

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

LETÍCIA FOGAÇA MENDES

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

BAURU2016

LETÍCIA FOGAÇA MENDES

**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 requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia, sob orientação do Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva.

BAURU
2016

Mendes, Letícia Fogaça

M5381b

Bioatividade e atividade indutora de mineralização de materiais à base de silicato de cálcio associados ao óxido de zircônio e ao óxido de nióbio / Letícia Fogaça Mendes. -- 2016.

28f. : 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. Biocompatibilidade. 4. Bioatividade. I. Silva, Guilherme Ferreira da. II. Título.



ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Letícia Fogaça Mendes.

Ao dia trinta e um de outubro de dois mil e dezesseis, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Letícia Fogaça Mendes intitulado: **"Bioatividade e atividade indutora de mineralização de materiais à base de silicato de cálcio associados ao óxido de zircônio e ao óxido de nióbio."** Compuseram a banca examinadora os professores Dr. Guilherme Ferreira da Silva, Dr. Fernando Accorsi Orosco e Ms. Murilo Priori Alcalde. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, Aprovar, com a nota 10,0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segues assinada pelo Orientador e pelos demais membros da banca.

Dr. Guilherme Ferreira da Silva (Orientador)

Dr. Fernando Accorsi Orosco (Avaliador 1)

Ms. Murilo Priori Alcalde (Avaliador 2)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me iluminar e guiar o meu caminho durante toda essa caminhada, aos meu pais e a minha irmã que estiveram comigo a todo momento, me encorajando nos momentos difíceis e vibrando comigo nos momentos de felicidade; a minha madrinha, minha tia Rose e minhas avós que me ajudaram a todo o momento e juntamente com meus pais, foram as responsáveis pela realização desse sonho.

Agradeço também a Universidade do Sagrado Coração, juntamente com os seus professores, por me proporcionarem os melhores exemplos de profissionais e me passarem todo o conhecimento necessário para minha formação profissional e crescimento pessoal. Em especial ao meu professor orientador Guilherme, por ter me ajudado na conclusão desse trabalho, pela paciência e pelo incentivo durante todos esses anos.

Por fim, agradeço aos meus amigos que me apoiaram durante toda essa trajetória, em especial a minha amiga Raíssa que esteve comigo em todos os momentos durante esses quatro anos, como companheira de clínica, estudos, e vida pessoal.

RESUMO

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) é composto por um material à base de silicato de cálcio (SC), acrescido de óxido de bismuto. Apesar de o MTA apresentar vantagens em relação a outros materiais, tem sido demonstrado que o óxido de bismuto, o qual apresenta elevada radiopacidade, reduz a resistência e a biocompatibilidade do SC. Assim, outros radiopacificadores têm sido estudados em substituição ao óxido de bismuto. O presente estudo teve por objetivo investigar a possível capacidade de indução de mineralização e a bioatividade de dois radiopacificadores, óxido de zircônio e óxido de nióbio, associados a um cimento de silicato de cálcio, comparando-os ao MTA-Angelus. Para isso, foram realizadas análises imuno-histoquímicas para fosfatase alcalina e osteocalcina. Além disso, a detecção de cálcio usando o vermelho de Alizarina foi realizada nas cápsulas formadas em resposta aos implantes no subcutâneo de ratos. Foram utilizados 60 ratos Holtzman distribuídos de acordo com o material testado, o período experimental e os métodos de análise. Os materiais foram manipulados e inseridos em tubos de polietileno e implantados no tecido subcutâneo dos ratos. Decorrido os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, 40 animais foram sacrificados e o tecido envolvendo os tubos de polietileno contendo os materiais foram removidos e submetidos ao processamento para inclusão em parafina. Os cortes dos implantes foram aderidos à lâminas silanizadas para a realização das reações imuno-histoquímicas para detecção fosfatase alcalina ou osteocalcina e as células imunopositivas serão quantificadas. Em outros 20 animais, foi injetado o vermelho de Alizarina para comparação da intensidade de fluorescência ao cálcio depositado no tecido subcutâneo adjacente aos diferentes grupos nos períodos experimentais de 30 e 60 dias. Decorrido os períodos experimentais, os animais foram mortos e o tecido removido para processamento e análise em microscópio de fluorescência. Todos os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Na cápsula adjacente aos implantes contendo os diferentes materiais, foram observadas células imunomarcadas tanto para a fosfatase alcalina quanto para a osteocalcina em todos os períodos experimentais. O grupo controle (tubo vazio) exibiu poucas células imunopositivas no tecido adjacente à extremidade do tubo nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias. Além disso, estruturas fluorescentes foram observadas na cápsula adjacente aos implantes contendo os materiais, principalmente, após 60 dias. Pode-se concluir que o óxido de zircônio e

óxido de nióbio, associados a um cimento de silicato de cálcio apresentam bioatividade, semelhante ao MTA-Angelus.

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

ABSTRACT

Mineral Trioxide Agreggate (MTA) is composed by a calcium silicate-based material (CS), mixed to bismuth oxide. Although, MTA presents advantages in comparison to other materials, it has been demonstrated that bismuth oxide reduces compressive strength and biocompatibility of CS. So, other radiopacifier agents haven been studied to be used instead of bismuth oxide. The aim of the presente study was to investigate the mineralization ability and bioactivity of a CS, added to zirconium oxide or niobium oxide, in comparison to MTA-Angelus. Imunohistochemistry analisys for alkaline phosphatase and osteocalcin were performed. Furthermore, calcium detection using Alizarin Red was carried out in the capsules of rat subcutaneous. Sixty rats were distribuided acoording to material, experimental period and method. Materials was mixed and insert into rats subcutaneous. After, 7, 15, 30 and 60 days, 40 animals were euthanized and the tissues removed for histologic process. Slides were adhered to silanazide blades for imunohistochemistry reactions and the imunollabeled cells were quantified. In other 20 rats, Alizarin Red was injected and the calcion fluorescence was analyzed in the different groups after 30 and 60 days. Data were subjected to ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). In the capsule adjacent to the implants, imunnolabelled cells were observed for alkaline phosphatase and osteocalcin in all periods. Control group (empty tubes) exhibited few imunopositives cells after 7, 15, 30 and 60 days. Besides, fluorescent structures were seen in the adjacent capsules of the implants, especially, after 60 days. In conclusion, zirconium oxide and niobium oxide, mixed to a CS, presente bioactivity, similar to MTA-Angelus.

Keywords: Mineral Trioxide Agreggate. Calcium silicate. Biocompatibility. Bioativity.

SUMÁRIO

Introdução e Revisão de Literatura.....	8
Objetivo.....	13
Material e métodos	14
Resultados.....	19
Discussão	23
Conclusões.....	25
Referências	26

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 cimento Portland (CP), 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, 1995; WHITE, 1995; WUCHERPFENNIG, 1999; 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 possuem composições semelhantes, estudos têm sido realizados comparando as propriedades físicas, químicas e biológicas destes materiais.

(WUCHERPFENNIG, 1999; 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 genotóxico e não induz morte celular (RIBEIRO et al., 2006); o cimento Portland não apresenta citotoxicidade e 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 OB apresentam um percentual de solubilidade acima do recomendado para materiais retr obturadores (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 pulpareas 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 (CAMILLETTI 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 ZrO_2 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 imunohistoquímica para detecção de interleucina-6 da reação tecidual promovida pelo CP+ ZrO_2 , 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 (KARLINSEY 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+ONb 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, 2013).

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 ($TNF-\alpha$) e prostaglandinas – PGE_2 . 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; DA FONSECA et al., 2016).

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, 1996; DELMAS, 1996; BONUCCI, 2001; 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).

2 OBJETIVO

O presente estudo tem por objetivo avaliar o comportamento biológico de um cimento à base de silicato de cálcio associado ao óxido de zircônio e ao óxido de nióbio, comparando-os ao MTA-Angelus®, por diferentes métodos de análise. Assim, avaliou-se:

- A expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina na cápsula formada em resposta aos materiais implantados no tecido subcutâneo de ratos por meio de análise imuno-histoquímica;
- A habilidade dos materiais induzirem a formação de estruturas calcificadas no subcutâneo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo de pesquisa na experimentação animal foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais-CEUA. No presente estudo, foram utilizados 60 ratos, de linhagem Holtzman, adultos jovens, pesando em média 200g (aproximadamente 75 dias). Os animais foram mantidos no Biotério em gaiolas plásticas forradas com maravalha, com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas. Os animais receberam ração (Guabi Nutri Labor, Brasil) e água *ad libitum*. A maravalha das gaiolas foi trocada, no mínimo, três vezes por semana; a limpeza das gaiolas e bebedouro foi também feita, a fim de manter a higiene do seu ambiente e, portanto, evitar desconforto aos animais.

Os animais foram distribuídos de acordo com o material avaliado em grupos experimentais: cimento à base de silicato de cálcio (cimento Portland, Votorantin Cimentos, Camargo Correa S.A., Pedro Leopoldo, MG, Brasil), grupo SC; cimento à base de silicato de cálcio associado a 30% de óxido de zircônio (Sigma Aldrich, St Louis, MO), grupo SC+Zr₂O; cimento à base de silicato de cálcio associado a 30% de óxido de nióbio, grupo SC+Nb₂O₅; grupo MTA (Angelus, Londrina, PR, Brasil). Em cada animal, foi realizado o implante de dois tubos preenchidos com os diferentes materiais. Os animais foram sacrificados após 7, 15, 30 e 60 dias aos implantes. Foram realizados 5 implantes para cada material por período experimental.

Em 40 animais, foi realizado o implante de dois tubos de polietileno de 1,5 mm de espessura e 10 mm de comprimento (Embramed Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil), previamente esterilizados em óxido de etileno (VIOLA et al., 2012), preenchidos com os diferentes materiais, no subcutâneo dorsal de cada rato. Além disso, em outros 20 animais, foi injetado o vermelho de Alizarina para verificar a possível deposição de cálcio nas cápsulas formadas em resposta aos materiais após 30 e 60 dias aos implantes (Quadro 1).

Quadro 1 – Distribuição dos animais e implantes de tubos de polietileno e dentina de acordo com o método de análise.

Métodos de análise	Número de animais	Número e tipos de tubos
Imuno-histoquímica	- total: 40 animais - 2 tubos em cada animal (1 ventral e 1 caudal)	- tubo de polietileno - 20 implantes para cada material - 5 implantes por período experimental (7, 15, 30 e 60 dias)
Detecção de depósitos de cálcio	- total: 20 animais - 2 tubos em cada animal (1 ventral e 1 caudal)	- tubo de polietileno - 10 implantes para cada material - 5 implantes por período experimental (30 e 60 dias)

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal contendo 0,08mL/100g de peso corporal de Cloridrato de Ketamina a 10% (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda - Brasil), concentração de 80mg/kg de peso corporal, associada uma dose de 0,04mL/100g de peso corporal de Cloridrato de Xilazina a 2% (União Química Farmacêutica Nacional S/A - Brasil), na dose de 4mg/kg de peso corporal.

Os materiais foram previamente esterilizados pelo método ultravioleta por 30 minutos. Posteriormente, foram manipulados utilizando 1g do pó para 0,30 mL de água destilada (CAMILLERI et al., 2011; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2015) e inseridos em tubos de polietileno. Após a tricotomia e assepsia com solução de iodo a 5% da região dorsal do animal, realizou-se uma incisão de 2 cm com uma lâmina de bisturi nº 15, orientando-se na direção da cabeça para a cauda. O tecido foi divulsionado e, posteriormente, os dois tubos preenchidos com material foram implantados. O local da incisão foi suturado em pontos simples utilizando fio de seda (Seda 4-0, ETHICON, São José dos Campos, SP-Brasil). Os animais foram, então, colocados em gaiolas, devidamente identificados de acordo com o grupo e o período experimental, sendo observados até a recuperação da anestesia. Para minimizar o desconforto pós-operatório dos animais, foi administrada dipirona sódica, na dosagem de 0,03 mg para cada 100 g de peso corporal.

Decorrido os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados com *overdose* de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina. Os tubos implantados no subcutâneo, juntamente com os tecidos adjacentes, foram removidos e separados para a realização das diferentes análises.

3.1 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Com o propósito de verificar se os materiais implantados são capazes de estimular a diferenciação de células do subcutâneo (tecido conjuntivo) em células produtoras de tecidos mineralizados, foram realizadas reações imuno-histoquímicas para detecção de fosfatase alcalina e de osteocalcina.

Decorrido os períodos experimentais, os tubos de polietileno preenchidos com os materiais implantados foram removidos com os tecidos circundantes e, imediatamente, fixados em formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2. Após 48 horas, as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina de maneira a obter cortes longitudinais dos implantes. Os blocos contendo o tecido conjuntivo adjacente aos implantes foram obtidos (com 6 µm de espessura) com auxílio de um micrótomo (Micron, modelo HM 325) e navalhas de aço descartáveis.

Os cortes foram aderidos à lâminas silanizadas para a realização das reações imuno-histoquímicas. Após desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001M (pH 6,0) e submetidos ao tratamento com micro-ondas, durante 30 minutos a temperatura de 90-94 °C. Após o resfriamento e inativação da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3%, os cortes foram incubados com o anticorpo primário para fosfatase alcalina (Santa Cruz Biotechnology, EUA) ou osteocalcina (R&D Systems, Minneapolis, EUA), em câmara úmida à 4° C durante 16 horas. Após a lavagem em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo/coelho/cabra biotilado (Kit Dako LSAB+ System-HRP, Dako, USA) por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-peroxidase durante 30 minutos. Subsequentemente, os cortes foram lavados com tampão Tris-HCl e a atividade da peroxidase foi revelada com solução de 3.3-diaminobenzidina

(Betazoid DAB Chromogen Kit – Biocare Medical, USA) durante 2-3 minutos. Após a lavagem em água corrente e água destilada, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Carazzi.

3.2 DENSIDADE NUMÉRICA DE CÉLULAS IMUNOPOSITIVAS

A fim de verificar se houve diferenças entre os grupos nos períodos analisados, foi realizada a quantificação de células imunomarcadas à fosfatase alcalina e osteocalcina de acordo com estudos prévios (Silva et al., 2014; Silva et al., 2015). Com auxílio de uma câmera (DP-71, Olympus – Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus, modelo BX-51), em aumento de 40x, imagens da cápsula adjacente aos implantes foram capturadas. Posteriormente, com um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus – Japão), as células imunopositivas, em cada área teste de aproximadamente 0,09/mm² da cápsula, foram computadas obtendo-se, assim, um valor de células imunopositivas/mm². Ao final, foi estabelecida uma média para cada grupo experimental de acordo com o período experimental e o material estudado.

3.3 DETECÇÃO DE DEPÓSITOS DE CÁLCIO

Em 20 animais, após 21, 40 e 50 dias aos implantes no subcutâneo, foi administrado injeção intramuscular de vermelho de Alizarina (Sigma Aldrich Corp., St Louis, EUA) na concentração de 20mg/kg para avaliar da deposição de cálcio (Gomes-Filho et al., 2011; Gomes-Filho et al., 2015). Após 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados e os implantes com os tecidos adjacentes foram removidos e processados e incluídos em parafina. Com estes períodos de aplicação do vermelho de Alizarina, pretende-se avaliar a possível deposição de cálcio na cápsula adjacente aos materiais após 30 e 60 dias de implantação. Períodos iniciais, como por exemplo, 7 e 15 dias, não serão avaliados, uma vez que, nestes períodos, há a presença de um processo inflamatório o qual diminui significativamente somente após 30 dias. Gomes-Filho et al. (2011) observou que após 30 dias de implantação há pouca deposição de cálcio, sugerindo que períodos experimentais mais longos, como o de 60 dias, poderiam evidenciar uma maior quantidade de cálcio depositado na cápsula adjacente aos materiais.

Cortes com 6 μ m de espessura foram aderidos à lâminas de vidro e montados com meio de montagem para fluorescência à base de glicol e lamínula. Estes cortes foram analisados em um microscópio de luz fluorescente (Leica DMR, Leica Microsystem Wetzlar GmbH; Wetzlar, Alemanha).

4 RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DE DEPÓSITOS DE CÁLCIO

Estruturas fluorescentes foram observadas na cápsula adjacente aos implantes contendo os materiais, principalmente, após 60 dias. No tecido em contato com o tubo vazio (grupo controle), não foi observada fluorescência tanto após 30 dias quanto 60 dias de implantação no subcutâneo. Verificou-se que, em sua maioria, as estruturas que apresentaram fluorescência foram fibras colágenas, hemácias e partículas de material (Figura 1).

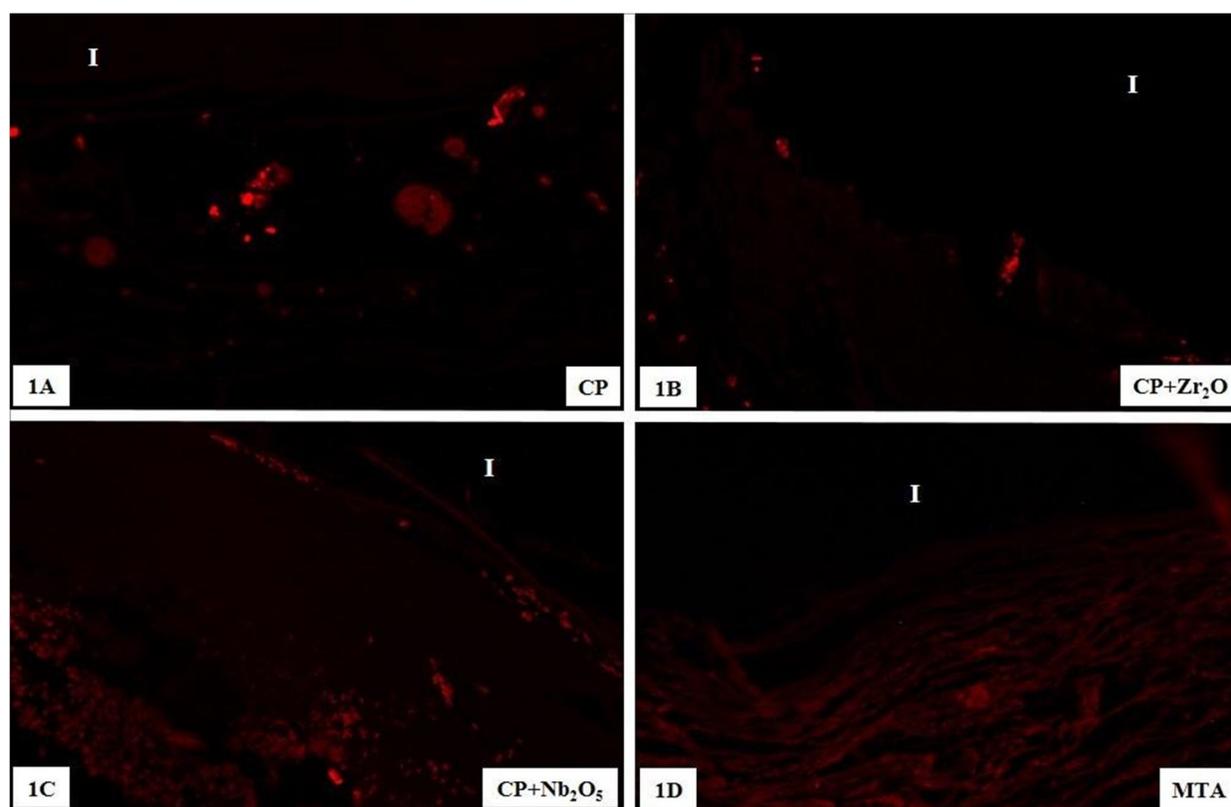


Figura 1 – Fotomicrografias de porções da cápsula adjacente aos implantes (I) no subcutâneo de ratos após 60 dias; cortes corados com vermelho de alizarina e analisado no microscópio de luz fluorescente.

4.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Na cápsula adjacente aos implantes contendo os diferentes materiais, foram observadas células imunomarcadas tanto para a fosfatase alcalina (Figura 2) quanto para a osteocalcina (Figura 3) em todos os períodos experimentais. O grupo controle (tubo vazio) exibiu poucas células imunopositivas no tecido adjacente à extremidade do tubo nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias (Figuras 2 e 3). A comparação entre os grupos experimentais evidenciou que tanto para a fosfatase alcalina quanto para a osteocalcina o maior número de células imunopositivas/mm² foi observado nos períodos iniciais, principalmente, aos 7 dias ($p \leq 0,05$). Após 60 dias de implantação, em todos os grupos, ocorreu uma diminuição significativa das médias (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de células imunopositivas/mm² para a fosfatase alcalina (FA) e osteocalcina (OC) na cápsula adjacente aos diferentes grupos experimentais.

	CP	CP+Zr ₂ O	CS+Nb ₂ O ₅	MTA	Controle
7 dias					
FA	0,81 ^{a,1}	1,08 ^{b,1}	0,78 ^{a,1}	0,88 ^{a,1}	0,81 ^{a,1}
OC	0,81 ^{a,1}	1,08 ^{b,1}	0,94 ^{b,1}	0,97 ^{b,1}	0,10 ^{c,1}
15 dias					
FA	0,88 ^{a,1}	1,08 ^{b,1}	0,88 ^{a,1}	0,78 ^{a,2}	0,81 ^{a,1}
OC	0,71 ^{a,2}	0,88 ^{b,2}	0,90 ^{b,1}	0,55 ^{c,2}	0,10 ^{d,1}
30 dias					
FA	0,88 ^{a,1}	0,98 ^{b,2}	0,68 ^{c,3}	0,68 ^{c,3}	0,81 ^{a,1}
OC	0,59 ^{a,3}	0,58 ^{a,3}	0,54 ^{a,2}	0,49 ^{b,2}	0,10 ^{c,1}
60 dias					
FA	0,27 ^{a,2}	0,37 ^{b,3}	0,24 ^{a,4}	0,21 ^{a,4}	0,10 ^{c,2}
OC	0,14 ^{a,4}	0,53 ^{b,3}	0,54 ^{b,2}	0,27 ^{c,3}	0,10 ^{d,1}

A comparação entre os grupos ($p \leq 0,05$) está indicada por diferentes letras

A comparação entre os períodos ($p \leq 0,05$) está indicada por diferentes letras

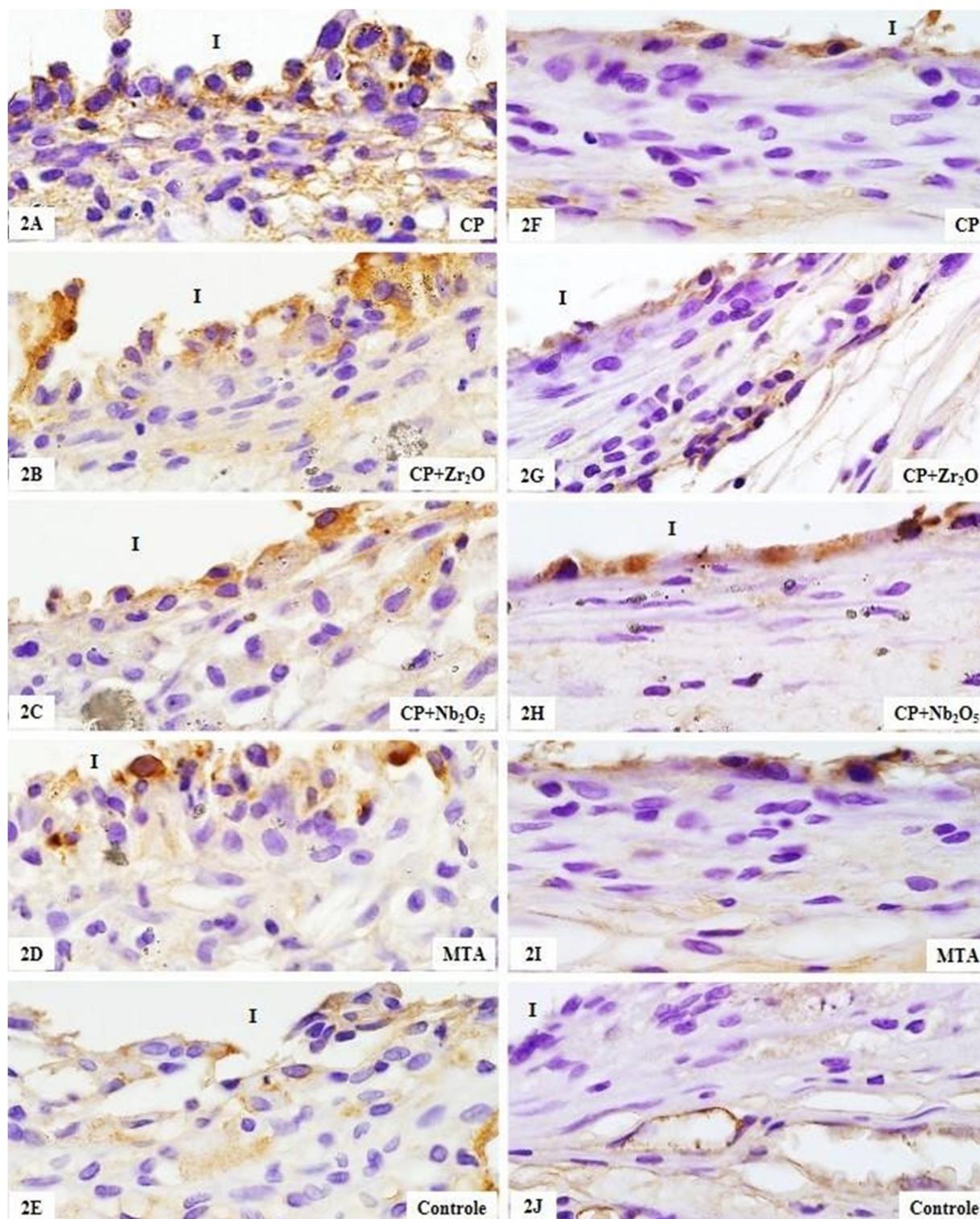


Figura 2 – Fotomicrografias mostrando porções das cápsulas adjacentes aos implantes no subcutâneo após 7 dias (Figs. 2A-2E) e 60 dias (Figs. 2F-2J) submetidas à reação imunohistoquímica para detecção de fosfatase alcalina. Aos 7 e 60 dias, células imunomarcadas (coloração marron/laranja) são observadas pela cápsula dos diferentes grupos experimentais. 620X.

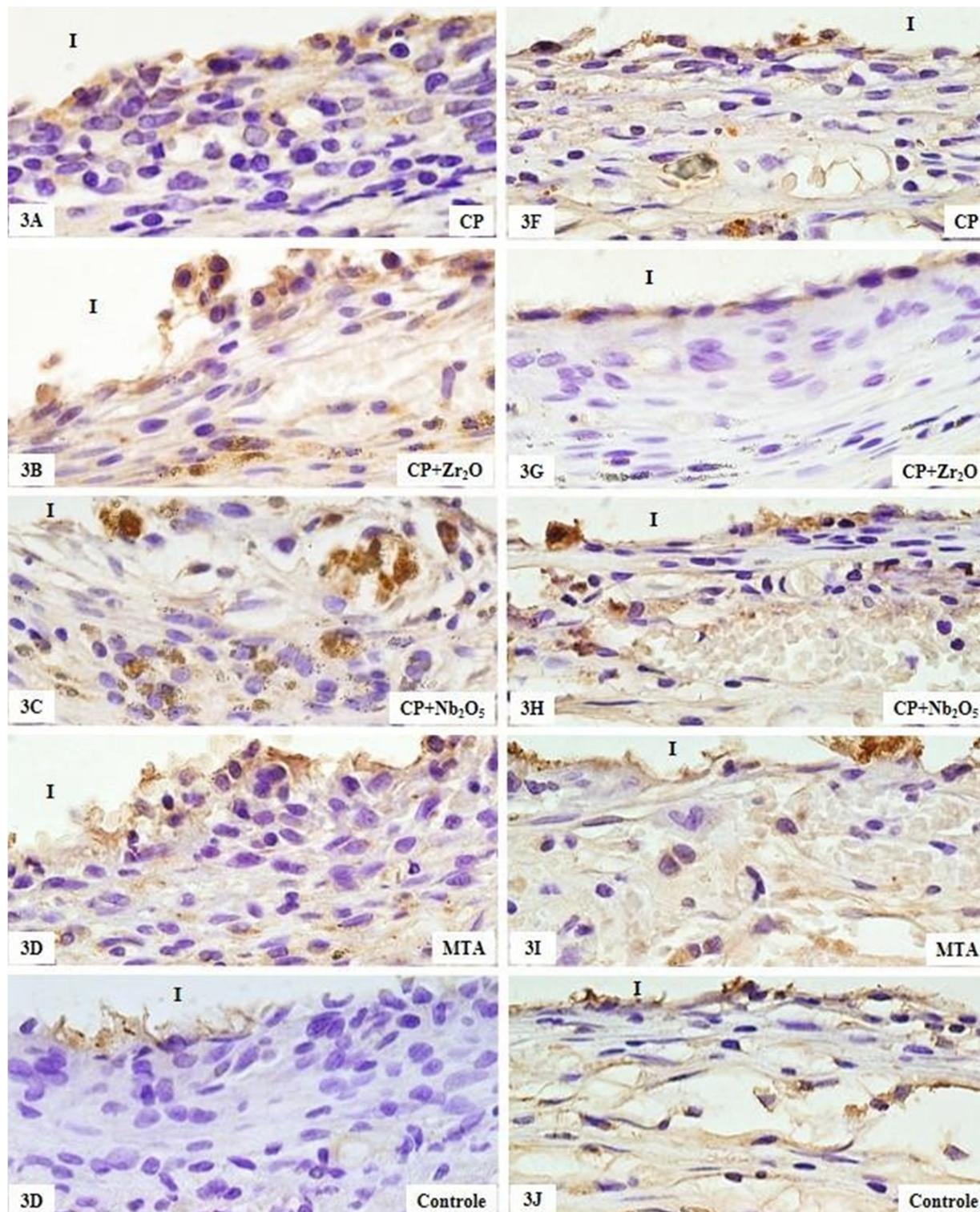


Figura 3 – Fotomicrografias mostrando porções das cápsulas adjacentes aos implantes no subcutâneo após 7 dias (Figs. 3A-3E) e 60 dias (Figs. 3F-3J) submetidas à reação imunohistoquímica para detecção de osteocalcina. Aos 7 e 60 dias, células imunomarcadas (coloração marron/laranja) são observadas pela cápsula dos diferentes grupos experimentais. 620X.

5 DISCUSSÃO

Bioatividade pode ser definida como a capacidade de um determinado material em induzir respostas biológicas específicas. Assim, quando um biomaterial é implantado, o tecido hospedeiro reage ao redor do implante de diferentes maneiras, dependendo da resposta tecidual induzida em contato com o implante. (NIU et al., 2014). Tendo em vista que os materiais endodônticos ficam justapostos aos tecidos pulpares e periapicais, causando diferentes reações, no presente estudo, foi verificado a capacidade de indução de mineralização e a bioatividade de dois radiopacificadores, óxido de zircônio e óxido de nióbio, associados a um cimento de silicato de cálcio, comparando-os ao MTA-Angelus.

Nossos resultados, indicam que os materiais avaliados induzem a expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina no tecido subcutâneo de ratos em todos os períodos experimentais. Além disso, tendo em vista que poucas células imunomarcadas foram verificadas na cápsula adjacente aos tubos vazios (grupo controle), é provável que esta expressão esteja relacionada à composição dos materiais à base de silicato de cálcio. Já foi demonstrado que os cimentos à base de silicato de cálcio, como o MTA e o CP, são considerados materiais bioativos em virtude da habilidade de produção de apatita após a interação com íons fosfato derivados de soluções fisiológicas ou fluídos corporais. (NIU et al., 2014).

A fosfatase alcalina e a osteocalcina são frequentemente utilizadas como marcadores da atividade osteoblástica e dos seus precursores. (MAGNUSSON et al., 1999; GARNERO, 1996; DELMAS, 1996; BONUCCI, 2001; NANCI, 2001). Assim, pode ser que os materiais analisados induzam as células mesenquimais a expressar fenótipo semelhante ao dos osteoblastos contribuindo, portanto, no processo de reparação e mineralização dos tecidos. Já foi observado que osteocalcina e osteopontina, proteínas altamente expressas em tecidos mineralizados, são detectadas por imuno- histoquímica em fibroblastos na cápsula circundante ao MTA e ao CP no subcutâneo de ratos, principalmente, após 30 e 60 dias. (VIOLA, 2010; VIOLA et al., 2012).

Além disso, o número de células imunopositivas à fosfatase alcalina foi estatisticamente maior na cápsula adjacente aos implantes com CP+Zr₂O, em comparação aos outros grupos experimentais, em todos os períodos. Sendo assim, pode-se afirmar que este material é capaz de induzir uma expressão maior desta proteína nos tecidos, auxiliando no processo de uma possível mineralização. Já foi observado que cimentos de silicato de cálcio contendo óxido de zircônio

apresentam uma resposta tecidual mais favorável quando comparado à outros tipos de materiais. (SILVA et al., 2014; DA FONSECA et al., 2016). A análise histológica e imuno-histoquímica para detecção de interleucina-6 da reação tecidual promovida pelo CP+Zr₂O, em tecido subcutâneo de ratos, demonstrou que este material induz um processo inflamatório de menor intensidade quando comparado ao CP associado ao óxido de bismuto, radiopacificador do MTA. (SILVA et al., 2014).

A análise da fluorescência na cápsula adjacente aos materiais implantados no subcutâneo pode ser utilizada como uma metodologia complementar para verificação da mineralização. (GOMES-FILHO et al., 2011; GOMES-FILHO et al., 2015). Nossos resultados evidenciaram que, tanto aos 30 quanto aos 60 dias, foram observadas estruturas fluorescentes na cápsula adjacente aos materiais. No entanto, tais estruturas foram compostas, exclusivamente, por hemácias, fibras colágenas e partículas de material, não sendo observado, portanto, nada que indicasse algum processo de mineralização. Apesar disso, tendo em vista que no grupo controle não foi encontrada fluorescência na cápsula, de alguma maneira os materiais implantados (CP, CP+Zr₂O, CP+Nb₂O₅ e MTA) induzem uma resposta biológica neste tecido.

No presente estudo, foi observado que o CP puro ou associado ao óxido de zircônio e óxido de nióbio, induz a expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina. Trabalhos prévios já verificaram que o CP induz uma resposta inflamatória suave no subcutâneo de ratos. (VIOLA et al., 2012; SILVA et al., 2014). Apesar destes resultados satisfatórios encontrados com a utilização do cimento Portland como constituinte principal de materiais alternativos ao MTA, 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 deve ser realizada. No entanto, nosso estudo claramente mostra que o óxido de zircônio e o óxido de nióbio podem ser radiopacificadores alternativos ao óxido de bismuto.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados e na metodologia utilizada no presente estudo, pode-se concluir que o óxido de zircônio e o óxido de nióbio associados a um cimento à base de silicato de cálcio (CP) induzem a expressão de fosfatase alcalina e osteocalcina na cápsula adjacente aos implantes no subcutâneo de ratos.

REFERÊNCIAS

- American Dental Association. Specification No. 57 for endodontic filling materials. **Journal of American Dental Association**, v. 108, n. 1, p. 88. 1984.
- BAEK SH, PLENK H JR, KIM S. 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.
- BONUCCI E, NANCI A. Alkaline phosphatase and tartrateresistant acid phosphatase in osteoblasts of normal and pathologic bone. **Italian Journal of Anatomy and Embryology**, v. 106, p. 129-33. 2001.
- BORTOLUZZI EA, GUERREIRO-TANOMARU JM, TANOMARU-FILHO M, DUARTE MAH. 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.
- CAMILLERI J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 6, p. 462-70. 2007.
- CAMILLERI J, CUTTAJAR A, MALLIA B. 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.
- CAMILLERI J, MONTESIN FE, PAPAIOANNOU S, MCDONALD F, PITT FORD TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. **International Endodontic Journal**, v. 37, n. 10, p. 699-704. 2004.
- CAMILLERI J, MONTESIN FE, BRADY K, SWEENEY R, CURTIS RV, FORD TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. **Dental Materials**, v. 21, n. 4, p. 297-303. 2005.
- CHANG SW, SHON WJ, LEE W, KUM KY, BAEK SH, BAE KS. 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.
- CONSOLARO A. Inflamação e reparo. 1ª ed. São Paulo: Dental Press; 2009.

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. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 3, p. 295-8. 2007.

CORNELIO-GOMES AL, SALLES LP, DA PAZ MC, CIRELLI JA, GUERREIRO-TANOMARU JM, TANOMARU-FILHO M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. **Journal of Endodontics**, v. 37, p. 203-10. 2011.

CUTAJAR A, MALLIA B, ABELA S, CAMILLERI J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. **Dental Materials**, v. 27, p. 879-91. 2011.

DA FONSECA TS, DA SILVA GF, TANOMARU-FILHO M, SASSO-CERRI E, GUERREIRO-TANOMARU JM, CERRI PS. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. **International Endodontic Journal**, v. 49, p. 145-53. 2016.

DENRY IL, HOLLOWAY JA, NAKKULA RJ, WALTERS JD. 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.

DREGER LAS, FELIPPE WT, REYES-CARMONA JF, FELIPPE GS, BORTOLUZZI EA, FELIPPE MCS. Mineral Trioxide Aggregate and Portland cement promote biomineralization *in vivo*. **Journal of Endodontics**, v. 38, p. 324-9. 2012.

DUARTE MAH, EL KADRE GDO, VIVAN RR, GUERREIRO-TANOMARU JM, TANOMARU-FILHO M, DE MORAES IG. Radiopacity of Portland Cement Associated With Different Radiopacifying Agents. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 5, p. 737-40. 2009.

DUARTE MAH, 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. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 3, p. 394-7. 2012.

ESTRELA C, BAMMANN LL, ESTRELA CRA, SILVA RS, PÉCORÁ JD. 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.

GARNERO P, DELMAS PD. New developments in biochemical markers for osteoporosis. **Calcif Tissue International**, v. 59, p. 2–9. 1996.

GOMES-FILHO JE, COSTA MMTM, CINTRA LTA, 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.

GOMES-FILHO JE, DE AZEVEDO QUEIROZ ÍO, WATANABE S, DA SILVA SANTOS LM, LODI CS, OKAMOTO R, ERVOLINO E, DEZAN E JR, CINTRA LT. 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.

GOSEKI-SONE M, IIMURA T, TAKEDA K, et al. Expression of mRNA encoding tissue nonspecific alkaline phosphatase in human dental tissues. **Calcif Tissue International**, v. 64, p. 160–162. 1999.

HOLLAND R, SOUZA V, NERY MJ, FARACO JUNIOR IM, BERNABÉ PFE, OTOBONI FILHO JA 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.

HOSHI K, AMIZUKA N, ODA K, IKEHARA Y, OZAWA H. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. **Histochemistry Cell Biology**, v. 107, p. 183–91. 1997.

HOTTON D, MAURO N, LEZOT F, FOREST N, BERDAL A. Differential expression and activity of tissue- nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in rat odontogenic cells in vivo. **Journal Histochemistry Cytochemistry**, v. 47, p. 1541–52. 1999.

International Organization for Standardization. ISO 6876: dental root sealing materials. Geneva: The Organization; 2001.

KARLINSEY RL, HARA AT, YI K, DUHN CW. Bioactivity of novel self-assembled crystalline Nb₂O₅ microstructures in simulated and human salivas. **Biomedical Materials**, v. 1, p. 16–23. 2006.

- LEE SJ, MONSEF M, TORABINEJAD M. Sealing ability of mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **Journal of Endodontics**, v. 19, p. 541-4. 1993.
- LEITUNE VC, COLLARES FM, TAKIMI A, DE LIMA GB, PETZHOLD CL, BERGMANN CP, SAMUEL SM. Niobium pentoxide as a novel filler for dental adhesive resin. **Journal of Dentistry**, v. 41, p. 106-13. 2013.
- 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
- MAGNUSSON P, LARSSON L, MAGNUSSON M, DAVIE MWJ, SHARP CA. Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 14, p. 1926–33. 1999.
- MIN KS, KIM HI, PARK HJ, PI SH, HONG CU, KIM EC. Human pulp cells response to Portland cement in vitro. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 2, p. 163-6. 2007.
- NICKENIG HJ, SCHLEGEL KA, WICHMANN M, EITNER S. Expression of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in soft tissue over ceramic and metal implant materials before uncovering: a clinical pilot study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v. 27, n. 3, p. 671-6. 2012.
- NIU LN, JIAO K, WANG TD, ZHANG W, CAMILLERI J, BERGERON BE, FENG HL, MAO J, CHEN JH, PASHLEY DH, TAY FR. A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. **Journal of Dentistry**, v. 42, n. 5, p. 517-533. 2014.
- OLIVEIRA MG, XAVIER CB, DEMARCO FF, PINHEIRO AL, COSTA AT, POZZA DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. **Brazilian Dental Journal**, v. 18, p. 3-7. 2007.
- PARIROKH M, TORABINEJAD M. Mineral Trioxide Aggregate: A comprehensive literature review – part I: chemical, physical and antibacterial properties. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 16-27. 2010.
- REGISTER TC, MCLEAN FM, LOW MG, et al. Role of alkaline phosphatase and labile internal mineral in matrix vesicle-mediated calcification. **Journal Biological Chemistry**, v. 261, p. 9354–60. 1986.

REYES-CARMONA JF, FELIPPE MS, FELIPPE WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 731–6. 2009.

REYES-CARMONA JF, SANTOS AS, FIGUEIREDO CP, et al. Host-mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 1347–53. 2010.

RIBEIRO DA, SUGUI MM, MATSUMOTO MA, DUARTE MAH, MARQUES ME, SALVADORI DM. 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.

SAIDON J, JIANING H, ZHU Q, SAFAVI K, SPANGBERG L. 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.

SARKAR NK, CAICEDO R, RITWIK P, MOISEYEVA R, KAWASHIMA I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 2, p. 97–100. 2005.

SCHEMBRI M, PEPLOW G, CAMILLERI J. Analyses of Heavy Metals in Mineral Trioxide Aggregate and Portland Cement. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 7, p. 1210-5. 2010.

SILVA GF, BOSSO R, FERINO RV, TANOMARU-FILHO M, BERNARDI MI, GUERREIRO-TANOMARU JM, CERRI PS. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties, v. 102, n. 12, p. 4336-45. 2014.

SILVA GF, GUERREIRO-TANOMARU JM, SASSO-CERRI E, TANOMARU-FILHO M, CERRI PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 2, p. 100-10. 2011.

SILVA GF, TANOMARU-FILHO M, BERNARDI MI, GUERREIRO-TANOMARU JM, CERRI PS. 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.

TANOMARU-FILHO M, SILVA GF, DUARTE MAH, GONÇALVES M, GUERREIRO-TANOMARU JM. Radiopacity evaluation of root-end filling materials by digitization of images. **Journal Applied Oral Science**, v. 16, n. 6, p. 376-9. 2008.

TANOMARU-FILHO M, MORALES V, SILVA GF, BOSSO R, REIS JMSN, DUARTE MAH et al. Compressive strength and setting time of MTA and Portland cement associated with different radiopacifying agents. **ISRN Dentistry**, v. 2012, p. 898051. 2012.

TORABINEJAD M, WHITE DJ, inventors. Tooth filling material and use. Loma Linda University; US patent 5 769 638. 1995 May 16.

TORABINEJAD M, PITT FORD TR, MCKENDRY DJ, ABEDI HR, MILLER DA, KARIYAWASAM SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 4, p. 225-8. 1997.

TSUKAMOTO-TANAKA H, IKEGAME M, TAKAGI R, HARADA H, OHSHIMA H. 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.

VIAPIANA R, FLUMIGNAN DL, GUERREIRO-TANOMARU JM, CAMILLERI J, TANOMARU-FILHO M. 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.

VIVAN RR, ZAPATA RO, ZEFERINO MA, BRAMANTE CM, BERNARDINELI N, GARCIA RB 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.

VIOLA NV. 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.

VIOLA NV, GUERREIRO-TANOMARU JM, SILVA GF, SASSO-CERRI E, TANOMARU-FILHO M, CERRI PS. Morphological and morphometric analysis of the biocompatibility of an experimental MTA Sealer. **Journal of Biomedical Dental Material Research B Applied Biomaterials**, v. 100B, n.7, p. 1773-81. 2012.

WUCHERPFENNIG AL, GREEN DB. Mineral trioxide vs Portland cement; two biocompatible filling materials [abstract]. **Journal of Endodontics**, v. 25, p. 308. 1999.