tsujimoto M, Kawashima T, Tsujimoto Y, Fujiwara M, Ookubo A, et al. Analysis of arsenic in gray and white mineral trioxide aggregates by using atomic absorption spectrometry. *J Endod*. 2010; 36(12): 1988-90.
36. Mestieri LB, Tanomaru-Filho M, Gomes-Cornelio 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.
37. Miyazaki T, KH KT, Ohtsuki C, Nakamura N. Apatite-forming ability of nionium oxide gels in a simulated body fluid. *J Ceram Soc Jpn*. 2001; 109: 923-33.
38. Miyazaki TK, Kokubo T, Kato H, Nakamura N, Ohtsuki C. Bonelike apatite formation on nionium oxide gel in a simulated body fluid. *Bioceramics*. 2001; 23(3): 827-32.
39. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.
40. Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J*. 2007; 18(1): 3-7.
41. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 2010; 36(1): 16-27.
42. Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, Marques ME, Salvadori DM. Biocompatibility in vitro tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod*. 2005; 31(8): 605-7.
43. Biodentine™ [bula]. Saint-Maur-des-Fossés Cedex, France R&D Department: Septodont; 2010.

44. 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(1): 12-8.
45. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod.* 2010; 36(7): 1210-5.
46. Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *J Endod.* 2007; 33(7): 836-9.
47. Tanomaru-Filho M, Chaves Faleiros FB, Sacaki JN, Hungaro Duarte MA, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2009; 35(10): 1418-21.
48. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995; 21(7): 349-53.
49. 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(9): 1005-20.
50. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm.* 2005; 288(2): 369-76.
51. Yan P, Yuan Z, Jiang H, Peng B, Bian Z. Effect of bioaggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J.* 2010; 43(12): 1116-21.
52. Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod.* 2008; 34(9): 1057-60.
53. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex(R) and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J.* 2013; 24(2): 111-6.

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 30/3/2017.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 30 de março de 2015.

ANA LÍVIA GOMES CORNÉLIO