

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

FELIPE FAUSTINO DE MELO

**BIOATIVIDADE E ATIVIDADE INDUTORA DE
MINERALIZAÇÃO DE MATERIAIS À BASE DE
SILICATO DE CÁLCIO ASSOCIADOS AO ÓXIDO DE
ZIRCÔNIO E AO ÓXIDO DE NIÓBIO**

BAURU
2018

FELIPE FAUSTINO DE MELO

**BIOATIVIDADE E ATIVIDADE INDUTORA DE
MINERALIZAÇÃO DE MATERIAIS À BASE DE
SILICATO DE CÁLCIO ASSOCIADOS AO ÓXIDO DE
ZIRCÔNIO E AO ÓXIDO DE NIÓBIO**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da
Universidade do Sagrado Coração, como parte
dos requisitos para obtenção do título de bacharel
em Odontologia, sob orientação do Prof. Dr.
Guilherme Ferreira da Silva.

BAURU
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com
ISBD

Melo, Felipe Faustino de

M528b

Bioatividade e atividade indutora de mineralização de materiais à base de silicato de cálcio associados ao óxido de zircônio e ao óxido de nióbio / Felipe Faustino de Melo. -- 2018.

32f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia)
- Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Mineral Trióxido Agregado. 2. Silicato de cálcio. 3. Expressão gênica. 4. Bioatividade. I. Silva, Guilherme Ferreira da. II. Título.

FELIPE FAUSTINO DE MELO

**BIOATIVIDADE E ATIVIDADE INDUTORA DE
MINERALIZAÇÃO DE MATERIAIS À BASE DE
SILICATO DE CÁLCIO ASSOCIADOS AO ÓXIDO DE
ZIRCÔNIO E AO ÓXIDO DE NIÓBIO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia, sob orientação do Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva.

Bauru, 27 de novembro de 2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Danieli Colaço Ribeiro Siqueira
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. Joel Ferreira Santiago Junior
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. Raquel Zanin Midena
Universidade do Sagrado Coração

Dedico esse trabalho aos meus pais, meus exemplos de honestidade, ao meu irmão, sendo companheiro em todas as horas e a minha futura esposa, a luz da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Nestas palavras de agradecimentos, as escrevo emocionado, por toda luta e dificuldades enfrentadas para alcançar e concluir esta etapa. Primeiramente, agradeço a Deus, por ter sido tão misericordioso e benevolente para comigo, por ter vindo sempre ao meu encontro, onde nas horas mais difíceis meus joelhos tocavam o chão e sua ajuda resplandecia do céu. Assim como nunca me deixou só, confundido ou envergonhado. Toda honra e toda glória só a Deus pertence!

Agradeço a minha mãe, **Marcia de Paula Martins Melo**, a peça essencial para minha formação, a mulher que nunca mediu esforços para que eu chegasse até aqui, trabalhando duro para que eu pudesse ter condições de estudar, passando por cima de dores e problemas de saúde, sendo sempre um exemplo de superação, de mulher e de honestidade. Uma cara serva de Deus, a qual eu me orgulho ao chama-la de mãe, ao chama-la de “Dona Marcia”. O anjo que me gerou, me criou e amou incondicionalmente, a mulher mais importante da minha vida. Meu pai, **José Faustino de Melo**, valente e trabalhador, um homem que batalhou muito na vida, sempre me ensinou os princípios e valores de um homem de verdade. Um verdadeiro companheiro, exemplo de esposo, de pai, de um temente servo de Deus. Aquele na vida tanto me ensinou, sempre esteve ao meu lado de ouvidos atentos para escutar minhas histórias. Ao lado da minha mãe, sendo seu braço direito, batalhou para que eu e meu irmão pudéssemos chegar onde nós chegamos e ser quem somos hoje. Serei eternamente grato por todo dia de serviço que tiveram, mesmo enfermos, com dores e cansados pelas dificuldades da vida, não desistiram de mim. Ao meu irmão, **Guilherme Faustino de Melo**, meu melhor amigo desde o princípio da minha existência. Mesmo quando todos se afastaram, quando eu olhava ao meu redor e não via amigos ou companheiros, sempre esteve lá para me ajudar, me defendeu em todas minhas guerras, me protegia como um filho, me amava como um pai e me guarda como um anjo. Mesmo com todos os momentos difíceis que são comuns em irmandades, sempre esteve comigo e foi fundamental para minha formação, pessoal e profissional.

Agradeço a minha amada, **Victoria Ynara Vidal de Souza**, minha futura esposa, companheira e ajudadora. Aquela que me fez de menino, um homem. Me ajudou a crescer e amadurecer, valorizar as responsabilidades e princípios da vida. Em meio a todas as tempestades, sempre foi minha calma, sendo a pessoa de onde emanava minha força, minha alegria e esperança. Esteve comigo em minhas conquistas e sempre as enalteceu, valorizando e prestigiando cada vitória. Uma cara serva de Deus, me apoiando espiritualmente, onde quando

nossos joelhos dobraram juntos, nossos corações sempre se alegraram. Fez de mim um homem melhor, me incentiva a lutar pelos meus objetivos e sempre oferecer meu melhor ao mundo. Esta é a mulher que eu quero ter ao meu lado por cada dia da minha existência.

Agradeço ao **Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva**, por toda ajuda durante a graduação, a pesquisa de iniciação científica e o Trabalho de Conclusão de Curso. O carinho e a confiança que teve em mim, assim como a oportunidade que me ofereceu. Oportunidade essa que serei eternamente grato e devedor, pois foi uma parte fundamental para meu aperfeiçoamento como estudante e futuro profissional. A **Prof^a. Dr^a. Danieli Colaço Ribeiro Siqueira** e a **Prof^a. Dr^a. Raquel Zanin Midená**, por aceitarem o convite de avaliação deste presente trabalho e pela ajuda durante o processo de graduação. Sendo esses três excelentes professores, minhas inspirações na Endodontia.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar a possível capacidade de indução de mineralização e a bioatividade de um cimento de silicato de cálcio (TSC) associado ao óxido de zircônio (Zr_2O) ou ao óxido de nióbio (Nb_2O_5), utilizados como radiopacificadores. Os materiais foram manipulados e inseridos em tubos de dentina; os animais foram anestesiados e os tubos foram implantados no tecido subcutâneo dos ratos, preenchidos com MTA, TSC+ ZrO_2 , TSC+ Nb_3O_5 . Após 7 e 60 dias, as cápsulas foram usadas para investigar a expressão gênica da fosfatase alcalina (Alpl), osterix (Sp7) e osteocalcina (Bglap). Por outro lado, os tubos de dentina foram removidos e submetidos ao processamento para análise da superfície e da interface dentina/cimento em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Todos os dados obtidos foram submetidos ao two-way ANOVA e ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os resultados mostraram que a expressão gênica de fosfatase alcalina (Alpl), osteocalcina (Bglap) e osterix (Sp7) ocorreu nas cápsulas adjacentes aos implantes de todos os grupos após 7 dias. Aos 60 dias, houve somente a expressão dos genes da fosfatase alcalina e da osteocalcina. A análise por MEV evidenciou nos materiais foi observada a presença de uma camada mineralizada na interface dentina/material. Diante disso, pode-se concluir que os materiais apresentam bioatividade uma vez que induzem a expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina, proteínas relacionadas à mineralização, na cápsula adjacente aos implantes e promovem a formação de hidroxiapatita em sua superfície.

Palavras-chave: Mineral Trióxido Agregado. Silicato de cálcio. Expressão Gênica. Bioatividade

ABSTRACT

The objective of the present study was to investigate the possible mineralization and bioactivity induction of a calcium silicate cement (TSC) associated with zirconium oxide (Zr₂O) or niobium oxide (Nb₂O₅), used as radiopacifiers. The materials were manipulated and inserted in dentin tubes; the animals were anesthetized and the tubes were implanted into rat subcutaneous tissue, filled with MTA, TSC + ZrO₂, TSC + Nb₃O₅. After 7 and 60 days, the capsules were used to investigate the gene expression of alkaline phosphatase (Alpl), osterix (Sp7) and osteocalcin (Bglap). On the other hand, the dentine tubes were removed and submitted to processing for surface analysis and dentin / cement interface in scanning electron microscopy (SEM). All data were submitted to two-way ANOVA and Tukey's test ($p \leq 0.05$). The results showed that the gene expression of alkaline phosphatase (Alpl), osteocalcin (Bglap) and osterix (Sp7) occurred in the capsules adjacent to the implants of all groups after 7 days. At 60 days, there was only expression of the alkaline phosphatase and osteocalcin genes. The analysis by MEV evidenced in the materials was observed the presence of a mineralized layer at the interface dentin / material. Thus, it can be concluded that the materials present bioactivity since they induce the expression of alkaline phosphatase and osteocalcin, mineralization-related proteins, in the capsule adjacent to the implants and promote the formation of hydroxyapatite on its surface.

Keywords: Mineral Trioxide Aggregate; calcium silicate; gene expression; bioactivity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2. OBJETIVO	15
3. JUSTIFICATIVA.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 MÉTODOS DE ANÁLISE	19
4.1.1 Expressão gênica	19
4.1.2. Análise da interface dentina/material.....	19
4.1.3. Análise estatística	20
5. RESULTADOS.....	21
6. DISCUSSÃO.....	25
REFERÊNCIAS	27
ANEXOS.....	32

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) tem sido considerado o material de escolha no selamento das comunicações entre a cavidade pulpar e o periodonto (Lee et al., 1993; Parirokh, Torabinejad 2010) podendo ser utilizado, portanto, em várias situações clínicas, tais como, no preenchimento de cavidades retrogradadas, no selamento de perfurações radiculares e como tampão apical em dentes com rizogênese incompleta (Parirokh, Torabinejad 2010).

Uma das vantagens frequentemente atribuída ao MTA é sua biocompatibilidade quando comparado a outros produtos comercialmente disponíveis (Torabinejad et al., 1997; Silva et al., 2011; Viola et al., 2012). Estudos *in vivo* mostraram que o MTA é capaz de induzir a formação de osso, dentina e cimento, favorecendo a reparação do periodonto (Torabinejad et al., 1997; Baek et al., 2005; Silva et al., 2011). Tem sido reportado que, em tecido subcutâneo de ratos, este material induz uma reação inflamatória moderada (Viola et al., 2012; Silva et al., 2015).

Além disso, estudos têm sugerido que o MTA é um material bioativo por induzir a deposição de cristais com características semelhantes à apatita (Sarkar et al., 2005; Reyes-Carmona et al., 2009; Reyes-Carmona et al., 2010; Dreger et al., 2012; Niu et al., 2014). Em contato com a dentina, o MTA promove um processo de biomineralização que ocasiona a formação de uma camada na interface dentina-MTA com estruturas semelhantes à *tags* (Reyes-Carmona et al., 2009; Reyes-Carmona et al., 2010). A formação destes depósitos torna-se maior ao longo do tempo, resultando em uma camada maior e mais compacta (Reyes-Carmona et al., 2010; Dreger et al., 2012).

O MTA é essencialmente composto por um cimento à base de silicato de cálcio (SC), acrescido de óxido de bismuto (OB), utilizado como radiopacificador, em uma proporção de 4:1, respectivamente (Torabinejad, White 1995; Wucherpfennig, Green 1999; Estrela et al., 2000; Camilleri et al., 2005; Oliveira et al., 2007). A partir da constatação de que o MTA e o cimento Portland (CP), um cimento de silicato de cálcio, possuem composições semelhantes, estudos têm sido realizados comparando as propriedades físicas, químicas e biológicas destes materiais (Wucherpfennig, Green 1999; Estrela et al., 2000, Holland et al., 2001). Estrela et al. (2000) demonstraram que o MTA e o cimento Portland apresentam atividade antimicrobiana semelhantes. Além disso, estudos recentes reportaram que cimento Portland é um material

biocompatível, ou seja, não é genotóxico e não induz morte celular (Ribeiro et al., 2006); o cimento Portland não apresenta citotoxicidade e não permite o crescimento e adesão celular (Min et al., 2007). Este cimento também é capaz de estimular a formação de tecido mineralizado (Saidon et al., 2003) e, em tecido subcutâneo de ratos, provoca reação inflamatória suave, semelhante ao MTA (Holland et al., 2001; Viola et al., 2012). Embora haja claras evidências que o CP apresenta excelentes propriedades biológicas, tanto na resposta tecidual quanto celular, este material apresenta em sua composição alguns metais pesados (Schembri et al., 2010; Chang et al., 2010) o que impede seu uso na prática clínica. No entanto, o cimento Portland, devido à semelhança na composição química com o MTA, sua ampla disponibilidade e baixo custo vem sendo utilizado em testes iniciais para o estudo de novos radiopacificadores para cimentos à base de silicato de cálcio ou similares (Camilleri 2010; Duarte et al., 2012; Viapiana et al., 2014; Silva et al., 2014).

O óxido de bismuto (Bi_2O_3) confere radiopacidade suficiente para o MTA ser distinguido das estruturas anatômicas adjacentes tais como dentina e osso alveolar (Tanomaru-Filho et al., 2008), porém, em relação às demais propriedades físicas, químicas e biológicas, este radiopacificador vem sendo questionado. Há evidências de que o Bi_2O_3 interfere no mecanismo de hidratação do MTA (Camilleri, 2007), promovendo falhas na microestrutura do cimento Portland o que, conseqüentemente, aumenta a porosidade, resultando, portanto, em uma diminuição da resistência do produto (Coosmarawamy et al., 2007; Tanomaru-Filho et al., 2012). Vivan et al. (2010) demonstraram que o MTA-Angelus® e a associação do CP ao Bi_2O_3 apresentam um percentual de solubilidade acima do recomendado para materiais retrobturadores (ANSI/ADA 1984) o que favorece a deterioração do material. Em relação à biocompatibilidade, tem sido comprovado que o óxido de bismuto interfere no crescimento celular (Camilleri et al., 2004) e, em cultura de células pulpaes humanas, aumenta a toxicidade do CP (Min et al., 2007).

Assim, outros radiopacificadores com alto número atômico têm sido investigados para serem associados ao CP em substituição ao óxido de bismuto. Estudos demonstraram que a associação do óxido de zircônio (Zr_2O) ao CP confere radiopacidade satisfatória (Bortoluzzi et al., 2009; Duarte et al., 2009; Duarte et al., 2012), acima do mínimo recomendado pela norma da ISO para materiais dentários (ISO, 2001). Há evidências também de que esta mistura fornece ao cimento Portland índices de liberação de cálcio e pH semelhantes ao do MTA-Angelus®; no entanto, a solubilidade do CP adicionado ao Zr_2O é inferior a observada para este MTA (Duarte

et al., 2012), cujo agente radiopacificador é o óxido de bismuto. Além disso, a adição de 30% de óxido de zircônio ao CP parece não interferir no mecanismo de hidratação deste cimento, proporcionando a liberação de íons cálcio (Camilleri et al., 2011) e resultando em um material com propriedades físicas e químicas semelhantes ao ProRoot MTA® (Cuttajar et al., 2011). Em relação à biocompatibilidade, foi observado que o CP associado ao Zr_2O não apresenta citotoxicidade sobre células do ligamento periodontal (Cornélio-Gomes et al., 2011).

Estudo recente demonstrou que a adição de 30% de óxido de zircônio ao cimento Portland proporciona um material com propriedades físicas, químicas e biológicas satisfatórias. Quando comparado ao CP associado ao óxido de bismuto, a mistura CP+ Zr_2O apresenta pH mais elevado e liberação de íons cálcio após 7, 14 e 28 dias e superior resistência a compressão. Além disso, a análise histológica e imuno-histoquímica para detecção de interleucina-6 da reação tecidual promovida pelo CP+ Zr_2O , em tecido subcutâneo de ratos, demonstrou que este material induz um processo inflamatório de menor intensidade quando comparado ao CP+ Bi_2O_3 (Silva et al., 2014).

O nióbio, por sua vez, tem sido utilizado na Odontologia em ligas de titânio de implantes osseointegrados devido a sua excelente biocompatibilidade e resistência a corrosão e desintegração (Denry et al., 2005; Nickenig et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que o nióbio tem a capacidade de promover a deposição de hidroxiapatita constituindo-se, portanto, em um material bioativo (Karlinsky et al., 2006). A utilização do óxido de nióbio (Nb_2O_5) como radiopacificador de materiais dentários vem sendo estudada (Leitune et al., 2013). A adição de Nb_2O_5 a um cimento endodôntico experimental confere propriedades físicas e químicas satisfatórias resultando em um aumento da radiopacidade e da microdureza (Leitune et al., 2013). Em relação à biocompatibilidade, o CP+ Nb_2O_5 induz uma reação inflamatória suave no tecido subcutâneo de ratos e é capaz de promover a deposição de estruturas Von Kossa positivas na cápsula adjacente aos implantes, sugerindo que este material propicia a formação de estruturas calcificadas (Silva et al., 2015).

Silva et al. (2015) estudaram a influência do Nb_2O_5 em algumas propriedades físicas, químicas e biológicas de um cimento de silicato de cálcio. Os autores observaram que esta associação resultou em um material com propriedades físicas e químicas satisfatórias, tais como, radiopacidade, tempo de presa, pH e liberação de íons cálcio. Além disso, foi verificado que o CP+ Nb_2O_5 induz uma reação inflamatória suave no tecido subcutâneo de ratos e é capaz de

promover a deposição de estruturas Von Kossa positivas na cápsula adjacente aos implantes, sugerindo que este material propicia a formação de estruturas calcificadas.

Para o desenvolvimento de novos materiais endodônticos, é etapa fundamental o estudo do comportamento biológico destes produtos. O implante em tecido subcutâneo de ratos tem sido amplamente utilizado para avaliar a resposta biológica provocada pelos diferentes materiais. Neste tipo de estudo, observa-se, inicialmente, uma agressão ao tecido conjuntivo adjacente aos implantes, caracterizada pela presença de diversas células inflamatórias. Estas células inflamatórias produzem e liberam diversos mediadores químicos, que são os moduladores da inflamação, tais como interleucina-1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e prostaglandinas – PGE2. Já foi demonstrado que o MTA e que materiais contendo cimento Portland associado a diferentes radiopacificadores induzem a um processo inflamatório intenso, exibindo numerosas células imunomarcadas à IL-6, no subcutâneo de ratos, após 7 dias de implantação. No entanto, uma redução significativa no número de células inflamatórias bem como no número de células IL-6 positivas foi verificada nas cápsulas após 15 dias de implantação no subcutâneo (Silva et al., 2014; Silva et al., 2015).

Após a fase de remoção de partículas de material e restos celulares remanescentes da fase aguda do processo inflamatório, ocorre a fase de reparação do tecido conjuntivo. Nesta fase, acompanhado pela diminuição do processo inflamatório, há a liberação de vários mediadores químicos importantes à reparação como, por exemplo, os fatores de crescimento que estimulam a proliferação, a migração, a diferenciação e a atividade celular (Consolaro, 2009). Quando o osso estiver envolvido, uma das fases da reparação será a formação de um novo tecido mineralizado.

A mineralização dos tecidos é um processo complexo que inclui diversos eventos celulares e a expressão e a interação de várias moléculas. A fosfatase alcalina é frequentemente utilizada como um marcador da atividade osteoblástica e dos seus precursores (Magnusson et al., 1999; Garnero, Delmas, 1996; Bonucci, Nanci, 2001). Esta enzima desempenha papel fundamental durante o processo de mineralização dos tecidos sendo relacionada, entre outras atividades, à precipitação de fosfato de cálcio e à síntese de matriz óssea (Register et al., 1986). Assim, foi reportado que a fosfatase alcalina está associada com a formação de tecidos mineralizados, incluindo osso alveolar, dentina e esmalte (Hoshi et al. 1997; Goseki-Sone et al. 1999; Hotton et al. 1999). Células semelhantes à odontoblastos (odontoblasts-like), diferenciadas a partir de células mesenquimais da polpa dentária, adjacentes à dentina terciária neoformada

exibiram também positividade à fosfatase alcalina (Tsukamoto-Tanaka et al. 2006). Outra proteína altamente expressa em tecidos mineralizados é a osteocalcina. Em tecido subcutâneo de ratos, osteocalcina e osteopontina, foram detectadas por imuno-histoquímica em fibroblastos na cápsula circundante ao MTA e ao CP no subcutâneo, principalmente, após 30 e 60 dias, sugerindo que estes materiais podem induzir as células mesenquimais a expressar fenótipo semelhante ao dos osteoblastos, contribuindo, portanto, no processo de reparação e mineralização dos tecidos (Viola, 2010; Viola et al., 2012).

Apesar dos resultados satisfatórios encontrados com a utilização do cimento Portland como constituinte principal de materiais alternativos ao MTA em relação à propriedades físicas, químicas e biológicas, sabe-se que o CP, pode apresentar metais pesados em sua composição (Schembri et al., 2010). Estes metais, incluindo arsênio, cromo e chumbo, são incorporados durante a produção do cimento e podem ser prejudiciais ao organismo (Neville, 1981; Achternbosch et al., 2003). Assim, a busca por um cimento de silicato tricálcio puro, ou seja, livre de impurezas e metais pesados, vem sendo realizada.

Estudos realizados com um cimento de silicato tricálcio sintetizado [(CaO)₃.SiO₂, Mineral Research Processing, Meyzieu, França] mostraram que este material é composto em 99% por (CaO)₃.SiO₂, apresenta pH alcalino (Camilleri, 2011) e uma maior bioatividade em comparação ao cimento Portland (Formosa et. al., 2012). Além disso, já foi verificado que este cimento de silicato tricálcio associado ao óxido de zircônio, como radiopacificador, demonstrou propriedades adequadas, tais como, solubilidade, radiopacidade, resistência à compressão, tempo de presa e microdureza (Grech et al., 2013). No entanto, até o momento, há poucos estudos sobre o comportamento biológico deste silicato tricálcio.

Assim, com o objetivo de desenvolvimento de um novo material dentário, torna-se oportuno, um estudo que avalie a influência, no processo de mineralização, de cimentos experimentais de silicato de cálcio sintetizado associado ao óxido de zircônio ou ao óxido de nióbio, por meio da investigação da expressão gênica e da bioatividade no tecido subcutâneo de ratos.

2. OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade indutora de mineralização e a bioatividade de um cimento de silicato de cálcio associado ao óxido de zircônio e ao óxido de nióbio, comparando-os ao MTA-Angelus®. Assim, pretendia-se, especificamente, avaliar:

A expressão gênica para fosfatase alcalina, osterix e osteocalcina na cápsula formada em resposta aos materiais implantados no tecido subcutâneo de ratos por meio do qPCR;

Se ocorre formação de estrutura mineralizada na interface dentina/material nos tubos preenchidos com os materiais e implantados no subcutâneo de ratos nos diferentes períodos.

3. JUSTIFICATIVA

Sabe-se que o óxido de bismuto, um radiopacificador, prejudica algumas propriedades do MTA, inclusive a biocompatibilidade do produto. Já foi demonstrado que outros radiopacificadores, como o óxido de zircônio e o óxido de nióbio, induzem uma reação inflamatória mais suave no subcutâneo de ratos em comparação ao MTA-Angelus.

Apesar dos resultados satisfatórios encontrados com a utilização do cimento Portland como constituinte principal de materiais alternativos ao MTA em relação à propriedades físicas, químicas e biológicas, sabe-se que o CP pode apresentar metais pesados em sua composição. Estes metais, incluindo arsênio, cromo e chumbo são incorporados durante a produção do cimento e podem ser prejudiciais ao organismo. Assim, a busca por um cimento de silicato tricálcio puro, ou seja, livre de impurezas e metais pesados, vem sendo realizada para o desenvolvimento de novos materiais dentários.

Diante destas considerações, e tendo em vista que estes materiais, quando em contato com o tecido ósseo devem induzir a mineralização, torna-se oportuno, portanto, avaliar a atividade indutora de mineralização e a bioatividade de um cimento de silicato de cálcio associado ao óxido de zircônio e ao óxido de nióbio, comparando-os ao MTA comercialmente disponível.

O caráter de desenvolvimento e inovação tecnológica se dá pelo estudo de um cimento experimental de silicato de cálcio (associado ao óxido de zircônio ou ao óxido de nióbio) inédito no mercado. A partir dos resultados obtidos, pretende-se aprofundar as pesquisas e desenvolver um novo material dentário com potencial para ser utilizado na prática clínica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo de pesquisa na experimentação animal foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual Paulista, Brasil (CEUA nº 26/2010-Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, anexo 1) e pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da Universidade Estadual Paulista, Brasil, sendo devidamente registrado na Plataforma Brasil (CAAE 38992814.1.0000.5416, anexo 2). Foram utilizados 40 ratos machos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*), pesando em média 250 g, os quais foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas, com ração e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos em grupos de acordo com o material testado e o período experimental. Os materiais que foram avaliados, no presente estudo, e seus respectivos fabricantes estão na tabela 1.

Tabela 1. Composição e fabricantes dos materiais avaliados

Materiais	Composição	Fabricantes
TSC+Zr ₂ O	70% de TSC* + 30% de óxido de zircônio**	* Mineral Research Processing, Meyzieu, França **Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA
TSC+Nb ₂ O ₅	70% de TSC + 30% de óxido de nióbio	* Mineral Research Processing, Meyzieu, França **Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA
MTA	MTA Angelus branco	Angelus, Londrina, Brasil

Seguindo metodologias previamente descritas (Perdigão et al., 1999; Reyes-Carmona et al., 2010; Dreger et al., 2012), tubos de dentina foram confeccionados a partir de dentes humanos extraídos, devidamente regularizados no Banco de Dentes Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara UNESP (anexo 3). Os tubos foram lavados em água destilada e

esterilizados. Imediatamente antes da implantação, os mesmos foram irrigados com EDTA 17%, seguido por hipoclorito de sódio 2,5%.

Feito isso, os materiais foram manipulados utilizando 1g do pó para 0,30 mL do líquido (água destilada) (Camilleri et al., 2011; Silva et al., 2014; Silva et al., 2015). Posteriormente, estes cimentos, previamente esterilizados pelo método ultravioleta por 30 minutos, foram manipulados e inseridos em tubos de dentina com 5 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro interno. Após o preenchimento dos tubos com os materiais, estes foram imediatamente implantados no tecido conjuntivo subcutâneo dorsal. Em cada animal, foram implantados dois tubos de dentina de materiais distintos. Para cada material, foram realizados 5 implantes nos diferentes períodos experimentais.

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de ketamina (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil), na dosagem de 80 mg/kg de peso corpóreo, associada com xilazina, (União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, SP, Brasil) dosagem de 4 mg/kg de peso corpóreo. Após a tricotomia e assepsia com solução de iodo a 5% da região dorsal do animal, foi realizada uma incisão de 2 cm com uma lâmina de bisturi (nº 15, Fibra Cirurgica, Joinville, SC, Brasil). O tecido foi divulsionado e, posteriormente, os dois tubos de dentina preenchidos com material foram implantados, sendo um em uma posição ventral e o outro caudal. Após os períodos experimentais de 7 e 30 dias, os animais foram mortos e os tubos foram removidos juntamente com o tecido conjuntivo adjacente.

As cápsulas adjacentes aos tubos foram, cuidadosamente, separadas e colocadas em miniplaca RNase e DNase-free. Os resíduos de material junto às cápsulas foram removidos com irrigação de soro fisiológico gelado e, posteriormente, as cápsulas foram congeladas a -80°C até o momento da extração do RNA mensageiro (RNAm). A extração de RNA será realizada seguindo o método de um kit específico (ReliaPrep™ RNA Tissue Miniprep System, Promega). Feito isso, será seguido o protocolo para análise em qPCR (StepOne Plus Real Time qPCR, Applied Biosystem). Os tubos de dentina, por sua vez, foram lavados em água destilada e preparados para análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.1 MÉTODOS DE ANÁLISE

4.1.1 Expressão gênica

A expressão de fosfatase alcalina, osterix e osteocalcina nas cápsulas adjacentes aos implantes foi avaliada pelo método do qPCR. Após os períodos experimentais de 7 e 60 dias, os animais foram mortos e as cápsulas adjacentes aos implantes dos tubos de polietileno foram cuidadosamente removidas e colocadas em RNA later (Ambion, Applied Biosystems, Foster City CA). O tecido foi, imediatamente, macerado e congelado a -80°C até o momento da extração do RNA mensageiro (RNAm). A extração do RNA foi realizada de acordo com o protocolo do kit RNAqueous-4PCR (Ambion; Life Technologies, EUA) e o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado de acordo com as instruções do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA).

O qPCR foi feito no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems) utilizando o cDNA e uma mistura de sondas e *primers* Taqman desenvolvidos para detectar os genes ALP (fosfatase alcalina), *Bglap* (osteocalcina), *Sp7* (osterix), Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems) e água nuclease-free (Garcia et al., 2014). A amplificação do gene GAPDH (Life Technologies Brasil Comércio e Indústria de Produtos para Biotecnologia LTDA) foi utilizada como controle endógeno.

4.1.2. Análise da interface dentina/material

A interface dentina/material foi investigada a fim de verificar a adaptação e a bioatividade dos diferentes materiais, comparando se existiam diferenças entre a interação dos materiais e a dentina adjacente. Para isso, os tubos de dentina preenchidos com os materiais avaliados foram removidos do subcutâneo dorsal, fixados em glutaraldeído durante 48 horas, lavados com água destilada e preparados para análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Perdigão et al., 1999). Os tubos foram cortados no sentido transversal e dois discos de dentina ($800 \pm 200 \mu\text{m}$), um de cada extremidade em contato direto com o tecido adjacente, foram obtidos para cada implante com o auxílio do aparelho ISOMET (Buehler, Lake Bluff, NY). Os discos foram colocados em *stubs* de alumínio e recobertos com ouro para observação em MEV (Philips SEM XL 30; Philips, Eindhoven, Netherlands). A interface dentina/material foi examinada em diferentes aumentos (500-2000x) a fim de verificar se havia a formação de uma camada entre o material implantado e a parede de dentina nos diferentes períodos

experimentais. A composição da estrutura formada foi investigada por meio do sistema de energia dispersiva (EDS).

4.1.3. Análise estatística

Os resultados quantitativos obtidos foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA). Aos dados foi aplicado o teste estatístico paramétrico two-way ANOVA para comparação dos diferentes grupos entre si dentro de cada período experimental, para posteriormente, quando observada diferença significativa em nível de 5%, realizar a comparação entre os materiais, dois a dois, pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

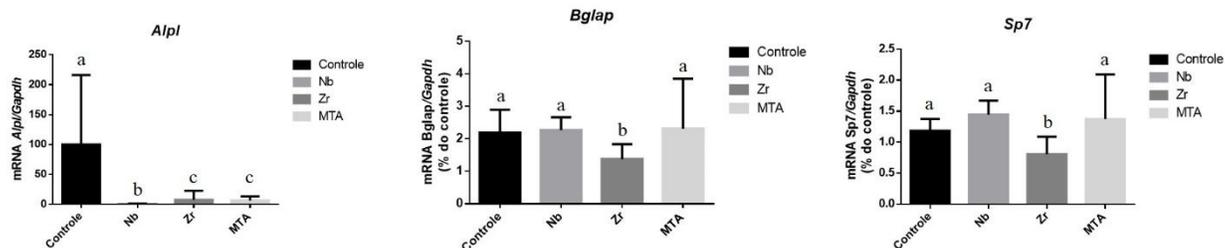
5. RESULTADOS

Expressão gênica

Os resultados mostraram que ocorreu a expressão de fosfatase alcalina (Alpl), osteocalcina (Bglap) e osterix (Sp7) nas cápsulas adjacentes aos implantes de todos os grupos experimentais 7 dias (Figura 1). Neste período, o grupo controle apresentou os maiores valores para a expressão de fosfatase alcalina. Por sua vez, expressão significativamente menor foi encontrada na cápsula adjacente ao TSC+ Nb_2O_5 em comparação aos demais grupos; não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos TSC+ ZrO_2 e MTA para este gene. Em relação aos genes da osteocalcina e osterix, as cápsulas adjacentes ao TSC+ ZrO_2 exibiram valores significativamente menores em comparação ao controle, TSC+ Nb_2O_5 e MTA ($p \leq 0,05$).

Após 60 dias de implantação, os dados evidenciaram que na cápsula adjacente aos materiais à base de silicato tricálcio (TSC+ ZrO_2 , TSC+ Nb_2O_5 e MTA) e aos tubos vazios, houve a expressão gênica para fosfatase alcalina e a osteocalcina depois de, aproximadamente, 30 ciclos. No entanto, para o gene osterix não foi observada nenhuma amplificação.

Figura 1 – Gráficos representativos das expressões gênicas para a fosfatase alcalina (Alpl), osteocalcina (Bglap) e osterix (Sp7) nas cápsulas adjacentes aos implantes no subcutâneo após 7 dias. As letras minúsculas (a, b, c) indicam diferenças estatísticas significantes ($p \leq 0,05$).

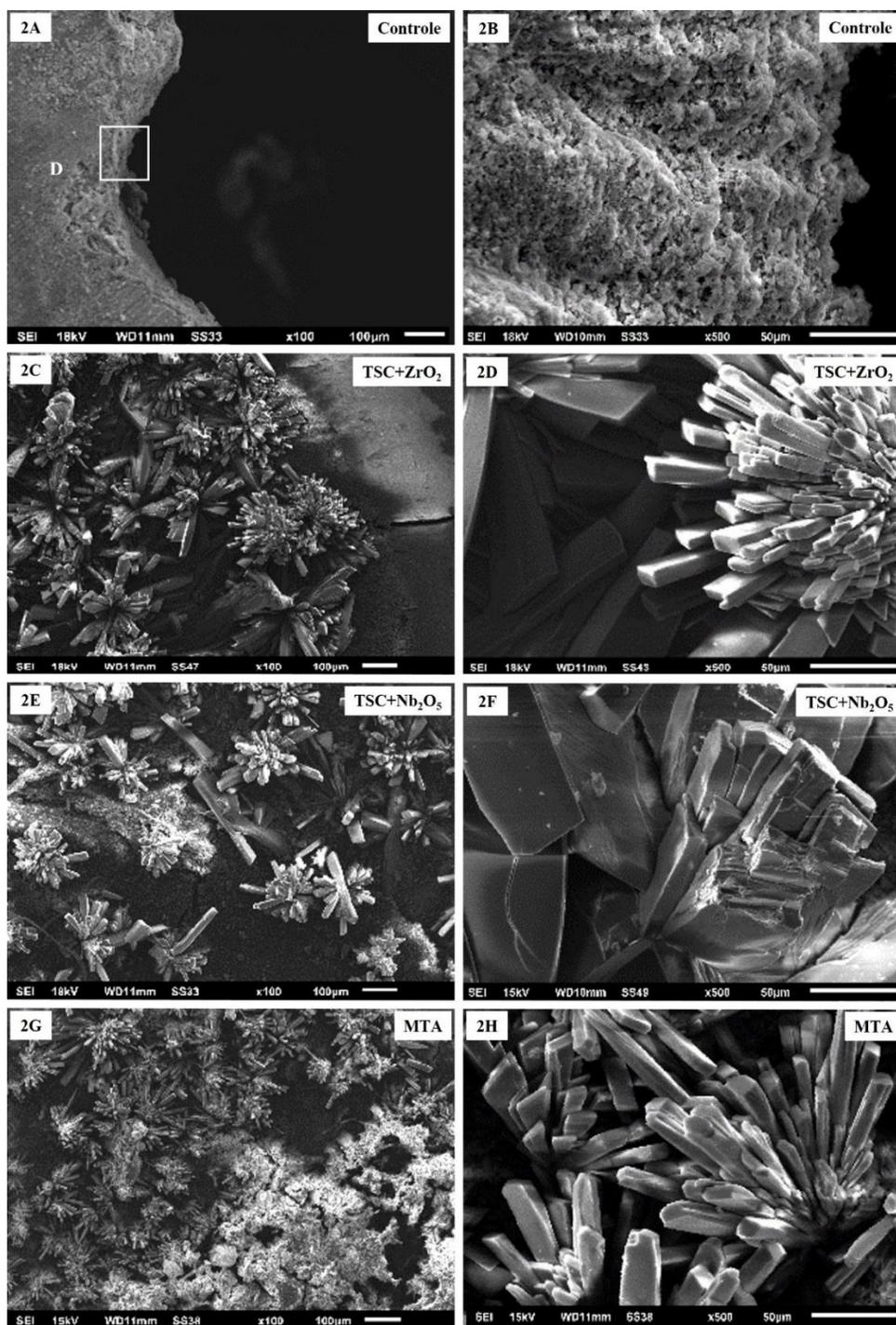


Fonte: Elaborado pelo autor.

Análise da interface dentina/material

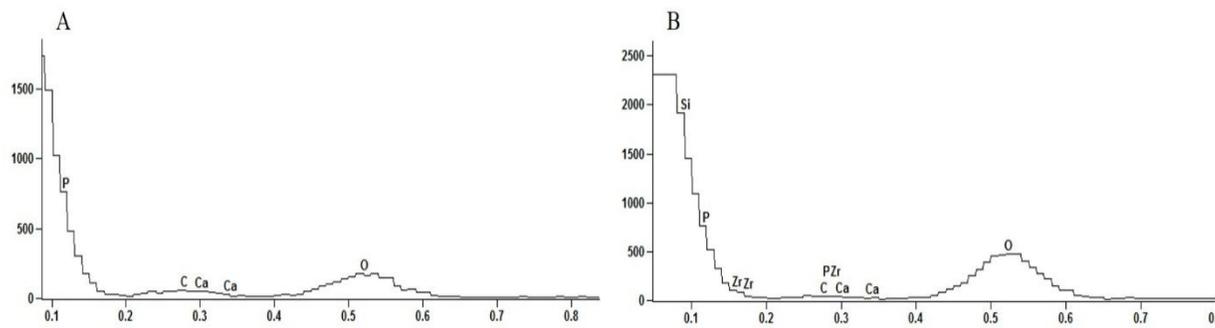
A análise por MEV evidenciou que nos tubos de dentina vazios (grupo controle) não houve a deposição de estrutura mineralizada (Figuras 2A e 2B). Nos demais grupos, foi observada a presença de uma camada mineralizada na interface dentina/material. Na superfície dos materiais, em direto contato com o subcutâneo, foram observadas estruturas retangulares, com secção transversal hexagonal ou retangular (Figuras 2C a 2H). A camada presente na interface dentina/material apresentou composição semelhante à da dentina, porém, com a presença de sílica nos grupos MTA, TSC+ZrO₂ e TSC+Nb₂O₅ (Figura 3).

Figura 2 - Eletromicrografias de porções dos tubos de dentina implantados no subcutâneo e analisados em microscopia eletrônica de varredura. As **figuras 2A e 2B** (maior aumento da região delimitada em 2A) evidenciam a ausência de interface. Nas figuras **2C a 2H** podem ser observadas as interfaces dentina/material nos diferentes grupos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Gráficos representativos das composições da dentina (A) e da camada formada na interface dentina/material do grupo TSC+ZrO₂ (B) obtidos por EDS



Fonte: Elaborado pelo autor.

6. DISCUSSÃO

Os resultados evidenciaram que os materiais avaliados promovem a expressão gênica de fosfatase alcalina, osteocalcina e osterix na cápsula adjacente aos implantes no subcutâneo. Além disso, a análise por MEV revelou a formação de estruturas retangulares, com secção transversal hexagonal ou retangular. De acordo com Niu et al., (2014), tais estruturas são apatitas carbonadas formadas na etapa final de hidratação dos materiais à base de silicato tricálcio. A apatita carbonada é um sub-produto da reação destes cimentos, formada a partir da transformação do fosfato de cálcio depositado sobre a camada de sílica na superfície destes produtos (Niu et al., 2014). Esta apatita apresenta semelhança química e cristalográfica à apatita encontrada no osso, esmalte e dentina (Chickerur et al., 1980; Dorozhkin 2011).

Nos grupos MTA, TSC+ZrO₂ e TSC+Nb₂O₅, foi observada a formação de uma camada mineralizada na interface dentina/cimento. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que também observaram a presença de deposição mineral entre a dentina e materiais à base de silicato tricálcio, tais como, MTA, CP e Biodentine (Reyes-Carmona et al., 2010; Dreger et al., 2012; Kim et al., 2015). Conforme evidenciado na análise por EDS, os materiais avaliados apresentam como principal componente a sílica que reage com os íons OH⁻, resultando em um composto chamado silanol (Si-OH). Este silanol, na superfície dos materiais, induz a formação das apatitas carbonadas a partir do fosfato de cálcio amorfo que é depositado na camada em contato com o tecido (Niu et al., 2014). Tendo em vista que esta formação de estrutura mineralizada não ocorreu no grupo controle, pode-se afirmar que tal mecanismo é resultado de uma interação entre o material e o hospedeiro, caracterizando a bioatividade.

Além disso, os materiais à base de silicato de cálcio, promovem a liberação de íons Si⁺⁴ e Ca⁺² que contribuem para a bioatividade in vivo destes cimentos. A sílica, como já descrito, é um elemento essencial para os processos metabólicos associados à indução da formação de apatita (Damen, Ten Cate 1992) e calcificação de tecidos (Carlisle 1970). Já foi demonstrado também que silicatos têm o potencial de estimular a osteogênese pela inibição do crescimento e diferenciação dos osteoclastos (Schroder et al., 2012). A liberação de íons Ca⁺², por sua vez, favorece a diferenciação e a proliferação de osteoblastos e a mineralização da matriz extracelular (Maeno et al., 2005). Sabe-se também que a reação de presa dos materiais à base de silicato tricálcio promovem uma excelente superfície para a adesão de células formadoras de osso ou osteoblast-like (Koh et al., 1998; Zhu et al., 2000)

Pode-se concluir que há formação de uma estrutura mineralizada semelhante à hidroxiapatita e ocorre a expressão gênica de proteínas relacionadas à mineralização dos tecidos, evidenciando a bioatividade dos materiais de silicato de cálcio avaliados no presentes estudo.

REFERÊNCIAS

1. AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. Specification No. 57 for endodontic filling materials. *Journal of American Dental Association*, v. 108, n. 1, p. 88. 1984.
2. BAEK, S.H. et al. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA, and MTA as root-end filling materials. *Journal of Endodontics*, v. 31, n. 6, p. 444-9. 2005.
3. BONUCCI, E. et al. Alkaline phosphatase and tartrateresistant acid phosphatase in osteoblasts of normal and pathologic bone. *Ital J Anat Embryol*, v. 106, p. 129-33. 2001.
4. BORTOLUZZI, E. A. et al. Radiographic effect of different radiopacifiers on a potential retrograde filling material. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, v. 108, n. 4, p. 628-32. 2009.
5. BORTOLUZZI, E.A. et al. Mineral Trioxide Aggregate and Portland cement promote biomineralization *in vivo*. *Journal of Endodontics*, v. 38, p. 324-9. 2012.
6. CAMILLERI, J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*, v. 40, n. 6, p. 462-70. 2007.
7. CAMILLERI, J. et al. Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. *Dental Materials*, 2011, v. 27, n. 8, p. 845-54. 2011.
8. CAMILLERI, J. et al. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *International Endodontic Journal*, v. 37, n. 10, p. 699-704. 2004.
9. CAMILLERI, J. et al. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dental Materials*, v. 21, n. 4, p. 297-303. 2005.
10. CHANG, S.W. et al. Analysis of heavy metal contents in gray and white MTA and 2 kinds of Portland cement: a preliminary study. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, v. 109, n. 4, p. 642-6. 2010.
11. CONSOLARO, A. Inflamação e reparo. 1ª ed. São Paulo: *Dental Press*; 2009.
12. COOMARASWAMY, K.S. et al. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *Journal of Endodontics*, v. 33, n. 3, p. 295-8. 2007.
13. CORNELIO GOMES, A.L. et al. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *Journal of Endodontics*, v. 37, p. 203-10. 2011.

14. CUTAJAR, A. et al. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dental Materials*, v. 27, p. 879-91. 2011.
15. DENRY, I.L. et al. Effect of niobium content on the microstructure and thermal properties of fluorapatite glass-ceramics. *Journal of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 75B, p. 18–24. 2005.
16. DUARTE, M.A.H. et al. Radiopacity of Portland Cement Associated With Different Radiopacifying Agents. *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 5, p. 737–40. 2009.
17. DUARTE, M.A.H. et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of Endodontics*, v. 38, n. 3, p. 394-7. 2012.
18. ESTRELA, C. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Brazilian Dental Journal*, v. 11, n. 1, p. 3-9. 2000.
19. GARNERO, P. et al. New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcif Tissue Int*, v. 59, p. 2–9. 1996.
20. GOMES FILHO, J.E. et al. Evaluation of rat alveolar bone response to Angelus MTA or Experimental Light-cured Mineral Trioxide Aggregate using fluorochromes. *Journal of Endodontics*, v. 37, p. 250-4. 2011.
21. GOMES FILHO, J.E. et al. Influence of diabetes mellitus on tissue response to MTA and its ability to stimulate mineralization. *Dental Traumatology*, v. 31, n. 1, p. 67-72. 2015.
22. GOSEKI SONE, M. et al. Expression of mRNA encoding tissue nonspecific alkaline phosphatase in human dental tissues. *Calcif Tissue Int*, v. 64, p. 160–162. 1999.
23. GRECH, L. et al. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater*, v. 29, p. e20-e28. 2013.
24. HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Brazilian Dental Journal*, v. 12, n. 1, p. 3-8. 2001.
25. HOSHI, K. et al. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem Cell Biology*, v. 107, p. 183–91. 1997.
26. HOTTON, D. et al. Differential expression and activity of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in rat odontogenic cells in vivo. *Journal Histochem Cytochem*, v. 47, p. 1541–52. 1999.

27. KARLINSEY, R.L. et al. Bioactivity of novel self-assembled crystalline Nb₂O₅ microstructures in simulated and human salivas. *Biomedical Materials*, v. 1, p. 16–23. 2006.
28. LEE, S.J. et al. Sealing ability of mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of Endodontics*, v. 19, p. 541-4. 1993.
29. LEITUNE, V.C. et al. Niobium pentoxide as a novel filler for dental adhesive resin. *Journal of Dentistry*, v. 41, p. 106-13. 2013.
30. Leitune VC, Takimi A, Collares FM, Santos PD, Provenzi C, Bergmann CP, Samuel SM. Niobium pentoxide as a new filler for methacrylate-based root canal sealers. *International Endodontic Journal*, v. 46, p. 205-10. 2013.
31. MAGNUSSON, P. et al. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. *J Bone Miner Res*, v. 14, p. 1926–33. 1999.
32. MIN, K. et al. Human pulp cells response to Portland cement in vitro. *Journal of Endodontics*, v. 33, n. 2, p. 163-6. 2007.
33. NICKENIG, H.J. et al. Expression of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in soft tissue over ceramic and metal implant materials before uncovering: a clinical pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 27, n. 3, p. 671-6. 2012.
34. NIU, L.N. et al. A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. *Journal of Dentistry*, v. 42, n. 5, p. 517-533. 2014.
35. OLIVEIRA, M.G. et al. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Brazilian Dental Journal*, v. 18, p. 3-7. 2007.
36. PARIROKH, M. et al. Mineral Trioxide Aggregate: A comprehensive literature review – part I: chemical, physical and antibacterial properties. *Journal of Endodontics*, v. 36, p. 16-27. 2010.
37. PERDIGÃO, J. et al. The effect of a re-wetting agent on dentin bonding. *Dent Mater*, v. 15, p. 282-295. 1999.
38. REGISTER, T.C. et al. Role of alkaline phosphatase and labile internal mineral in matrix vesicle-mediated calcification. *Journal Biol Chem*, v. 261, p. 9354–60. 1986.
39. REYES CARMONA, J.F. et al. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with dentin in a phosphatecontaining fluid. *Journal of Endodontics*, v. 35, p. 731–6. 2009.
40. REYES CARMONA, J.F. et al. Host-mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. *Journal of Endodontics*, v. 36, p. 1347–53. 2010.

41. RIBEIRO, D.A. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, v. 101, n. 2, p. 258-61. 2006.
42. SAIDON, J. et al. Cell and tissue reactions to mineral aggregate and Portland cement. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, v. 95, n. 4, p. 483-9. 2003.
43. SARKAR, N.K. et al. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*, v. 31, n. 2, p. 97–100. 2005.
44. SCHEMBRI, M. et al. Analyses of Heavy Metals in Mineral Trioxide Aggregate and Portland Cement. *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 7, p. 1210-5. 2010.
45. SILVA, G.F. et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties, v. 102, n. 12, p. 4336-45. 2014.
46. SILVA, G.F. et al. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *International Endodontic Journal*, v. 44, n. 2, p. 100-10. 2011.
47. SILVA, G.F. et al. Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clinical Oral Investigations*, v. 19, p. 2015-25. 2015.
48. TANOMARU FILHO, M. et al. Radiopacity evaluation of root-end filling materials by digitization of images. *Journal Applied Oral Science*, v. 16, n. 6, p. 376-9. 2008.
49. TANOMARU FILHO, M. et al. Compressive strength and setting time of MTA and Portland cement associated with different radiopacifying agents. *ISRN Dentistry*, v. 2012, p. 898051. 2012.
50. TORABINEJAD, M. et al. Tooth filling material and use. Loma Linda University; US patent 5 769 638. 1995 May 16.
51. TORABINEJAD, M. et al. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *Journal of Endodontics*, v. 23, n. 4, p. 225-8. 1997.
52. TSUKAMOTO TANAKA, H. et al. Histochemical and immunocytochemical study of hard tissue formation in dental pulp during the healing process in rat molars after tooth replantation. *Cell Tissue Research*, v. 325, p. 219–229. 2006.

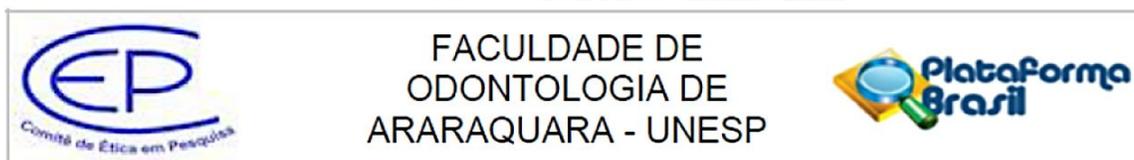
53. VIAPIANA, R. et al. Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *International Endodontic Journal*, v. 47, n. 5, p. 437-48. 2014.
54. VIVAN, R.R. et al. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, v. 110, n. 2, 250–6. 2010.
55. VIOLA, N.V. Avaliação histológica e imuno-histoquímica do subcutâneo e do alvéolo dentário de ratos com implantes de cimento Portland, MTA e MTA experimental [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.
56. VIOLA, N.V. et al. Morphological and morphometric analysis of the biocompatibility of an experimental MTA Sealer. *Journal of Biomedical Dental Material Research*, v. 100B, n. 7, p. 1773-81. 2012.
57. WUCHERPFENNIG, A.L. et al. Mineral trioxide vs Portland cement; two biocompatible filling materials *Journal of Endodontics*, v. 25, p. 308. 1999.

ANEXOS

1. O parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE ODONTOLOGIA	
<i>Proc. CEEA nr. 26/2010</i>	
Araraquara, 08 de Agosto de 2012	
Senhor Pesquisador:	
<p>A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA desta Faculdade reunida em 08/08/2012, após a avaliação do RELATÓRIO PARCIAL referente ao projeto do Proc. CEEA nr. 26/2010 <i>APROVOU a solicitação de alteração de metodologia e de prorrogação do prazo de entrega do Relatório Final para MARÇO 2016</i>, com a recomendação de que seja acertado o cronograma que foi impresso com data de 2012 em sua última coluna à direita.</p>	
Atenciosamente.	
 Profa. Dra. ELISA MARIA APARECIDA GIRO 1º Coordenador substituto no exercício da Coordenadoria da CEUA	
Ilmº Sr. Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI DD. Pesquisador Responsável a/c Guilherme Ferreira da Silva <u>Departamento de Morfologia</u>	
<small> Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA Rua Hamatã nº 1.680 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA - SP 5º andar - fone (16) 3301-6431/6432 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: etica@fou.unesp.br - home page: http://www.fou.unesp.br </small>	

2. Parecer



Dados do Projeto de Pesquisa

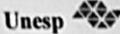
Título da Pesquisa: Biotividade e atividade indutora de mineralização de materiais à base de silicato de cálcio associados ao óxido de zircônio e ao óxido de nióbio
 Pesquisador: Paulo Sérgio Cerri
 Área Temática:
 Versão: 2
 CAAE: 38992814.1.0000.5416
 Submetido em: 01/12/2014
 Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
 Situação: Aprovado
 Localização atual do Projeto: Pesquisador Responsável
 Patrocinador Principal: Financiamento Próprio



3.

Docum

ento de regulamentação no Banco de Dentes Humanos

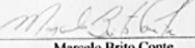

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CÂMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
BANCO DE DENTES HUMANOS - PERMANENTES
DECLARAÇÃO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Para fins de avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) dessa instituição, o Banco de Dentes Humanos da FOAR-UNESP (divisão dentes permanentes) compromete-se mais uma vez, a auxiliar pesquisadores na realização de seus projetos.

Sendo assim, após a aprovação do CEP, nossa contribuição consistirá no oferecimento de 44 pré-molares (número e grupo de dentes) para a execução do trabalho de pesquisa intitulado: "Bioatividade e atividade indutora de mineralização de materiais à base de cálcio associados ao óxido de zircônio e ao óxido de nióbio" a ser realizado por Guilherme Ferreira da Silva (autor(es)) e orientado por Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri.

Araraquara, 04 de Novembro de 2014.


 Paulo Domingos André Bolini


 Marcelo Brito Conte

Recebido em: 11
 Assinatura do Pesquisador: 