

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**RAÍSSA REGINA CALDERAN**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES  
RADIOPACIFICADORES MICRO E  
NANOPARTICULADOS ASSOCIADOS À UM CIMENTO  
DE SILICATO DE CÁLCIO NO REPARO TECIDUAL:  
ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E  
MORFOMÉTRICA**

BAURU  
2016

**RAÍSSA REGINA CALDERAN**

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES  
RADIOPACIFICADORES MICRO E  
NANOPARTICULADOS ASSOCIADOS À UM CIMENTO  
DE SILICATO DE CÁLCIO NO REPARO TECIDUAL:  
ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA E  
MORFOMÉTRICA**

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  
2016**

Calderan, Raíssa Regina

C1465i

Influência de diferentes radiopacificadores micro e nanoparticulados associados à um cimento de silicato de cálcio no reparo tecidual: análise imuno-histoquímica e morfométrica / Raíssa Regina Calderan. -- 2016.

41f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva.

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

1. Endodontia. 2. Teste de materiais. 3. Materiais dentários. 4. Biocompatibilidade. 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 Raíssa Regina Calderan.

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 Raíssa Regina Calderan intitulado: **"Influência de diferentes radiopacificadores micro e nanoparticulados associados a um cimento de silicato de cálcio no reparo tecidual: análise imuno-histoquímica e morfométrica."** Compuseram a banca examinadora os professores Dr. Guilherme Ferreira da Silva, Dr. Fernando Accorsi Orosco, Ms. Murilo Priori Alcalde e Dra. Danieli Colaço Ribeiro. Após a exposição oral, a candidata foi arguida pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, Aprovado, 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 pela oportunidade de chegar até final deste curso, por ter me amparado frente as dificuldades. Aos meus pais Lauro e Leni e meu irmão Ricardo, que sempre me ajudaram no decorrer do curso, apoiando minhas decisões e incentivando meus estudos. Ao meu Orientador Guilherme pela paciência, comprometimento e todo apoio para elaboração deste trabalho.

Agradeço a Universidade do Sagrado Coração e todos os professores que foram responsáveis pela minha formação pessoal e profissional, me tornando uma pessoa melhor.

Agradeço todos os meus amigos que sempre me incentivaram e ajudaram durante esta caminhada, em especial a minha amiga Letícia que me acompanhou diariamente nesses 4 anos de formação.

## RESUMO

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) é basicamente composto por 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 o processo de reparação em resposta a um cimento de silicato de cálcio, cimento Portland (CP), associado ao óxido de zircônio ou ao óxido de nióbio micro e nanoparticulados, comparando-os ao MTA-Angelus. Para isso, foram realizadas análises morfológica, morfométrica e imuno-histoquímica para fator de crescimento de fibroblasto-1. Foram utilizados 50 ratos Holtzman distribuídos de acordo com o material testado e o período experimental. Os materiais foram manipulados e inseridos em tubos de polietileno; os animais foram anestesiados e os tubos foram implantados no tecido subcutâneo dos ratos. Decorrido os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, os animais foram mortos 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 a lâminas de vidro e corados com tricrômico de Masson para realização das análises morfológica e morfométrica da cápsula adjacente aos implantes. Na análise morfométrica, o número total de células inflamatórias (CI) e de fibroblastos (FB) foi quantificado. Além disso, outros cortes foram utilizados para a quantificação de colágeno na cápsula, usando a técnica do picrosírius associado à análise ao microscópio com luz polarizada. Cortes dos implantes também foram aderidos a lâminas silanizadas para a realização da reação imuno-histoquímica para detecção de fator de crescimento de fibroblasto-1 e, com auxílio de um programa de análise de imagens, o número de células imunomarcadas ao FGF-1 foi quantificado. Todos os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Em todos os períodos, o número de CI foi significativamente menor nos materiais experimentais e no grupo controle em comparação ao MTA. Além disso, o número de FB reduziu significativamente no grupo MTA. O número de células imunomarcadas nas cápsulas adjacentes aos materiais experimentais foi significativamente maior do que o MTA. Por fim, a quantidade de colágeno birrefringente na cápsula adjacente ao MTA foi estatisticamente menor do que nos outros grupos em todos os períodos. Assim, pode-se concluir que os materiais experimentais (CP+ZrO<sub>2</sub> ou CP+Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)

induzem a proliferação de fibroblastos e aceleram a regressão da reação inflamatória. No entanto, a adição de radiopacificadores nanoparticulados não melhorou as propriedades do cimento de silicato de cálcio quando comparado aos agentes microparticulados.

**Palavras-chave:** Endodontia. Testes de materiais. Materiais dentários. Biocompatibilidade.

## ABSTRACT

Mineral Trioxide Aggregate (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 present study was to evaluate the influence of nanoparticulated agents ( $ZrO_2$  or  $Nb_2O_5$ ) added to a calcium silicate-based cement (CS) on the healing process of rat subcutaneous tissue, compared to MTA-Angelus<sup>TM</sup>. Polyethylene tubes filled with the materials were implanted into rats subcutaneous. After 7, 15, 30 and 60 days, the specimens were fixed and embedded in paraffin. Masson's trichrome sections were used for morphometrical analysis of inflammatory cells (IC) and fibroblast (Fb). Sections were also stained with picosirius red to calculate the collagen fiber content. Detection of fibroblast grown factor-1 (FGF-1) by immunohistochemistry was performed and the number of immunolabeled cells was obtained. Other sections were adhered to silanized slides for immunohistochemical detection of fibroblast grown factor-1 (FGF-1). Data were subjected to ANOVA and Tukey test ( $p \leq 0.05$ ). The number of IC in the MTA group was significantly increased in comparison to other groups in all periods. In the other hand, the number of fibroblast and FGF-1 immunolabeled cells and the collagen fiber content reduced in the capsule adjacent to MTA implants when compared to CS with  $ZrO_2$  or  $Nb_2O_5$  and control group in all experimental periods. The addition of  $ZrO_2$  or  $Nb_2O_5$  to the CS induced an earlier repair in the subcutaneous in comparison to MTA. However, the particle size did not significantly affect the tissue reaction of the calcium silicate-based cement.

**Keywords:** Endodontics. Material's test. Dental materials. Biocompatibility.



## SUMÁRIO

Introdução e Revisão de Literatura.....	8
Proposição.....	13
Material e métodos .....	14
Resultados.....	18
Discussão .....	24
Conclusões.....	25
Referências .....	26

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A obturação retrógrada é uma das etapas da cirurgia pararendodôntica cujo objetivo é promover o selamento do canal radicular, após a apicectomia, com um material que apresente características físicas, químicas e biológicas adequadas. O material retrobturador ideal deve prevenir a infiltração de micro-organismos, possuir estabilidade dimensional, ser insolúvel, não sofrer influência da umidade, ser de fácil manipulação e manuseio, possuir radiopacidade e, em contato com os tecidos apicais e periapicais, deve apresentar biocompatibilidade. (TORABINEJAD, PITT-FORD, 1996).

Ao longo dos anos, diversos materiais têm sido estudados e indicados para serem utilizados no preenchimento de cavidades retrógradas. O amálgama foi utilizado amplamente, porém, em virtude do alto índice de insucesso clínico, quando utilizado como material retrobturador, este produto não tem sido mais recomendado (FRANK et al., 1992). As desvantagens, frequentemente atribuídas ao amálgama incluem falhas na adaptação marginal, contaminação por mercúrio e estanho, sensibilidade à umidade e citotoxicidade. (TORABINEJAD et al., 1993; BADR, 2012). Assim, o amálgama foi sendo substituído, no selamento de cavidades retrógradas, pelos materiais à base de óxido de zinco e eugenol como, por exemplo, o Intermediate Restorative Material (IRM) e o Super EBA por estes apresentarem biocompatibilidade e selamento marginal superiores ao amálgama. (TORABINEJAD, PITT-FORD 1993; AQRABAWI, 2000). Além disso, tanto o IRM quanto o Super EBA apresentam um valor de radiopacidade satisfatório (TANOMARU-FILHO et al., 2008), superior ao mínimo recomendado pela norma da ISO para materiais endodônticos. (ISO, 2001).

Alguns cimentos endodônticos utilizados na obturação do canal radicular também são propostos como material retrobturador. Dentre eles, o Diaket, um cimento à base de resina epóxica, o qual possibilita um selamento apical satisfatório quando usado no preenchimento de cavidades retrógradas. (GERHARDS, WAGNER 1996). O Sealer 26 é outro tipo de cimento à base de resina epóxica que, em uma consistência mais espessa, com maior quantidade de pó em relação à resina, também tem sido proposto como material retrobturador. Já foi demonstrado que o Sealer 26 nesta consistência apresenta selamento marginal superior ao IRM (SIQUEIRA et al., 2001) e radiopacidade de, aproximadamente, 6 mm Al (TANOMARU-FILHO et al., 2008). Tanomaru-Filho et al. (2006) verificaram que, após a obturação retrógrada, o Sealer 26

promoveu o reparo periapical, induzindo a formação de cimento e osso alveolar em dentes de cães com lesão periapical. O Sealapex, por sua vez, é um cimento endodôntico que apresenta excelente biocompatibilidade e que, adicionado ao óxido de zinco, é indicado como material retrobturador por resultar em um produto com consistência adequada para ser aplicado clinicamente e por promover o reparo apical e periapical. (TANOMARU-FILHO et al., 2006).

Atualmente, o Mineral Trióxido Agregado (MTA), por proporcionar bom selamento marginal, mesmo na presença de umidade, e apresentar biocompatibilidade, tem sido considerado o material de escolha em casos de retrobturação. (TORABINEJAD et al., 1993; TORABINEJAD et al., 1995; HOLLAND et al., 2001; HOLLAND et al., 2002; BAEK et al., 2005). Estudos *in vivo* mostraram que o MTA é capaz de induzir a formação de osso, dentina e cimento. (BAEK et al., 2005; SILVA et al., 2011). Além disso, quando comparado ao amálgama e ao Super EBA como material retrobturador, o MTA favorece a reparação dos tecidos periapicais, incluindo ligamento periodontal, cimento e osso alveolar. (TORABINEJAD et al., 1997).

O MTA é essencialmente composto por cimento Portland (CP) 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). 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, 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 observaram que cimento Portland é um material biocompatível, ou seja, não é genotóxico e não induz morte celular (RIBEIRO et al., 2006); o cimento Portland possui baixa citotoxicidade (KIM et al., 2008) e permitiu a proliferação e adesão celular (MIN et al., 2007). Este material 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).

Apesar de o MTA apresentar vantagens em relação a outros tipos de materiais utilizados no preenchimento de cavidades retrógradas, estudos demonstram que o óxido de bismuto prejudica algumas propriedades do CP, tais como, a resistência à compressão (COOSMARAWAMY et al., 2007; CAMILLERI 2008; TANOMARU-FILHO et al., 2012) e a biocompatibilidade. (CAMILLERI et al., 2004; MIN ET AL., 2007; KIM et al., 2008; SILVA et al., 2014). O óxido de bismuto não faz parte da reação de presa do MTA (CAMILLERI 2007), além disso, sua presença aumenta a porosidade do CP o que pode ocasionar um aumento na sua solubilidade e desintegração, diminuindo, assim, a resistência deste cimento. (COOSMARAWAMY et al., 2007; CAMILLERI 2008). Em relação à biocompatibilidade, o OB não permite a adesão celular e inibe o crescimento de osteoblastos. (CAMILLERI et al., 2004). O CP, por sua vez, quando comparado ao CP adicionado ao OB, permite maior crescimento e proliferação celular em contato com células pulpares humanas. (MIN et al., 2007; KIM et al., 2008). Assim, a utilização de outros tipos de radiopacificadores em associação ao CP vem sendo sugerida. (BORTOLUZZI et al., 2009; DUARTE et al., 2009; CAMILLERI 2010).

A associação do óxido de zircônio ( $Zr_2O$ ) ao CP apresenta radiopacidade satisfatória (BORTOLUZZI et al., 2009; DUARTE et al., 2009) e não causa danos no DNA de fibroblastos. (RIBEIRO et al., 2009). Um estudo realizado com cultura de células do ligamento periodontal revelou que o óxido de zircônio associado ao CP não apresenta citotoxicidade. (GOMES-CORNELIO et al., 2011). Camilleri et al. (2011) demonstrou que 30% de OZr adicionado ao CP não interfere no mecanismo de hidratação deste cimento, proporcionando a liberação de íons cálcio e, portanto, resultando em um material bioativo. (CAMILLERI et al., 2011). Tem sido demonstrado que o óxido de zircônio associado ao cimento Portland fornece um material com boas propriedades físicas e químicas, comparáveis às do MTA. (CUTAJAR et al., 2011). Além disso, a adição do óxido de zircônio ao CP apresenta um pH alcalino, proporciona a liberação de íons cálcio e exibe baixa solubilidade. (DUARTE et al., 2012).

Recentemente, foi demonstrado 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<sub>2</sub>O, em tecido subcutâneo de ratos, demonstrou que este material induz um processo inflamatório de menor intensidade quando comparado ao CP+ Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. (SILVA et al., 2014).

O Níóbio, por sua vez, é um metal utilizado largamente na indústria aeroespacial, naval e siderúrgica; o uso deste metal deve-se ao fato de ser um eficiente agente anti-corrosivo e resistente aos ácidos mais agressivos. Na Odontologia, o níóbio tem sido indicado no tratamento de superfícies de implantes por ser um material biocompatível que favorece a osseointegração. (JOKINEN et al., 1998; NICKENIG et al., 2012). Além disso, estudos mostraram que o óxido de níóbio adicionado à cultura de osteoblastos não impediu a proliferação celular e, portanto, foi considerado não citotóxico. (VELTEN et al., 2004; OCHSENBEIN et al., 2008). A utilização do óxido de níóbio (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) como radiopacificador vem sendo estudada. A adição de Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> a um cimento experimental endodôntico a base de metacrilato resultou em um material com propriedades físicas e químicas satisfatórias com aumento da radiopacidade de microdureza. (LEITUNE et al., 2013).

Silva et al. (2015) estudaram a influência do Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 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.

Além da interferência do radiopacificador, a dificuldade de manipulação e inserção na cavidade, devido a sua consistência arenosa, e o longo tempo de presa são outras desvantagens, frequentemente, associadas ao MTA. (ABDULLAH et al., 2002; CAMILLERI et al., 2005; KOGAN et al., 2006). Há algumas evidências de que o tamanho das partículas dos materiais que compõem o MTA interfere em suas propriedades físicas e químicas bem como com a sua compatibilidade. Assim, tem sido demonstrado que quanto menor forem as partículas do MTA e do cimento Portland, mais homogênea é a microestrutura destes materiais o que pode favorecer a hidratação, diminuindo a porosidade e favorecendo o manuseio destes produtos. (BENTZ et al.,

1999; KOMABAYASH, SPANGBERG 2008). Já foi observado que uma nova versão do MTA (Nano Endodontic Cement) exibiu tempo de presa reduzido e aumento na microdureza em comparação ao ProRoot MTA® branco. (SAGHIRI et al., 2012). Desta maneira, pesquisas com alterações na formulação do MTA têm sido realizadas na tentativa de melhorar as suas propriedades físicas e químicas sem prejudicar a sua biocompatibilidade.

Para o desenvolvimento de novos materiais retrobturadores é etapa fundamental o estudo das propriedades físicas, químicas e biológicas do produto. Este material deve ser biocompatível, ou seja, em contato com os tecidos apicais e periapicais, deve induzir o processo de reparo. (TORABINEJAD, PITT-FORD 1996; TANOMARU-FILHO et al., 2006). As propriedades biológicas do MTA têm sido atribuídas ao seu pH alcalino e sua capacidade de liberação de íons cálcio. (SRAKAR et al., 2005; MASSI et al., 2011). Inicialmente, ocorre uma agressão ao tecido em contato com o material causando a migração de diversas células inflamatórias. Tem sido relatado que a intensidade e a progressão do processo inflamatório são influenciadas por diversos fatores locais e sistêmicos. Além disso, o processo inflamatório envolve vários eventos moleculares e celulares que resultam na produção e liberação de citocinas, que são os moduladores da inflamação, tais como interleucina 1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e prostaglandinas – PGE<sub>2</sub>. (SCHRODER et al., 2006; HRABAK et al., 2008; NIBALI et al., 2012). Dentre estes moduladores, está a IL-6 a qual é uma citocina inflamatória secretada por células T, monócitos e macrófagos em resposta a um antígeno ou outra citocinas, tais como, IL-1 e TNF. (NIBALI et al., 2012). Além disso, esta citocina é encontrada em grande número em inflamações da polpa e dos tecidos periapicais (BARKHORDAR et al., 1999) e parece ser importante na modulação da extensão das lesões periapicais por estimular a diferenciação e o recrutamento de osteoclastos. (FOUAD, ACOSTA 2001).

O MTA, inicialmente, promove o recrutamento, proliferação e diferenciação de células inflamatórias causando um processo inflamatório no tecido em contato com este material. (VOSOUGHHOSSEINI et al., 2008; SHAHI et al., 2010; SILVA et al., 2011; VIOLA et al., 2012). Esta reação inflamatória induzida pelo MTA pode ser atribuída ao alto pH e ao calor produzido durante a presa do MTA. (SHAHI et al., 2010). Além disso, estudos mostraram que o MTA estimula a produção de citocinas moduladoras da inflamação como, por exemplo, IL-1 e IL-6. (KOH et al., 1998; SILVA et al., 2008; GOMES-FILHO et al., 2009; SILVA et al., 2015). Subseqüentemente, há uma redução significativa do número de células inflamatórias em contato

com o MTA (SILVA et al., 2011; VIOLA et al., 2012; SILVA et al., 2015) o que deve ocorrer devido a uma queda na expressão das citocinas pró-inflamatórias, contribuindo, assim, para o reparo do tecido. (SILVA et al., 2008).

O reparo dos tecidos é um processo complexo envolvendo uma série de eventos celulares que incluem inflamação, formação de tecido de granulação, remodelação e a liberação de vários mediadores químicos. Dentre os mediadores químicos, estão os fatores de crescimento que são peptídeos liberados por diversas células e fazem parte de uma superfamília de citocinas. Estes fatores estimulam a proliferação, a migração, a diferenciação e a atividade celular. (CONSOLARO 2009). Um dos fatores de crescimento envolvidos no processo de reparação é o FGF (fator de crescimento de fibroblastos) o qual é produzido por queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células musculares, condrócitos, monócitos, macrófagos e mastócitos. (WAHL et al., 1989; BARRIENTOS et al., 2008; ZAKRZEWSKA et al., 2008).

O FGF promove a proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares (BURGESS, MACIAG 1989), atuando como um potente agente mitogênico e quimiotático para células endoteliais e fibroblastos. (BROADLEY et al., 1988; FINKLESTEIN et al., 1988; PRESTA et al., 2005). Estudos demonstraram que o FGF acelera a formação do tecido de granulação (MULLANE et al., 2008), estimula a angiogênese (MULLANE et al., 2008) e parece exercer um papel decisivo na remodelação do colágeno por estimular os fibroblastos a produzirem colagenase. (LAZAROU et al., 1989; SASAKI 1992). Estas fibras colágenas produzidas são fundamentais não só na manutenção da integridade estrutural, mas também na determinação da função dos tecidos previamente lesionados. Todas estas etapas conjuntamente serão importantes no processo de reparação.

## 2. PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve por objetivo investigar a resposta tecidual induzida por diferentes radiopacificadores micro e nanoparticulados, associados a um cimento à base de silicato de cálcio, no subcutâneo dorsal de ratos em diferentes períodos experimentais. Para isso, foram realizadas análises morfológica, morfométrica e imuno-histoquímica da cápsula formada adjacente aos implantes contendo os materiais, verificando:

- O processo de substituição da reação inflamatória por uma cápsula de colágeno no tecido adjacente aos materiais implantados por meio de análise morfológica e morfométrica;
- O conteúdo de colágeno birrefringente na cápsula adjacente aos implantes;
- A imunoexpressão do fator de crescimento de fibroblasto-1 no tecido em contato com os diferentes materiais.



### 3. 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). Foram utilizados 50 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 e seus respectivos fabricantes estão no quadro 1.

Quadro 1. Composição e fabricantes dos materiais avaliados

<b>Materiais</b>	<b>Composição</b>	<b>Fabricantes</b>
CP+Zr <sub>2</sub> O micro	70% de cimento Portland (CP) 30% de óxido de zircônio microparticulado	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA
CP+Zr <sub>2</sub> O nano	70% de cimento Portland (CP) 30% de óxido de zircônio nanoparticulado	Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil)
CP+Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> micro	70% de cimento Portland (CP) 30% de óxido de nióbio microparticulado	Sigma-Aldrich Brasil Ltd., São Paulo – SP, Brasil
CP+Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> nano	70% de cimento Portland (CP) 30% de óxido de nióbio nanoparticulado	Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil)
MTA	MTA Angelus branco	Angelus, Londrina, Brasil

Os materiais nanoparticulados, Zr<sub>2</sub>O e Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, foram processados no Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil) obtendo-se um tamanho de partícula de 74 nm e 83 nm, respectivamente, conforme descrito por Viapiana et al. em 2014.

O MTA, o CP+Zr<sub>2</sub>O micro e o CP+Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> micro 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). Já os materiais nanoparticulados foram manipulados utilizando-se a proporção pó/liquido de 1g/0,33mL. (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2015).

Os materiais, previamente esterilizados pelo método ultravioleta por 30 minutos, foram manipulados e inseridos em tubos de polietileno com 10 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro interno (Embramed Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil), previamente esterilizados com óxido de etileno. 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 polietileno de materiais distintos.

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 polietileno preenchidos com material foram implantados, sendo um em uma posição ventral e o outro caudal. Após os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias, os tubos foram removidos juntamente com o tecido conjuntivo adjacente e preparados para análise ao microscópio de luz.

Os espécimes contendo os tubos de polietileno implantados foram fixados em formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2 por 48 h em temperatura ambiente. Posteriormente, os espécimes foram desidratados e embebidos em parafina. Cortes longitudinais com espessura de 6 µm foram aderidos às lâminas de vidro e corados com tricrômico de Masson ou picrosirius. Além disso, alguns cortes foram aderidos à lâminas silanizadas para detecção imuno-histoquímica do fator de crescimento de fibroblasto-1 (FGF-1).

## MÉTODOS DE ANÁLISE

### ANÁLISE MORFOLÓGICA

A partir dos cortes corados com tricrômico de Masson, foi realizada a análise descritiva da cápsula de tecido conjuntivo adjacente aos implantes. Nesta análise, foi considerada a presença ou a ausência de processo inflamatório, o tipo de células inflamatórias, presença de células gigantes multinucleadas, vasos sanguíneos, fibroblastos e presença de fibras colágenas.

## ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Com o objetivo de observar possíveis variações nas reações induzidas pelos diferentes materiais, foi realizada também uma análise morfométrica no tecido adjacente aos implantes, com o auxílio de um microscópio de luz (BX51, Olympus, Tokyo, Japão) e um sistema de análise de imagens (Image Pro-Express 6.0, Olympus). Em cada implante, três cortes corados com tricrômico de Masson foram selecionados em intervalos de, no mínimo, 100  $\mu\text{m}$ . Em cada corte, uma área padrão do tecido conjuntivo adjacente à abertura do tubo foi capturada com a objetiva de 40x. Utilizando o sistema de análise de imagens, uma grade reticular padronizada, contendo 204 pontos de intersecção, foi colocada sobre a imagem capturada. O número de células inflamatórias (neutrófilos, plasmócitos e macrófagos) foi computado; vasos sanguíneos, fibras colágenas, espaços extracelulares e partículas de material na cápsula foram quantificados como outras estruturas. Os dados foram submetidos à análise estatística, utilizando-se o programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA), usando ANOVA e o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## ANÁLISE AO MICROSCÓPIO DE POLARIZAÇÃO

Uma estimativa da quantidade de colágeno na cápsula foi realizada usando a técnica do picrosírius associado à análise ao microscópio com luz polarizada, preconizada por Junqueira et al. (1979; 1982). Os cortes foram desparafinizados e hidratados em séries decrescentes de etanol até água destilada. Os cortes foram imersos em solução de 0,1% de Sirius-Red por 1 hora. Após lavagem, os cortes foram desidratados, diafanizados e montados para análise em microscopia de polarização.

Os cortes corados com picrosírius foram analisados com os filtros de polarização acoplados ao microscópio de luz Olympus (modelo BX-51). Foi realizada uma análise semi-quantitativa do colágeno presente na cápsula adjacente aos implantes, em todos os períodos. Foram utilizados 2 cortes/implante de cada material, corados com picrosírius, com distância mínima entre os cortes de 100  $\mu\text{m}$ . Em cada corte, foi capturada uma imagem da cápsula, em objetiva de 10x, equivalente a uma área de aproximadamente 1,45  $\text{mm}^2$  (FONSECA et al., 2016). As frequências de colágeno com birrefringência vermelho/alaranjado (matiz 2-38 e 230-256), amarelo (matiz 39-51) e verde (matiz 52-128) foram estimadas, de acordo com Manni et al. (2011). As imagens foram capturadas com a padronização dos parâmetros, tais como:

intensidade de luz, abertura do diafragma do condensador, altura do condensador, objetiva, angulação do polarizador e brilho da imagem. A partir das imagens capturadas, foi mensurada a porcentagem relativa ocupada por determinado comprimento de onda; para isso, foi utilizado o programa ImageJ<sup>®</sup> (NIH), seguindo-se a metodologia proposta por Rich, Whittaker (2005). Os resultados obtidos a partir da estimativa da birrefringência vermelho/laranja, amarelo e verde foram somados, obtendo-se um valor total de colágeno birrefringente na cápsula de cada material implantado. (FONSECA, 2014).

A média e desvio padrão de cada grupo foram calculados e os dados foram submetidos à análise estatística, utilizando-se do programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA) usando ANOVA e o teste de Tukey.

#### ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE FGF

Considerando que FGF (fator de crescimento de fibroblastos) estimula a proliferação e diferenciação de diversos tipos de células, foi nosso propósito verificar se ocorre uma variabilidade de sua imunexpressão nas cápsulas adjacentes aos materiais implantados no subcutâneo.

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 20 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 anti-FGF-1 produzido em camundongo (anti-FGF-1, Santa Cruz<sup>®</sup>, EUA) na titulação de 1:150, a 4° C durante 16 horas. Após a lavagem em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo/rato/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. Os cortes foram lavados com tampão Tris-HCl, a atividade da peroxidase foi revelada com solução de 3.3-diaminobenzidina (Betazoid DAB Chromogen Kit – Biocare Medical, USA) durante 2-3 minutos e, subsequentemente, foi realizada a contracoloração com hematoxilina de Carazzi. Como controle negativo, os cortes foram submetidos às mesmas etapas, exceto a incubação com o anticorpo primário; nesta etapa, os cortes foram incubados com soro não imune.

A fim de verificar diferenças entre os grupos nos diferentes períodos experimentais, foi realizada a quantificação de células imunomarcadas ao FGF. Com auxílio de uma câmera (DP-71, Olympus – Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus, modelo BX-51), em aumento final de 695x, 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 capturada (área teste) de aproximadamente  $0,09\text{mm}^2$  da cápsula, foram computadas obtendo-se, assim, um valor de células imunopositivas/ $\text{mm}^2$ . Ao final, foi estabelecida uma média para cada grupo experimental de acordo com o período experimental e o material estudado (SILVA et al., 2014). Aos dados obtidos, foi aplicada a análise estatística, usando o programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA), ANOVA e teste de Tukey com nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Aos 7 dias, o tecido adjacente aos implantes apresentou inúmeras células inflamatórias, especialmente, neutrófilos e linfócitos, e vasos sanguíneos dispersos na cápsula; poucos fibroblastos e feixes de fibras colágenas foram observados (Figura 1). Neste período, todos os grupos apresentaram os maiores valores para o número de CI, porém, o número de Fb foi significativamente menor em comparação aos outros períodos experimentais (Tabela 2). Após este período, uma redução significativa e gradual foi verificada entre os períodos (7, 15, 30 and 60 days), o que foi acompanhado pelo aumento de fibroblastos (Tabela 2; Figura 1 and 2).

No período de 15 dias, as cápsulas adjacentes aos implantes exibiram fibroblastos entre fibras colágenas e alguns linfócitos, plasmócitos e macrófagos dispersos no tecido (Figs. 1G-1L). Após 30 e 60 dias de implantação, as cápsulas exibiram típicos feixes de fibras colágenas entre fibroblastos e poucas CI (Figura 2); nestes períodos, o número de Fb foi estatisticamente superior ao observado aos 7 dias em todos os grupos (Tabela 2).

A comparação entre os diferentes grupos mostrou que o número de CI no tecido adjacente ao MTA foi estatisticamente superior quando comparado aos outros grupos. Por outro lado, os valores de Fb observados na cápsula adjacente ao MTA foi significativamente menor do que os verificados para o CP+Zr<sub>2</sub>O<sub>5</sub>micro, CP+Zr<sub>2</sub>O<sub>5</sub>nano, CP+Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>micro e CP+Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>nano. Diferenças estatísticas não foram detectadas entre os grupos com Zr<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> micro ou nanoparticulado para os dois parâmetros, porém, os valores observados para esses materiais foi significativamente diferente para o verificado no grupo controle em todos os períodos (Tabela 1).

**Tabela 1** – Densidade volumétrica de células inflamatórias (CI) e fibroblastos (Fb) na cápsula adjacente aos diferentes materiais e ao grupo controle

	MTA	CP+Zr <sub>2</sub> O Micro	CP+Zr <sub>2</sub> O nano	CP+Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Micro	CP+Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> nano	Controle
<b>7 dias</b>						
Fb	4,8 (0,4) <sup>a,1</sup>	6,6(0,7) <sup>b,1</sup>	6,6 (1,8) <sup>b,1</sup>	7,0 (0,5) <sup>b,1</sup>	6,7 (2,1) <sup>b,1</sup>	9,3 (0,4) <sup>c,1</sup>
CI	16,0 (0,7) <sup>a,1</sup>	14,4 (0,7) <sup>b,1</sup>	14,4 (1,1) <sup>b,1</sup>	13,9 (1,1) <sup>b,1</sup>	14,7 (1,4) <sup>b,1</sup>	7,0 (0,7) <sup>c,1</sup>
Outros	78,2 (0,4) <sup>a,1</sup>	9,0 (1,3) <sup>a,1</sup>	79,0 (2,1) <sup>a,1</sup>	79,1 (0,7) <sup>a,1</sup>	78,6 (0,9) <sup>a,1</sup>	83,7 (3,5) <sup>a,1</sup>
<b>15 dias</b>						
Fb	10,0 (0,7) <sup>c,2</sup>	14,0 (2,1) <sup>b,2</sup>	13,9 (3,5) <sup>b,2</sup>	14,4 (2,1) <sup>b,2</sup>	13,5 (2,1) <sup>b,2</sup>	18,6 (2,8) <sup>a,2</sup>
CI	11,0 (0,7) <sup>a,2</sup>	6,6 (2,1) <sup>b,2</sup>	7,0 (2,8) <sup>b,2</sup>	6,3 (1,4) <sup>b,2</sup>	7,6 (0,7) <sup>b,2</sup>	2,4 (0,1) <sup>c,2</sup>
Outros	79,0 (2,9) <sup>a,1</sup>	79,4 (2,2) <sup>a,1</sup>	79,1 (2,4) <sup>a,1</sup>	79,3 (1,5) <sup>a,1</sup>	78,9 (2,5) <sup>a,1</sup>	77,0 (3,1) <sup>a,1</sup>
<b>30 dias</b>						
Fb	11,0 (0,7) <sup>a,2</sup>	17,9 (4,9) <sup>b,2</sup>	18,7 (4,2) <sup>b,2</sup>	18,1 (1,4) <sup>b,3</sup>	18,6 (1,4) <sup>b,3</sup>	20,9 (1,9) <sup>c,3</sup>
CI	6,8 (0,1) <sup>a,3</sup>	3,1 (0,9) <sup>b,3</sup>	3,7 (0,7) <sup>b,3</sup>	3,5 (1,4) <sup>b,3</sup>	4,0 (1,4) <sup>b,3</sup>	1,7 (0,7) <sup>c,3</sup>
Outros	82,2 (0,8) <sup>a,2</sup>	79,0 (1,6) <sup>b,1</sup>	77,6 (2,2) <sup>b,1</sup>	77,4 (2,1) <sup>b,1</sup>	76,4 (2,5) <sup>b,1</sup>	77,4 (1,1) <sup>b,2</sup>
<b>60 dias</b>						
Fb	14,4 (0,7) <sup>a,3</sup>	20,0 (1,8) <sup>b,3</sup>	21,5 (0,7) <sup>b,3</sup>	21,1 (1,1) <sup>b,4</sup>	21,6 (1,1) <sup>b,4</sup>	25,5 (2,8) <sup>c,4</sup>
CI	3,9 (0,1) <sup>a,4</sup>	1,7 (1,5) <sup>b,4</sup>	2,2 (0,7) <sup>b,4</sup>	1,9 (0,1) <sup>b,4</sup>	2,4 (0,4) <sup>b,4</sup>	0,7 (0,7) <sup>c,4</sup>
Outros	81,7 (0,7) <sup>a,2</sup>	78,3 (0,5) <sup>b,1</sup>	76,3 (2,5) <sup>b,1</sup>	77,0 (2,4) <sup>b,1</sup>	76,0 (1,1) <sup>b,1</sup>	73,8 (1,5) <sup>b,3</sup>

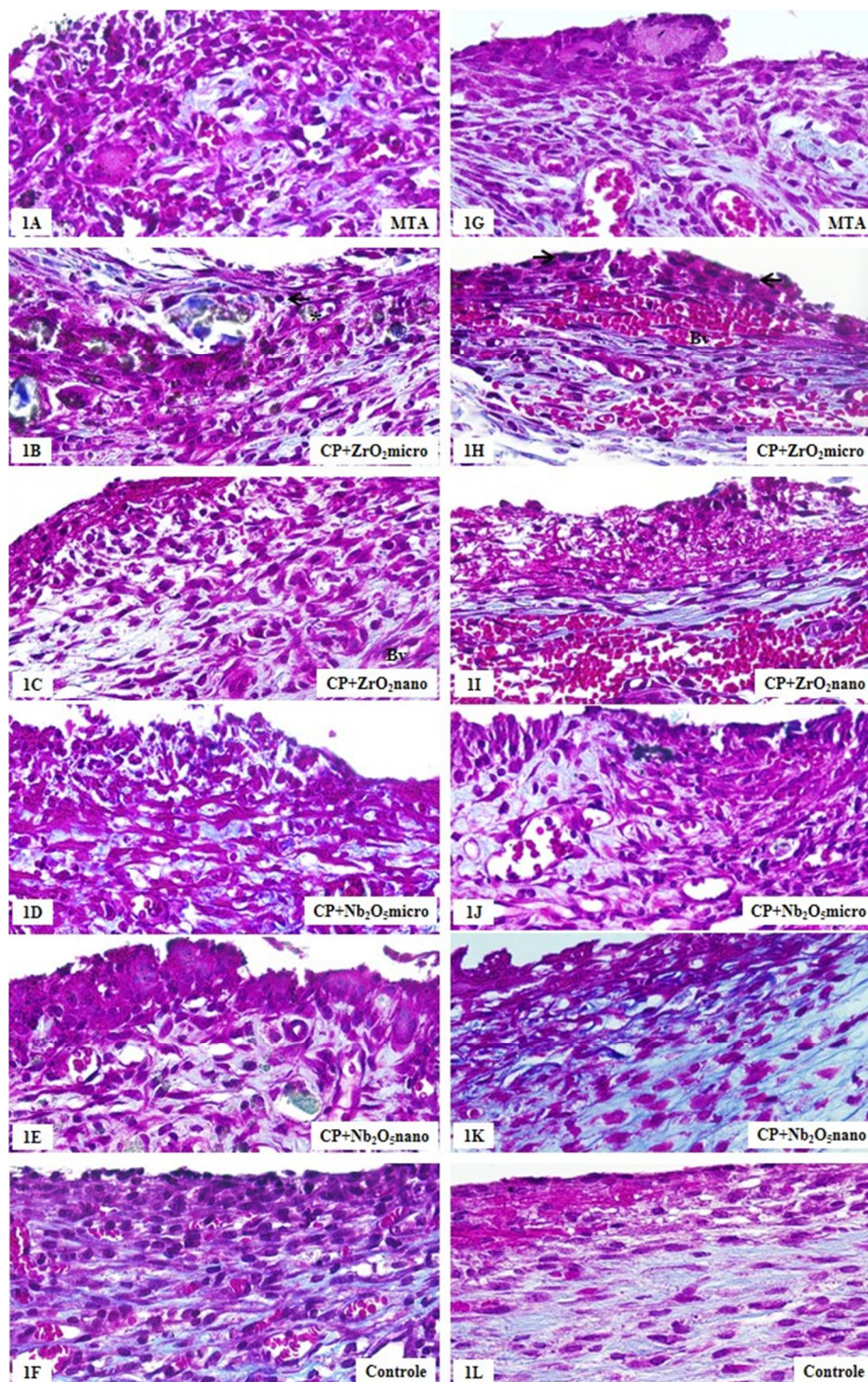
\*média (desvio padrão)

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

A comparação entre os períodos ( $p \leq 0,05$ ) está indicada por números nas colunas.

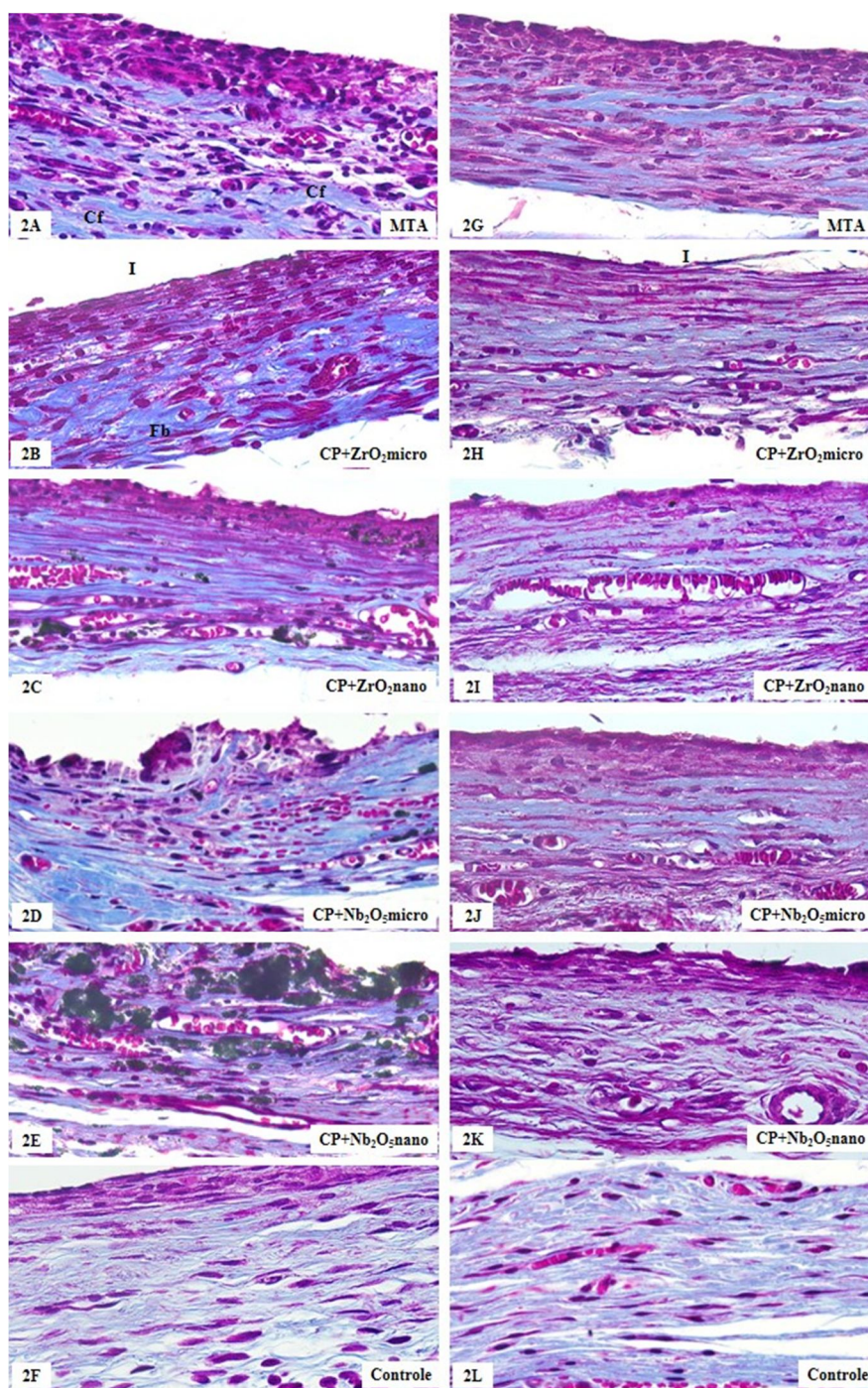
Outros=vasos sanguíneos, espaços extracelulares, fibras colágenas e material.





**Figura 1** – Fotomicrografias mostrando porções da cápsula adjacente aos diferentes materiais no subcutâneo aos 7 dias (**Figs. 1A-1F**) e 15 dias (**Figs. 1F-1L**) coradas com tricrômico de Masson. 300x.

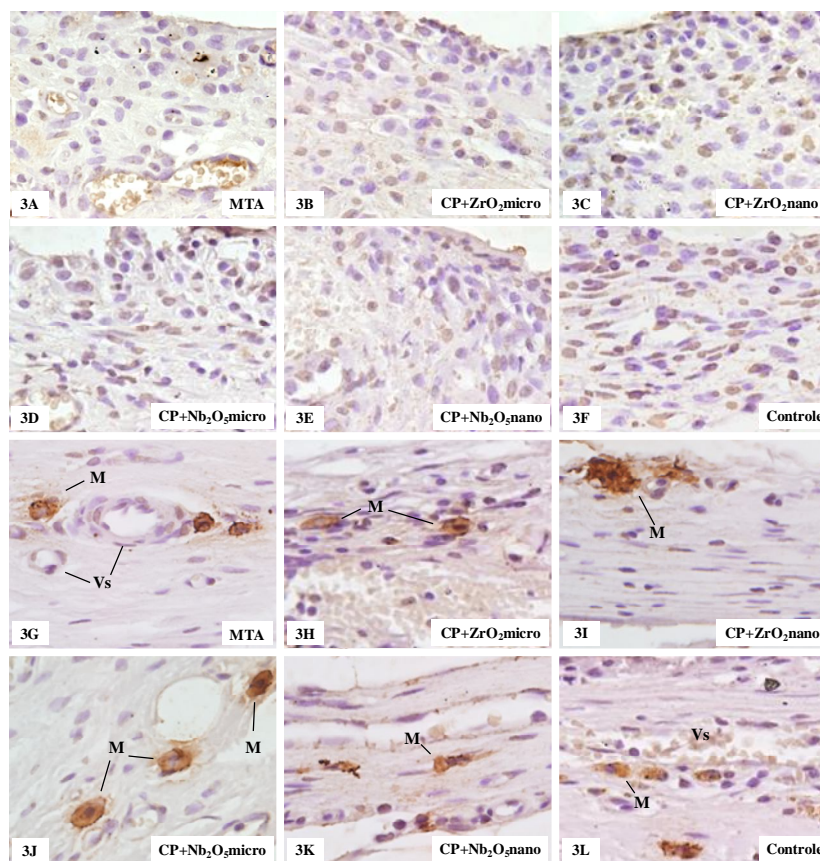




**Figura 2** – Fotomicrografias mostrando porções da cápsula adjacente aos diferentes materiais no subcutâneo aos 30 dias (**Figs. 2A-2F**) e 60 dias (**Figs. 2F-2L**) coradas com tricrômico de Masson. 300x.

### DENSIDADE NUMÉRICA DE CÉLULAS IMUNOMARCADAS AO FGF-1

Nos cortes submetidos à reação imuno-histoquímica para a detecção de FGF-1, células imunomarcadas foram observadas nas cápsulas de todos os grupos. Uma quantidade maior de células imunopositivas foram observadas nas cápsulas aos 7 dias em comparação com 60 dias (Figs. 3A-3L). De acordo com a Tabela 2, a análise quantitativa revelou uma redução gradual e significativa na densidade numérica das células imunomarcadas ao FGF-1 nas cápsulas a partir dos 7 dias até 60 dias. Em todos os períodos, o número de células imunopositivas nas cápsulas adjacentes ao CP+ZrO<sub>2</sub> (micro and nano) e CP+Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (micro and nano) foi significativamente maior do que no grupo MTA. No entanto, os maiores valores de células FGF-1 positivas foram observadas no grupo controle.

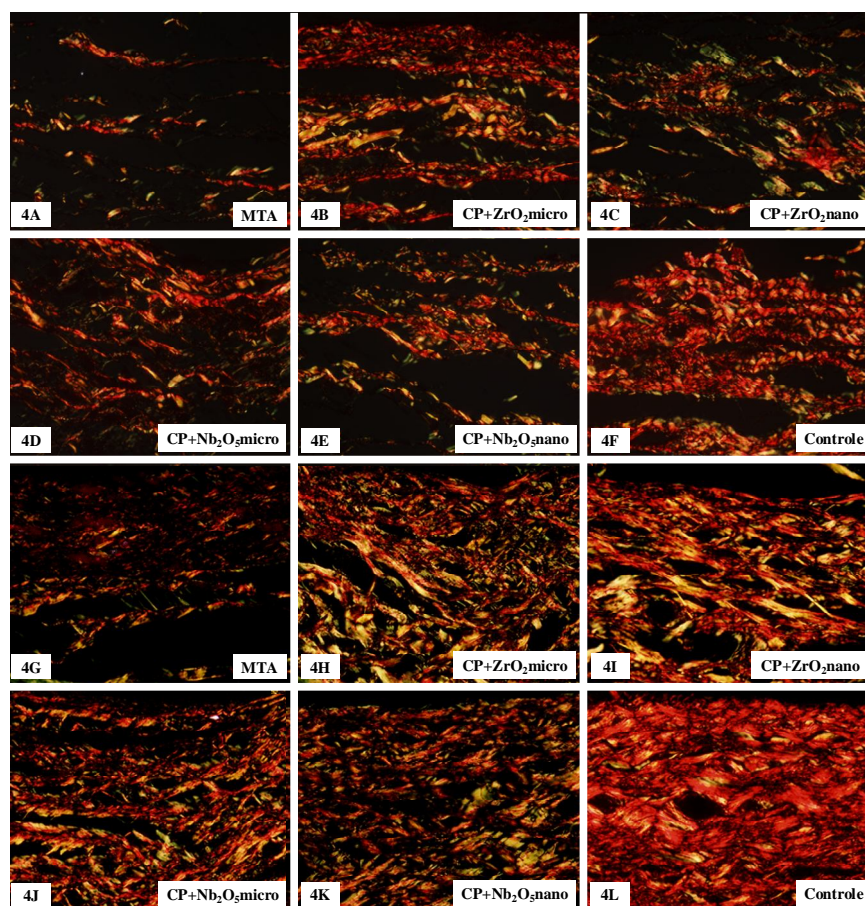


**Figuras 3** – Fotomicrografias mostrando porções de cápsulas adjacentes aos implantes no subcutâneo aos 7 dias (**Figs. 3A-3F**) e 60 dias (**Figs. 3G-3L**) submetidas a reação imuno-histoquímica para detecção de FGF-2. Aos 7 dias, inúmeras células imunomarcadas (em castanho) são observadas por toda cápsula. Aos 60 dias, raras são as células imunopositivas ao FGF-1 presentes no tecido conjuntivo. M, mastócitos; VS, vasos sanguíneos. 500x.



## ANÁLISE DO COLÁGENO BIRREFRINGENTE

Aos 7 dias, as cápsulas exibiram poucas e finas fibras de colágeno birrefringente (Figs. 4A-4F) enquanto que espessas fibras colágenas foram observadas aos 60 dias (Figs. 4G-4L). Em todos os períodos, a quantidade de colágeno birrefringente foi significativamente maior nas cápsulas dos grupos CP+ZrO<sub>2</sub> (micro e nano) e CP+Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (micro e nano) em comparação ao MTA (Tabela 2).



**Figure 4** – Fotomicrografias mostrando porções de cápsulas adjacentes aos implantes no subcutâneo após 7 dias (Figs. 4A-4F) e 60 dias (Figs. 4G-4L) coradas com Picosirius e analisadas utilizando um microscópio de luz polarizada. Um aumento evidente da quantidade de colágeno birrefringente (vermelho, amarelo e verde) é observado no tecido em contato com os implantes nos diferentes grupos após 60 dias em comparação ao período de 7 dias. 350x.

**Tabela 2** – Quantidade de colágeno birrefringente (Col), em porcentagem, e número de células imunomarcadas ao FGF-1 por  $\text{mm}^2$  na cápsula adjacente aos diferentes materiais e grupo controle

	MTA	CP+Zr <sub>2</sub> O micro	CP+Zr <sub>2</sub> O nano	CP+Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> micro	CP+Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub> nano	Controle
<b>7 days</b>						
FGF-1	411,1 (17,6) <sup>a,1</sup>	671,1 (18,1) <sup>b,1</sup>	635,5 (21,4) <sup>b,1</sup>	577,7 (20,1) <sup>c,1</sup>	535,5 (24,0) <sup>c,1</sup>	868,8 (44,5) <sup>d,1</sup>
Col	8,7 (0,8) <sup>a,1</sup>	10,3 (1,2) <sup>b,1</sup>	9,8 (0,9) <sup>b,1</sup>	9,9 (2,1) <sup>b,1</sup>	9,9 (1,3) <sup>b,1</sup>	13,1 (1,5) <sup>c,1</sup>
<b>15 days</b>						
FGF-1	222,2 (17,5) <sup>a,2</sup>	260,0 (6,7) <sup>b,2</sup>	266,6 (4,4) <sup>b,2</sup>	266,6 (9,2) <sup>b,2</sup>	286,6 (14,4) <sup>c,2</sup>	428,8 (25,5) <sup>d,2</sup>
Col	9,4 (0,2) <sup>a,1</sup>	10,2 (2,1) <sup>b,1</sup>	10,7 (1,4) <sup>b,1</sup>	10,1 (1,9) <sup>b,1</sup>	10,4 (1,6) <sup>b,1</sup>	14,1 (2,5) <sup>c,1</sup>
<b>30 days</b>						
FGF-1	97,7 (12,1) <sup>a,3</sup>	176,6 (7,8) <sup>b,3</sup>	177,7 (26,0) <sup>b,3</sup>	188,8 (19,0) <sup>b,3</sup>	103,3 (13,7) <sup>a,3</sup>	177,7 (12,3) <sup>b,3</sup>
Col	9,6 (2,5) <sup>a,1</sup>	11,2 (0,5) <sup>b,1</sup>	12,6 (2,7) <sup>b,1</sup>	10,2 (0,1) <sup>b,1</sup>	12,1 (0,8) <sup>b,2</sup>	17,7 (0,4) <sup>c,2</sup>
<b>60 days</b>						
FGF-1	62,2 (5,1) <sup>a,4</sup>	78,4 (1,8) <sup>b,4</sup>	77,7 (3,5) <sup>b,4</sup>	76,6 (1,6) <sup>b,4</sup>	73,3 (4,9) <sup>b,4</sup>	128,8 (16,8) <sup>c,4</sup>
Col	16,2 (1,2) <sup>a,2</sup>	23,3 (4,5) <sup>b,2</sup>	23,1 (1,9) <sup>b,2</sup>	23,7 (1,7) <sup>b,2</sup>	24,6 (5,4) <sup>b,3</sup>	34,6 (1,3) <sup>c,3</sup>

\*média (desvio padrão)

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

A comparação entre os períodos ( $p \leq 0,05$ ) está indicada por números nas colunas.

## 5. DISCUSSÃO

Atualmente, a adição de nanopartículas aos cimentos à base de silicato de cálcio vem sendo proposta, com o objetivo de melhorar as propriedades físicas, químicas, antimicrobianas e biológicas deste tipo de biomaterial. O desenvolvimento de novos materiais depende do estudo de seus efeitos nos tecidos. Injúrias locais prolongadas alteram o processo de reparo e podem afetar o tratamento; portanto, é importante avaliar a influência de diferentes radiopacificadores adicionados ao CP na reparação tecidual.

No presente estudo, óxido de zircônio e óxido de nióbio (micro ou nanoparticulado) foram utilizados como radiopacificadores em uma proporção de 30% de  $ZrO_2$  e  $Nb_2O_5$  e 70% de CP por massa. Já foi demonstrado que o CP com 20% de  $Zr_2O$  resultou em valores de radiopacidade maiores que 3 mm Al (Duarte et al., 2009), mínimo recomendado para materiais dentários. No entanto, a substituição de 30% de óxido de zircônio é necessária para aumentar a radiopacidade e resultar em adequadas propriedades físicas e químicas para um cimento retrobturador. (CUTTAJAR et al., 2011; CAMILLERI et al., 2011).

Nossos achados sugerem que todos os materiais permitem o reparo do tecido adjacente, uma vez que, foi verificada uma redução no número de células inflamatórias e um aumento no número de fibroblastos após 60 dias de implantação na cápsula. Esta hipótese é reforçada pela imunoexpressão de FGF-1, um fator de crescimento de fibroblasto, relacionado à produção de colágeno. Isto pode ser comprovado também pelo aumento gradativo e significativo da quantidade de colágeno birrefringente na cápsula adjacente aos diferentes materiais.

No presente estudo a associação de  $ZrO_2$  ou  $Nb_2O_5$  ao CP promoveu uma reação inflamatória moderada no tecido adjacente aos implantes. Já foi demonstrado que estes materiais apresentam um pH alcalino (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2015) o qual pode ser responsável pelo alto número de células inflamatórias observadas nas cápsulas aos 7 dias, uma vez que, o alto pH estimula o recrutamento de células inflamatórias e a produção de citocinas. (SHAHI et al., 2010). Além disso, o número de células imunomarcadas ao FGF-1 e da quantidade de colágeno birrefringente significativamente maior na cápsula adjacente aos materiais experimentais (CP+ $ZrO_2$  ou CP+ $Nb_2O_5$ ), em comparação ao MTA, evidenciam uma melhor resposta biológica. Assim, considerando que há diferenças nas médias dos diferentes parâmetros dos materiais avaliados, a resposta tecidual pode ser reflexo dos produtos liberados pelos materiais das citocinas e fatores de crescimento produzidos pelas células do hospedeiro. (SHAHI et al., 2010).

Embora, uma redução significativa no número de células inflamatórias, seguida pelo aumento de fibroblastos e, conseqüentemente, do colágeno birrefringente tenha sido observado nas cápsulas adjacentes aos implantes, é plausível afirmar que os materiais com óxido de zircônio ou óxido de nióbio induziram um reparo mais cedo em comparação ao MTA. Nossos dados claramente mostram que o número de células inflamatórias foi significativamente maior nas cápsulas adjacentes ao MTA em comparação aos demais grupos experimentais em todos os períodos.

## 6. CONCLUSÃO

Os materiais à base de silicato de cálcio (CP) associado ao óxido de zircônio e óxido de nióbio induzem a proliferação de fibroblastos e aceleram a regressão da reação inflamatória quando comparados ao MTA, indicando que o  $ZrO_2$  e o  $Nb_2O_5$  podem ser considerados como radiopacificadores alternativos ao óxido de bismuto. No entanto, a adição de radiopacificadores nanoparticulados ( $ZrO_2$  e  $Nb_2O_5$ ) não melhoraram as propriedades biológicas do cimento de silicato de cálcio quando comparados aos agentes microparticulados.

## 7. REFERÊNCIAS

ABDULLAH R, PITTFORD TR, PAPAIOANNOU S, NICHOLSON J, MCDONALD F. An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. **Biomaterials**, v. 23, n. 19, p. 4001-10. 2002.

American Dental Association. Specification No. 57 for endodontic filling materials. **Journal of American Dental Association**, v. 108, n. 1, p. 88. 1984.

AQRABAWI J. Sealing ability of amalgam, super EBA cement, and MTA when used as retrograde filling materials. **British Dental Journal**, v. 2000, n. 188, n. 5, p. 266-8. 2000.

BADR AE. Marginal adaptation and cytotoxicity of bone cement compared with amalgam and Mineral Trioxide Aggregate as root-end filling materials. **Journal of Endodontics**, 2012; v. 36, n. 6, p. 1056-60. 2012.

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.

BARKHORDAR RA, HUSSAIN MZ, HAYASHI C. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. **Endodontic Dental Traumatology**, v.15, n. 1, p. 26-7. 1999.

BARRIENTOS S, STOJADINOVIC O, GOLINKO MS, BREM H, TOMIC-CANIC M. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regeneration**, v. 16, n. 5, p. 585-601. 2008.

BENTZ DP, GARBOCZI EJ, HAECKER CJ, JENSEN OM. Effects of cement particle size distribution on performance properties of Portland cement-based materials. **Cement and Concrete Research**, v. 29, n. 10, p. 1663-71. 1999.

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.

BORTOLUZZI EA, BROON NJ, BRAMANTE CM, GARCIA RB, DE MORAES IG, BERNARDINELI N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 9, p. 897-900. 2006.

BROADLEY KN, AQUINO AM, HICKS B, et al. Growth factors bFGF and TGF- $\beta$  accelerate the rate of wound repair in normal and in diabetic rats. **International Journal of Tissue Reaction**, v. 10, n. 6, p. 345–53. 1998.

BURGESS WH, MACIAG T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 575– 606. 1989.

CAMILLERI J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 6, p. 462-70. 2007.

CAMILLERI J. The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. **International Endodontic Journal**, v. 41, n. 2, p. 151-7. 2008.

CAMILLERI J. Evaluation of the physical properties of an endodontic Portland cement incorporating alternative radiopacifiers used as root-end filling material. **International Endodontic Journal**, v. 43, n. 3, p. 231-40. 2010.

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.

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.

DIETSCHI D, DUC O, KREJCI I, SADAN A. Biomechanical considerations for the restoration of endodontically treated teeth: a systematic review of the literature-Part 1. Composition and micro- and macrostructure alterations. **Quintessence International**, v. 38, n. 9, p. 733-43. 2007.

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.

FINKLESTEIN SP, APOSTOLIDES PJ, CADAY CG, et al. Increased basic fibroblast growth factor (bFGF) immunoreactivity at the site of focal brain wounds. *Brain Research*, v. 460, n. 2, p. 253–9. 1988.

FONSECA TS. Resposta tecidual induzida por Biodentine™ e MTA Branco em subcutâneo de ratos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

FOUAD AF, ACOSTA AW. Periapical lesion progression and cytokine expression in an LPS hyporesponsive model. **International Endodontic Journal**, v. 34, n. 7, p. 506-13. 2001.

FRANK LA, GLICK DH, PATTERSON SS, WEINE FS. Long term evaluation of surgically placed amalgam fillings. **Journal of Endodontics**, v. 18, n. 8, p. 391-8. 1992.

GARCIA LDA F, HUCK C, MENEZES DE OLIVEIRA L, DE SOUZA PP, DE SOUZA COSTA CA. Biocompatibility of new calcium aluminate cement: tissue reaction and expression of inflammatory mediators and cytokines. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 12, p. 2024-9. 2014.

GERHARDS F, WAGNER W. Sealing ability of five different retrograde filling materials. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 9, p. 463-6. 1996.

GOMES-FILHO JE, WATANABE S, GOMES AC, FARIA MD, LODI CS, PENHA OLIVEIRA SH. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 11, p. 1577-9. 2009.

GOMES CORNELIO AL, SALLES LP, 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, n. 2, p. 203-10. 2011.

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.

HOLLAND R, SOUZA V, NERY MJ, FARACO JÚNIOR IM, BERNABÉ PFE, OTOBONI FILHO JA et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. **Brazilian Dental Journal**, v. 13, n. 1, p. 23-6. 2002.

HRABAK A, BAJOR T, CSUKA I. The effect of various inflammatory agents on the phagocytosis and cytokine profile of mouse and rat macrophages. **Inflammation Research**, v. 57, n. 2, p. 75–83. 2008.

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

JOKINEN M, PÄTSI M, RAHIALA H, PELTOLA T, RITALA M, ROSENHOLM JB. Influence of sol and surface properties on in vitro bioactivity of sol-gel-derived TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> films deposited by dip-coating method. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 42, n. 2, p. 295-302. 1998.

JUNQUEIRA LC, BIGNOLAS G, BRENTANI RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 11, n. 4, p. 447-55. 1979.

JUNQUEIRA LC, MONTES GS, SANCHEZ EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, v. 74, n. 1, p. 153-6. 1982.

KIM EC, LEE BC, CHANG HS, LEE W, HONG CU, MIN KS. Evaluation of the radiopacity and cytotoxicity of Portland cements containing bismuth oxide. **Journal of Endodontics**, v. 105, n. 1, p. e54-e57. 2008.

KOGAN P, HE J, GLICKMAN GN, WATANABE I. The effects of various additives on setting properties of MTA. **Journal of Endodontics**, v.32, n. 6, p. 569-72. 2006.

KOH ET, MCDONALD F, PITT FORD TR, TORABINEJAD M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 8, p. 543-7. 1998.

KOMABAYASHI T, SPANGBERG L. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and portland cement: a study with a flow particle image analyzer. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 1, p. 94-8. 2008.

LAZAROU SA, EFRON JE, SHAW T, WASSERKRUG HL, BARBUL A. Fibroblast growth factor inhibits wound collagen synthesis. **Surgical forum**, v. 40, p. 627-9. 1989.

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

MANNI ML, CZAJKA CA, OURY TD, GILBERT TW. Extracellular matrix powder protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Tissue Engineering Part A**, v. 17, n. 21-22, p. 2795-804. 2011.

MASSI S, TANOMARU-FILHO M, SILVA GF, DUARTE MAH, GRIZZO LT, BUZALAF MAR et al. pH, calcium ion release and setting time of an experimental mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 6, p. 844-6. 2011.

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.

MIN KS, CHANG HS, BAE JM, PARK SH, HONG CU, KIM EC. The induction of heme oxygenase-1 modulates bismuth oxide-induced cytotoxicity in human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 11, p. 1342-6. 2007.

MOLDAUER I, VELEZ I, KUTTLER S. UPREGULATION of basic fibroblast growth factor in human periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 5, p. 408–411. 2006.

MULLANE EM, DONG Z, SEDGLEY CM, HU JCC, BOTERO TM, HOLLAND GR, NÖR JE. Effects of VEGF and FGF2 on the revascularization of severed human dental pulps. *Journal of Dental Research*, v. 87, n. 12, p. 1144-8. 2008.

NIBALI L, FEDELE S, D'AIUTO F, DONOS N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. **Oral Disease**, v. 18, n. 3, p. 236-46. 2012.

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. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 27, n. 3, p. 671-6. 2012.

OCHSENBEIN A, CHAI F, WINTER S, TRAISNEL M, BREME J, HILDEBRAND HF. Osteoblast responses to different oxide coatings produced by the sol–gel process on titanium substrates. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 5, p. 1506–17. 2008.

PRESTA M, DELL'ERA P, MITOLA S, MORONI E, RONCA R, RUSNATI M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. **Citokyne Growth Factor Ver**, v. 16, n. 2, p. 159-78. 2005.

RIBEIRO DA, CARLIN V, FRACASSOLI ACC, OYAMA LM. Radiopacifiers do not induce genetic damage in murine fibroblasts: an in vitro study. **International Endodontic Journal**, v. 42, n. 11, p. 987-91. 2009.

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.

RICH L, WHITTAKER P. Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Journal of Morphological Science**, v. 22, n. 2, p. 97-104. 2005.

SAGHIRI MA, ASGAR K, LOFTI M, GARCIA-GODOY F. Nanomodification of mineral trioxide aggregate for enhanced physicochemical properties. **International Endodontic Journal**, v. 45, n. 11, p. 979-88. 2012.

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.

SASAKI T. The effects of basic fibroblast growth factor and doxorubicin on cultured human skin fibroblasts: relevance to wound healing. **The Journal of Dermatology**, v. 19, p. 664-6. 1992.

SCHEMBRI M, PELOW 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.

SCHRODER AK, VON DER OHE M, KOLLING U, ALSTAEDT J, UCIECHOWSKI P, FLEISCHER D et al. Polymorphonuclear leucocytes selectively produce anti-inflammatory

interleukin-1 receptor antagonist and chemokines, but fail to produce pro-inflammatory mediators. **Immunology**, v. 119, n. 3, p. 317–27. 2006.

SHAHI S, RAHIMI S, YAVARI HR, MOKHTARI H, ROSHANGAR L, ABASI MM et al. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 5, p. 899-903. 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. , v. 19, p. 2015-25. 2015.

SILVA MJB, VIEIRA LQ, SOBRINHO APR. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 105, n. 5, p. e70-e76. 2008.

SIQUEIRA JF JR, ROÇAS IN, ABAD EC, CASTRO AJ, GABYVA SMM, FAVIERI A. Ability of three root end filling materials to prevent bacterial leakage. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 11, p. 673-5. 2001.

TANOMARU-FILHO M, LUIS MR, LEONARDO MR, TANOMARU JMG, SILVA LAB. Evaluation of periapical repair following retrograde filling with different root-end filling



materials in dog teeth with periapical lesions. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 102, n. 1, p. 127-32. 2006.

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. Root end filling materials: a review. *Endodontic Dental Traumatology*, v. 12, n. 4, p. 161-178. 1996.

TORABINEJAD M, WATSON TF, PITT FORD TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. **Journal of Endodontics**, v. 19, n. 12, p. 591–5. 1993.

TORABINEJAD M, SMITH PW, KETTERING JD, PITT FORD TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. **Journal of Endodontics**, v. 21, n. 6, p. 295-9. 1995.

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.

VELTEN D, EISENBARTH E, SCHANNE N, BREME J. Biocompatible Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> thin films prepared by means of the sol-gel process. **Journal Material Science Material Medicine**, v. 15, n. 4, p. 457-61. 2004.

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, 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.

VOSOUGHOSSEINI S, LOTFI M, SHAHI S, BALOO H, MESGARIABBASI M, ALI SAGHIRI M et al. Influence of White versus Gray Mineral Trioxide Aggregate on Inflammatory Cells. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 6, p. 715-7. 2008.

WAHL SM, WONG H, MCCARTNEY-FRANCIS N. Role of growth factors in inflammation and repair. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 193-9. 1989.

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

ZAKRZEWSKA M, MARCINKOWSKA E, WIEDLOCHA A. FGF-1: From biology through engineering to potential medical applications. **Critical Review Clinical Laboratory Science**, v. 45, n. 1, p. 91-135. 2008.