

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA

LETICIA BOLDRIN MESTIERI

**CIMENTOS A BASE DE RESINA METACRILATO
ASSOCIADO AO FOSFATO DE CÁLCIO:
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

PORTO ALEGRE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

LETICIA BOLDRIN MESTIERI

**CIMENTOS A BASE DE RESINA METACRILATO ASSOCIADO AO FOSFATO
DE CÁLCIO: PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

PORTO ALEGRE

2017

LETICIA BOLDRIN MESTIERI

**CIMENTOS A BASE DE RESINA METACRILATO ASSOCIADO AO FOSFATO
DE CÁLCIO: PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Odontologia – Área de concentração
Clínica Odontológica/Endodontia.

Linha de pesquisa: Biomateriais e técnicas terapêuticas em Odontologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabiana Soares Grecca

PORTO ALEGRE

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Mestieri, Leticia Boldrin
Cimentos a base de resina metacrilato associado
ao fosfato de cálcio: propriedades biológicas /
Leticia Boldrin Mestieri. -- 2017.
71 f.
Orientador: Fabiana Soares Grecca.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2017.

1. alfa-tricálcio fosfato. 2. bioatividade. 3.
biocompatibilidade. 4. citotoxicidade. 5.
hidroxiapatita. I. Grecca, Fabiana Soares, orient.
II. Título.

LETICIA BOLDRIN MESTIERI

**CIMENTOS A BASE DE RESINA METACRILATO ASSOCIADO AO FOSFATO
DE CÁLCIO: PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Odontologia – Área de concentração
Clínica Odontológica/Endodontia.

Aprovada em 14 de Novembro de 2017.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Fabiana Soares Grecca (orientadora)

Prof.^a Dr.^a Manoela Domingues Martins (UFRGS)

Prof. Dr. Mário Tanomaru-Filho (UNESP)

Prof.^a Dr.^a Fernanda Geraldo Pappen (UFPeI)

Prof. Dr. Fernando Branco Barletta (ULBRA) (suplente)

PORTO ALEGRE

2017

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me permitir realizar o sonho de ser Doutora e guiar meus passos nessa caminhada.

À **minha família**: sem vocês essa conquista não seria possível! Obrigada por insistirem quando eu pensei em desistir, por comemorarem comigo a cada conquista e por me confortarem nas tantas vezes que cai nessa jornada.

Ao meu pai **Devanir Mestieri**, agradeço por ser a referência para que eu seguisse nessa linda profissão que é a Odontologia, e por me aconselhar para que eu pudesse sempre dar o melhor de mim ao outro.

À minha mãe **Rosa Maria Boldrin Mestieri**, pelo esforço imensurável para se manter firme nas tantas vezes que me desesperei sozinha em Porto Alegre, por sempre me incentivar a seguir na carreira acadêmica que tanto admiro, e por me fazer sentir a pessoa mais especial do mundo todos os dias da minha vida.

À minha irmã **Larisa Boldrin Mestieri**, pelos tantos conselhos e puxões de orelha que me ajudaram a crescer nessa etapa! Obrigada por ser minha melhor amiga e por se fazer presente mesmo com a distância. Você é minha metade, e juntas sempre seremos uma máfia!

Ao meu noivo **Ricardo Pacheco**, por me acompanhar nessa jornada com todo carinho e paciência do mundo! Por estar sempre disposto a ouvir sobre cultura de células e tratamento endodôntico, por tentar sempre me ajudar – até mesmo quando nem sabia como, pelos conselhos e cuidado toda vez que fraquejei e por tornar minha vida em Porto Alegre muito mais leve e feliz, junto com nosso filho Tutu.

À família do meu noivo: meu sogro **Carlos Alberto Pacheco**, minha sogra **Gislane de Bem**, meus cunhados **Rodrigo Pacheco**, **Brunna Jaeger**, **Roger Jaeger**, **Flávio Pacheco** e **Lucas Pacheco**: obrigada por serem minha família no Rio Grande do Sul! Por fazerem cada momento juntos especial e por permitirem que eu me sentisse em um lar, mesmo longe de Araraquara.

À minha orientadora, **Prof.^a Dr.^a Fabiana Soares Grecca**, primeiramente por ter me aceitado como orientada, apesar do desafio de trabalhar com uma linha de pesquisa diferente. Agradeço por tudo que aprendi contigo, que foi muito mais do que Endodontia e pesquisa, mas também sobre como ser uma pessoa melhor e uma aluna mais dedicada. Também agradeço pela oportunidade de poder participar de projetos paralelos que me permitiram evoluir na carreira acadêmica, pelas cobranças que me tornaram uma profissional mais competente e pelas broncas que auxiliaram no meu amadurecimento durante este período.

Às amigas **Ivana Maria Zaccara Cunha de Araújo** e **Pauline Mastella Lang**. Agradeço a **Ivana** por ser minha companheira de laboratório, baladas e viagens; por todos os conselhos, por ter me ensinado muito sobre as células que tanto amamos, pelo ombro amigo e pela companhia sempre. À **Pauline**, por ser minha psicóloga de plantão, por me ajudar em situações que eu não soube conduzir, por ser um exemplo de profissional para mim e pelos ótimos momentos juntas! Gurias, agradeço por tornarem essa caminhada mais leve e proveitosa, vocês são presentes que a UFRGS me deu!

À amiga **Daiana Böttcher**, pelos conselhos, ensinamentos e bons momentos juntas em viagens, bares, baladas ou em casa jogando conversa fora. Agradeço muito pela oportunidade de participar do Programa de Extensão e Gestão de Atividades de Formação Continuada (PEGA) da PUCRS, que me permitiu a primeira experiência como professora.

Aos professores do Laboratório de Materiais Dentários (LAMAD): **Prof. Dr. Fabrício Mezzomo Collares** e **Prof. Dr. Vicente Castelo-Branco Leitune**, pela grande colaboração neste trabalho, por sempre estarem dispostos a me auxiliar e ensinar e por me permitirem participar de outros projetos desenvolvidos no LAMAD.

À **Prof.^a Dr.^a Fernanda Visioli**, por sempre solucionar todas as minhas dúvidas, por me ajudar a desenvolver as metodologias propostas no estudo, pelas nossas conversas que me ajudaram muito no Doutorado, pela oportunidade que me deu de participar do Encontro Brasil-Michigan, em Ann Arbor, que me permitiu conhecer pesquisadores da área que tenho grande admiração.

Aos professores da disciplina de Endodontia da UFRGS: **Prof. Dr. Regis Burmeister dos Santos, Prof. Dr. João Ferline, Prof. Dr. Francisco Montagner, Prof.^a Dr.^a Patrícia Kopper, Prof.^a Dr.^a Roberta Kochenborger Scarparo, Prof. Dr. Marcus Vínicus Reis Só, Prof. Dr. Tiago André Fontoura de Mello, Prof. Dr. Ricardo Abreu da Rosa, Prof.^a Dr.^a Simone Bonato Luisi**; agradeço pelo convívio diário, pelos ensinamentos e bons momentos que me proporcionaram enquanto eu estava na UFRGS.

Aos Professores do Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia (NPBO) da UFRGS: **Prof. Dr. Manoel Sant’Ana Filho, Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados, Prof. Dr. Vinicius Coelho Carrard, Prof.^a Dr.^a Manoela Domingues Martins, Prof.^a Dr.^a Márcia Gaiger Oliveira, Prof. Dr. Marco Antonio Trevizani Martins, Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers e Prof.^a Dr.^a Fernanda Visioli**, que permitiram que eu utilizasse as dependências dos laboratórios para a realização dos experimentos do trabalho, por me auxiliarem sempre que precisei, pelo bom convívio e pelas amizades que surgiram dessa parceria.

Ao **Instituto de Ciências Básicas em Saúde (ICBS)**, no qual realizei parte dos experimentos do trabalho, especialmente ao técnico em Anatomia **Toninho**, sempre simpático e solícito para me ajudar.

Aos colegas de pós-graduação do Laboratório de Endodontia (LABENDO): **Júlia Iglesias, Paula Barcellos da Silva, Ludmila Coutinho Moraes, Carolina Bender Hoppe, Karen Barea de Paula, Débora Delai da Costa, Ramiro Quintana, Alexander Jardine, Lucas Pinheiro, Otávio Sposito, Ângela Longo, Gabriela Ferraz Blattes, Flávia Baldasso, Daiana Boijink, Felipe Barros Matoso, Camila Grock**, pelos bons momentos e pelo convívio.

Às alunas de graduação com que tive a oportunidade de trabalhar: **Roberta Mendes, Marina Aspesi e Caroline Martins**. Obrigada pelo carinho que sempre tiveram comigo e por me mostrarem como é gratificante ensinar ao outro! Agradeço pela confiança que depositaram em mim para a realização dos trabalhos de vocês e por serem alunas dedicadas que sempre estavam dispostas a aprender mais sobre o “maravilhoso mundo das células”. Acreditem: aprendi muito mais com vocês do que vocês comigo.

Às alunas de mestrado **Marla Cuppini** e **Adriana Knorr**; e alunos de doutorado **Lucas Pinheiro** e **Otávio Sposito**: obrigada pela confiança para a realização dos experimentos das dissertações e teses, pelo carinho e pelos bons momentos juntos no laboratório.

Às grandes amigas que fiz em Araraquara: **Ana Livia Gomes Cornélio**, **Elisandra Rodrigues** e **Loise Salles**, minhas **Marietes**, que mesmo longe se fizeram presente e me ajudaram nas dificuldades que enfrentei. E também as amigas **Camila Espir**, **Raquel Viapiana** e **Camila Nascimento**, pelas boas conversas na hora que a saudades apertava.

À **Faculdade de Odontologia da UFRGS**, na qual eu tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas que se tornaram um exemplo para mim, e por permitir que eu realizasse meu sonho nesta instituição.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, por fornecer suporte financeiro durante o período de doutorado.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará a seu tamanho original"

- Albert Einstein

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades biológicas de cimentos experimentais a base de resina metacrilato contendo α -tricálcio fosfato (α -TCP) ou hidroxiapatita nanoparticulada (HAp) *in vitro* e *in vivo*. Para isto, os cimentos experimentais foram avaliados e comparados com AH Plus (AHP). Na etapa *in vitro*, os materiais foram mantidos em contato com meio de cultura por 24 horas, coletados e avaliados na concentração de 10%. Células-tronco da papila apical humana (SCAPs) foram submetidas aos ensaios de viabilidade brometo de 3-(4,5-dimetiltiazólio)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) e sulfurodamina B (SRB) no período de 24 horas; e a bioatividade foi avaliada pela atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) e deposição de nódulos mineralizados pelo corante vermelho de Alizarina (AR), nos períodos de 1, 5, 10 e 15 dias. Na etapa *in vivo*, os materiais foram inseridos em tubos de polietileno e colocados no tecido subcutâneo de ratos para avaliação da reação inflamatória, sendo utilizado um tubo vazio como controle e avaliados os períodos de 7, 30 e 90 dias; para avaliação da deposição óssea, os cimentos α -TCP e AHP foram inseridos em cavidades confeccionadas no fêmur de ratos, sendo utilizada uma cavidade vazia como controle e avaliados os períodos de 30 e 90 dias. Para o ensaio de viabilidade e ensaios *in vivo*, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn; para avaliação da bioatividade *in vitro* foram utilizados os testes ANOVA e *post hoc* de Tukey ($P < 0.05$). HAp e AHP não apresentaram diferenças estatísticas entre si em ambos os ensaios de citotoxicidade ($P > 0,05$) e o α -TCP apresentou menor resultado de viabilidade no teste MTT, sendo estatisticamente diferente dos outros ($P < 0,05$). Os ensaios de bioatividade demonstraram aumento na atividade da ALP em todos os grupos ($P < 0.05$). Observou-se semelhança entre os grupos no primeiro período ($P > 0.05$), AHP apresentou menores valores em 5 dias ($P < 0.05$), α -TCP apresentou os maiores valores em 10 dias ($P < 0.05$), e em 15 dias este cimento foi superior ao AHP ($P < 0.05$). AR mostrou aumento na quantidade de depósitos mineralizados após 5 dias ($P < 0.05$). Não houve diferença entre os grupos em 1 dia ($P > 0.05$), α -TCP, HAp e controle foram semelhantes aos 5 dias ($P > 0.05$), e em 10 e 15 dias, α -TCP apresentou os maiores valores, sendo diferente dos outros cimentos ($P > 0.05$). Na avaliação da resposta inflamatória *in vivo*, observou-se diminuição da inflamação e aumento de fibras colágenas em todos os grupos. Em 7 dias, α -TCP e HAp mostraram resultados semelhantes ao controle CT ($P > 0.05$) e diferentes do AHP ($P < 0.05$), que foi o único grupo a apresentar células-gigantes neste período. Na avaliação da deposição óssea, houve aumento na deposição de 30 para 90 dias nos grupos α -TCP e controle ($P < 0.05$), e estes grupos apresentaram resultados semelhantes em 90 dias ($P > 0.05$), diferindo do AHP ($P < 0.05$). Conclui-se que a associação de fosfatos de cálcio à resina metacrilato apresentou bons resultados de biocompatibilidade e bioatividade *in vitro* e *in vivo*, apresentando potencial para serem utilizados como cimentos obturadores na prática clínica.

Palavras-chave: α -tricálcio fosfato, bioatividade, biocompatibilidade, cimento obturador endodôntico, citotoxicidade, hidroxiapatita nanoparticulada.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the biological properties of experimental sealers containing α -tricalcium phosphate (α -TCP) or nanoparticulate hydroxyapatite (HAp) in a methacrylate resin-base *in vitro* and *in vivo*. For this, the experimental sealers were evaluated and compared with AH Plus (AHP). At the *in vitro* assays, the materials were kept in contact with culture medium for 24 hours, collected and evaluated at concentrations of 100% and 10%. Stem cells from human apical papilla (SCAPs) were submitted to 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and sulfurodamine B (SRB) viability assays for 24 hour; and bioactivity was evaluated by alkaline phosphatase enzyme activity (ALP) and deposition of mineralized nodules by Alizarin Red staining (AR), for 1, 5, 10 and 15 days. At *in vivo* assays, the materials were inserted in polyethylene tubes and placed in subcutaneous tissue of rats to evaluate the inflammatory reaction, using an empty tube as control and evaluating the periods of 7, 30 and 90 days; to evaluate bone deposition, α -TCP and AHP cements were inserted into cavities made in the femur of rats, using an empty cavity as control and evaluating the periods of 30 and 90 days. For viability and *in vivo* assays, Kruskal-Wallis and Dunn's *post hoc* tests were used; for bioactivity, ANOVA and Tukey's *post hoc* tests were used ($P < 0.05$). HAp and AHP did not presented statistical differences from each other in both citotoxicity assays ($P > 0.05$), and α -TCP presented a lower viability result in MTT assay, being statistically different from the other sealers ($P < 0.05$). The bioactivity assays showed an increase in ALP activity for all groups ($P < 0.05$). Similar results were found between the groups at the first period ($P > 0.05$), AHP had the lowest values at 5 days ($P < 0.05$), α -TCP presented the highest values at 10 days ($P < 0.05$), and at 15 days, this sealer's values were higher than AHP ($P < 0.05$). AR showed an increase in the amount of mineralized deposits after 5 days for all sealers ($P < 0.05$). No difference between groups were found at 1 day ($P > 0.05$), α -TCP, HAp and control were similar at 5 days ($P > 0.05$), and at 10 and 15 days, α -TCP presented the highest values, being different of the other sealers ($P > 0.05$). Regarding the evaluation of the inflammatory response *in vivo*, there was a decrease in inflammation and increase of collagen fibers in all groups. At 7 days, α -TCP and HAp showed similar results to the control ($P > 0.05$) and different from AHP ($P < 0.05$), which was the only group to present giant cells in this period. In the evaluation of bone deposition, there was an increase in deposition from 30 to 90 days for α -TCP and control groups ($P < 0.05$), and these groups presented similar results in 90 days ($P > 0.05$), differing from the AHP ($P < 0.05$). It was concluded that the association of calcium phosphates and methacrylate resin showed good biocompatibility and bioactivity results *in vitro* and *in vivo*, presenting potential to be used as endodontic sealers in clinical practice.

Keywords: α -tricalcium phosphate, bioactivity, biocompatibility, cytotoxicity, nanoparticulated hydroxyapatite, root canal sealer.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS.....	20
ARTIGO 1	21
ARTIGO 2	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXOS	66

INTRODUÇÃO

O preenchimento do sistema de canais radiculares (SCR) com materiais obturadores visa o selamento tridimensional do mesmo. Para isto, são utilizados materiais de corpo, como a guta-percha (ASGARY et al., 2006), associados a cimentos obturadores endodônticos, com o intuito de melhorar o selamento. O cimento obturador deve ser atóxico, bacteriostático, dimensionalmente estável, prover selamento lateral e apical, resistir à umidade, ser radiopaco, passível de remoção, biocompatível (FOROUGH REYHANI et al., 2014). Se possível, o cimento deve ser passível de interagir com os tecidos dentários, caracterizando a bioatividade (PRATI, GANDOLFI, 2015). Até o momento, nenhum cimento disponível no mercado é capaz de contemplar todas as propriedades descritas. Visto isso, novos cimentos têm sido desenvolvidos, principalmente no intuito de avaliar a biocompatibilidade e bioatividade.

Novos materiais a base de silicato de cálcio e fosfato de cálcio, denominados cimentos biocerâmicos (CAMILLERI, 2017), começaram a ser utilizados na prática endodôntica com o desenvolvimento do Agregado Trióxido Mineral (MTA), material a base de cimento Portland associado ao radiopacificador óxido de bismuto, por Torabinejad (1993). O MTA destacou-se na Endodontia pelas suas excelentes propriedades, tais como ação antimicrobiana, expansão pós-presa, elevado pH, resistência a longo prazo, radiopacidade, baixa infiltração, adaptação marginal e biocompatibilidade (TORABINEJAD, PARIROKH, 2010; PARIROKH, TORABINEJAD, 2010).

Além disso, cimentos a base de silicato de cálcio, ou “MTA-based” apresentam propriedade hidráulica, permitindo a reação de presa na presença de sangue e demais fluidos biológicos, bem como o bom selamento devido a expansão do mesmo; formam hidróxido de cálcio durante a sua reação de hidratação que por sua vez, é capaz de interagir com as células do tecido resultando na formação de cristais de hidroxiapatita e carbonatoapatita, caracterizando sua bioatividade (GANDOLFI et al., 2015). A associação do silicato de cálcio a compostos de fosfato de cálcio aumenta a capacidade de formação de cristais de apatita nestes cimentos, criando um ambiente favorável para a

diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas e promovendo a regeneração tecidual (GANDOLFI et al., 2011).

O fosfato de cálcio é um biomaterial que tem sido amplamente utilizado na área da saúde, devido ao seu potencial biocompatível e de osteocondução/osteoindução (SUN, YANG, 2015); além disso, estudos avaliando cimentos endodônticos experimentais a base deste composto demonstraram boas respostas teciduais em modelos animais (JACOB et al., 2014). Dentre os fosfatos de cálcio que vêm sendo pesquisados, podemos citar o α -fosfato tricálcico e a hidroxiapatita. O primeiro apresenta elevada taxa de biodegradação por hidrólise e dissolução progressiva com formação de cristais de apatita, o que contribui para seu elevado potencial bioativo (GANDOLFI et al., 2010); e o último apresenta grande estabilidade e pouca solubilidade, sendo utilizado como carga para resinas compostas (DOMINGO et al., 2003) e sistemas adesivos (LEITUNE et al., 2013).

Quando utilizados como cimento obturador endodôntico, os fosfatos de cálcio demonstram boas propriedades físico-químicas (JOHNS et al., 2010) e biocompatibilidade *in vivo* (HONG et al., 1991). Ogata et al. (2012), avaliando um cimento endodôntico experimental contendo fosfato de cálcio em células osteoblásticas de ratos, observaram proliferação celular, atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP) e formação de nódulos mineralizados na cultura de células semelhante ao MTA, além de boas características de manuseio do material, sugerindo seu uso como cimento endodôntico. A bioatividade observada por estes autores também foi relatada no estudo de Shon et al. (2012), que também observaram a expressão de genes associados à osteogênese neste material.

Em relação à resposta tecidual promovida por cimentos endodônticos contendo fosfatos de cálcio, Jacob et al. (2014) observaram, em dentes de porcos, maior aceitabilidade dos tecidos periapicais quando comparado ao cimento AH Plus, observando a presença de infiltrado inflamatório leve na região periapical 30 dias após a intervenção. Na avaliação após 3 meses do procedimento, os autores relatam reparo dos tecidos periapicais para o cimento

experimental, com a absorção do mesmo pelo organismo do animal; o que não ocorreu para o cimento AH Plus.

Como indicações dos cimentos biocerâmicos, destacam-se os tratamentos conservadores da polpa, capeamento direto e pulpotomia, selamentos de perfurações, obturação retrógrada, reabsorções inflamatórias, barreira apical para induzir apicificação e obturação do SCR (PARIROKH, TORABINEJAD, 2010). Em estudo avaliando a biocompatibilidade em dentes de cães obturados com MTA, utilizando como veículo para este cimento água destilada ou propilenoglicol, Holland et al. (2007) observaram normalidade do tecido periapical após 90 dias da inserção do material, sem diferença estatística significativa para os diferentes veículos utilizados, relatando apenas maior facilidade na inserção do cimento quando manipulado com propilenoglicol.

Por apresentar dificuldade de inserção, elevado tempo de presa quando utilizado como cimento obturador e remoção dificultada (BOGEN, KUTTLER, 2009), tornou-se necessária a associação de outros componentes ao MTA, visando otimizar suas propriedades. Além disso, sabe-se que a interação do óxido de bismuto com o colágeno presente no tecido dentário pode promover pigmentação dentária, principalmente quando em contato com hipoclorito de sódio (CAMILLERI 2014). Visto isso, a procura por novos agentes radiopacificadores, que auxiliem na melhoria das demais propriedades desses cimentos, também vem sendo estudada. A utilização de óxido de tântalo no Neo MTA Plus (Avalon Biomed Inc, Bradenton, FL) e óxido de zircônio no Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, France) é alternativa que não promove a pigmentação dentária, não interfere na hidratação dos materiais e produz radiopacidade adequada quando comparada a promovida pelo óxido de bismuto no MTA (CAMILLERI, 2015).

A associação do MTA a resina salicilato, como proposto no MTA Fillapex (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil) diminuiu o tempo de presa e a solubilidade do material, facilitando também sua manipulação. Quando suas propriedades físicas foram avaliadas e comparadas às do cimento AH Plus (Dentsply, York, PA, USA), que também apresenta base de resina, Vitti e colaboradores (2013) observaram valores de escoamento, tempo

de trabalho, absorção de água, presa inicial e presa final de acordo com os recomendados pela norma ISO 6876:2001 para ambos os cimentos, demonstrando que o MTA Fillapex apresenta características físicas adequadas para ser utilizado como cimento obturador endodôntico.

Em relação as propriedades biológicas do mesmo, Bin et al. (2012) demonstraram citotoxicidade para o MTA Fillapex quando comparado ao MTA (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A) e AH Plus em cultura de fibroblastos de ratos, após 24 horas em contato das células com os materiais em diferentes concentrações. Entretanto, a viabilidade das células em contato com esse material aumenta ao longo dos dias, além de apresentar potencial bioativo, sendo capaz de estimular a deposição de cristais de apatita em cultura de células osteoblásticas humanas (SALLES et al., 2012).

Quando avaliado em tecido conjuntivo de ratos, o MTA Fillapex apresentou reação inflamatória severa 90 dias após a inserção do material no tecido, com presença de infiltrado inflamatório mononuclear, macrófagos e células gigantes contendo partículas do material no seu citoplasma (ZMENER et al., 2012). Em tecido ósseo, esse cimento demonstrou toxicidade no período inicial (7 dias), ocorrendo deposição de tecido mineralizado após 90 dias da inserção do material em cavidade óssea no fêmur de ratos (ASSMANN et al., 2015). Esse resultado pode estar associado a liberação de íons cálcio e hidroxila durante a reação de hidratação do MTA Fillapex, que aumenta o pH e induz a atividade da enzima fosfatase alcalina nas células, associada ao processo de mineralização tecidual (YALTIRIK et al., 2004).

Outros cimentos a base de resina salicilato contendo componentes biocerâmicos foram desenvolvidos almejando boas propriedades físico-químicas e biológicas. Portella et al. (2014) desenvolveram um cimento experimental a base de resina salicilato, glicerol, hidróxido de cálcio e 5% de cimento Portland, demonstrando que a adição de glicerol em uma resina salicilato pode melhorar as propriedades físico-químicas da mesma, além de ser passível de promover bioatividade devido as boas propriedades biológicas de ambos, associada à propriedade antiinflamatória da resina salicilato. Além disso, a associação deste cimento ao fosfato de cálcio visa o desenvolvimento de um cimento bioativo,

capaz de estimular a deposição de tecido mineralizado na região periapical (PORTELLA et al., 2015).

Cimentos a base de resinas epóxi como o AH Plus (Dentsply, York, PA, USA) são comumente utilizados na obturação do SCR devido as suas boas propriedades físico-químicas e biológicas (LEYHAUSEN et al., 1999). Quando sua biocompatibilidade foi avaliada em cultura de fibroblastos e comparada com um cimento à base de óxido de zinco e eugenol (Pulp Canal Sealer, Kerr Corporation, Orange, CA, USA), Azar et al. (2000) observaram ação citotóxica do Pulp Canal Sealer após uma hora da exposição das células ao cimento, permanecendo ao longo de todo o período experimental (5 semanas). Para o AH Plus, os autores observaram citotoxicidade apenas em períodos iniciais, que perduraram por no máximo uma semana após a exposição. Avaliando a resposta biológica dos mesmos materiais em dentes de cães, Leonardo et al. (1999) observou normalidade do tecido periapical após 90 dias da obturação com AH Plus, o que não ocorreu para Pulp Canal Sealer, no qual se observou infiltrado inflamatório intenso.

Lee et al. (2012) investigaram a citotoxicidade de dois cimentos experimentais a base de resina epóxi. Um deles, associado a compostos biocerâmicos e sulfato de bário como agente radiopacificador; e outro que consistiu na associação (1 : 1) dos cimentos AH Plus e MTA. A taxa de respiração celular de fibroblastos gengivais humanos quando expostos a eluatos dos cimentos em 2, 4, 8 ou 24 horas após a manipulação dos mesmos foi avaliada. Observou-se viabilidade para os cimentos experimentais, com taxas acima de 100%.

Considerando a alcalinização e a liberação de hidróxido de cálcio observada na associação com resina epóxi, sugere-se que este material estimule as células do tecido conjuntivo a expressar características osteoblásticas, bem como a formação de estruturas calcificadas neste tecido. Esta hipótese foi avaliada por Viola e colaboradores (2012), ao implantarem em tecido conjuntivo de ratos um cimento biocerâmico experimental composto por óxido de zircônio e resina epóxi, comparando-o com o MTA. Os autores observaram similaridade na resposta biológica promovida por ambos os materiais, além da presença de

estruturas calcificadas adjacentes aos cimentos avaliados, demonstrando, *in vivo*, que a associação de resina epóxi a um cimento biocerâmico apresenta bons resultados de biocompatibilidade e bioatividade.

Avaliando a associação da resina epóxi, juntamente com os agentes radiopacificadores óxido de zircônio e óxido de nióbio, Viapiana et al. (2014) observaram bioatividade, embora sem evidências da hidratação dos materiais na caracterização dos mesmos. Os autores sugerem que os agentes radiopacificadores utilizados exercem influência positiva na interação iônica dos materiais, favorecendo a bioatividade. Ambos os radiopacificadores avaliados neste estudo são utilizados como cobertura da superfície de implantes osseointegrados, devido ao favorecimento da deposição óssea que os mesmos promovem (BARTOLOMÉ et al., 2016).

Camilleri (2015) avaliou a associação de silicato tricálcico a resina epóxi e a Bis-GMA e TEGMA, observando a hidratação do cimento na associação com resina epóxi, o que não ocorreu para a associação com Bis-GMA e TEGMA. Entretanto, os autores relatam que houve liberação de hidróxido de cálcio nos diferentes tipos de resina, corroborando com outro estudo que relata a remineralização da dentina (SAURO et al., 2013).

Cimentos que utilizam como base resina metacrilato também têm sido avaliados como cimentos obturadores endodônticos devido as suas boas propriedades de estabilidade dimensional e menor microinfiltração, quando comparados aos cimentos a base de óxido de zinco e eugenol (WONG et al., 2013). Entretanto, são compostos que apresentam toxicidade *in vitro* e *in vivo* (AMES, 2009). Estudos que compararam a citotoxicidade promovida por um cimento a base de resina metacrilato (EndoRez, Ultradent, South Jordan, UT, USA) com AH Plus relataram toxicidade em períodos iniciais (1-3 dias), que pode estar associada a composição do mesmo, pela presença de uretanodimetacrilato (UDMA), ou pela liberação de monômeros e demais partículas no meio de cultura das células (ASHRAF et al., 2012; KONJHODZIC-PRCIC et al., 2015).

Scarparo et al. (2013) avaliaram a reação inflamatória, em tecido conjuntivo de ratos, causada pelos cimentos EndoRez, AH Plus e EndoFill (Dentsply

Indústria e Comércio Ltda., Petrópolis, RJ, Brazil). Observaram intenso infiltrado inflamatório para o cimento composto por resina metacrilato em todos os períodos avaliados, sendo semelhante ao cimento a base de óxido de zinco e eugenol. Os autores destacam que as características do EndoRez não oferecem uma compatibilidade biológica desejável para uso clínico, pois o mesmo apresenta resposta inflamatória que permanece após longos períodos de tempo. Esses resultados corroboram com o estudo de Chisnoiu et al. (2016), que ao avaliar a resposta inflamatória do RealSeal (SybronEndo, Orange, CA, USA) em tecido ósseo de ratos, também observou inflamação tecidual em períodos tardios (12 semanas).

A associação deste polímero com cimentos biocerâmicos pode levar a redução dos efeitos biológicos adversos causados pelo mesmo. Em estudo recente, Rossato e colaboradores (2017) avaliaram as propriedades físicas, antimicrobianas e biológicas de um cimento experimental com adição de metacrilato de cálcio. Observaram adequados resultados de espessura de película, radiopacidade, grau de conversão e ação antimicrobiana, além de resultados moderados de viabilidade *in vitro*, concluindo que este cimento possui boas características para uso como cimento obturador.

Anteriormente, Khashaba e colaboradores (2009) avaliaram a associação entre fosfato monocálcio, óxido de cálcio e hidroxiapatita sintética com três diferentes soluções aquosas: ácido poliacrílico, líquido de ionômero de vidro ou ácido polimetil-vinil-maleico em fibroblastos gengivais humanos. Observaram que a associação com o polímero polimetil-vinil-maleico demonstrou viabilidade em todos os períodos avaliados. Em estudo posterior, os autores avaliaram este material em tecido subcutâneo de ratos, observando inflamação em períodos iniciais, que diminuiu à medida que se iniciava a formação de uma cápsula fibrosa ao redor do material inserido, demonstrando características de normalidade no período final de 90 dias (KHASHABA et al., 2011).

A associação de diferentes componentes a um cimento endodôntico experimental à base de resina metacrilato de maneira a melhorar as propriedades físico-químicas foi investigada por Collares et al. (2010). Os autores avaliaram a associação de dióxido de titânio (TiO₂), quartzo (SiO₂), óxido de zircônia (ZrO₂),

óxido de bismuto (Bi_2O_3), sulfato de bário (BaSO_4) e trifluoreto de itérbio (YbF_3), em valores por peso que variaram de 5% a 40%. Na avaliação da radiodensidade e da força flexural, a associação de 40% de Bi_2O_3 , BaSO_4 e YbF_3 demonstrou semelhança entre si, com valores que corroboram com os recomendados. Quando o grau de conversão foi avaliado, apenas o grupo contendo TiO_2 apresentou valores baixos de conversão. Os autores concluíram que a associação de pelo menos 30% de YbF_3 demonstrou bons resultados nas propriedades físico-químicas do material. Além disso, destacaram que a baixa solubilidade do mesmo pode prevenir a degradação a longo prazo do cimento obturador.

Ainda, avaliaram a associação de 70% de uretanodimetacrilato (UDMA), 15% de etoxilado bisfenol A glicol dimetacrilato (BISEMA6) e 15% de glicerol 1,3 dimetilmetacrilato (GDMA) com adição de 1% mol de di-hidroxietyl p- toluidina (DHEPT), 1% mol de peróxido de benzoila (BP) e 1% mol de etil 4-dimethylaminobenzoato (EDAB). A esta base resinosa, associou-se hidroxiapatita nanoestruturada (HAp) e tungstato de cálcio (CaWO_4). Os autores observaram propriedades de radiopacidade, espessura de película e escoamento satisfatórias. Relataram a capacidade da HAp em promover a deposição de nódulos mineralizados nos tecidos adjacentes, uma vez que a mesma apresenta a mesma composição e configuração da hidroxiapatita biológica (COLLARES et al., 2012).

Também avaliaram a associação da mesma base de resina metacrilato ao agente radiopacificador óxido de nióbio em quantidades que variaram de 80 a 120 wt% (LEITUNE et al., 2012), observando bons resultados de radiopacidade, espessura de película, escoamento e microdureza. Além disso, os autores sugerem que o elevado grau de conversão está associado a menor quantidade do agente radiopacificador, o que poderia levar a maior disponibilidade de luz durante a polimerização do material, resultando em menos monômeros livres na matriz resinosa. Sabe-se que um baixo grau de conversão da resina resulta em maiores quantidades de monômeros livres no corpo do material, que podem se difundir pelo mesmo e alcançar os tecidos adjacentes, demonstrando toxicidade (MASEREJIAN et al., 2012).

De Souza et al. (2015) avaliaram a associação de 10, 20, 30, 40, e 50% de CaWO_4 , óxido de tântalo (Ta_2O_3) e YbF_3 ao cimento endodôntico experimental à base de resina metacrilato previamente desenvolvida. Observaram menor escoamento para as maiores adições dos agentes radiopacificadores (30, 40 e 50%), boa espessura de película, radiopacidade, pH e absorção de água. Dentre os agentes radiopacificadores avaliados, apenas o radiopacificador YbF_3 apresentou elevado grau de conversão, semelhante ao grupo controle, após 14 dias.

Um estudo avaliando as propriedades biológicas do YbF_3 associado a compostos de cálcio (ANTONIJEVIC et al., 2015) demonstrou diminuição da liberação de YbF_3 quando o mesmo está associado ao cálcio, o que diminui a toxicidade do mesmo. Também observaram normalidade das células osteoblásticas quando em contato com o material, formação de fluorapatita e liberação de íons cálcio, o que contribui para um ambiente biologicamente favorável, sugerindo que o cimento experimental avaliado apresenta bioatividade e biointeratividade. Além disso, sugere-se que o itérbio é um metal que exerce influência na resposta inflamatória, pela regulação de mediadores químicos da inflamação (DRYNDA et al., 2009).

Recentemente, Collares et al. (2017) avaliaram a associação do cimento endodôntico experimental à base de resina metacrilato e radiopacificador YbF_3 ao α -tricálcio fosfato e a clorexidina, almejando propriedades biológicas e antimicrobianas. Os autores observaram boas propriedades físico-químicas (escoamento, espessura de película, radiopacidade, grau de conversão, degradação em água e pH), antimicrobianas e biológicas desta associação, concluindo que a mesma pode ser uma alternativa para promover ação antibacteriana e remineralizadora na região periapical, acelerando o processo de reparo tecidual.

Novas associações da resina metacrilato a compostos biocerâmicos tem sido propostas na literatura, demonstrando resultados promissores para uso como cimento obturador endodôntico. Todavia, apesar das boas propriedades físico-químicas e mecânicas oriundas do polímero, a avaliação das propriedades biológicas é de extrema importância para o posterior uso clínico do material.

OBJETIVOS

Objetivo geral: Avaliar as propriedades biológicas de cimentos experimentais a base de resina metacrilato contendo fosfato de cálcio *in vitro* e *in vivo*.

Objetivo específico 1: Avaliar a viabilidade e bioatividade, em cultura de células-tronco obtidas da papila apical humana (SCAPs) de cimentos experimentais a base de resina metacrilato contendo α -tricálcio-fosfato ou hidroxiapatita nanoparticulada.

Objetivo específico 2: Avaliar a resposta tecidual, em tecido subcutâneo de ratos, de cimentos experimentais a base de resina metacrilato contendo α -tricálcio-fosfato ou hidroxiapatita nanoparticulada.

Objetivo específico 3: Avaliar a neoformação óssea, em fêmur de ratos, de um cimento experimental a base de resina metacrilato contendo α -tricálcio-fosfato.

ARTIGO 1

Experimental methacrylate-based sealers containing calcium phosphates: *in vitro* and *in vivo* biological properties*

*Artigo submetido ao periódico *International Endodontic Journal*.

ABSTRACT

AIM: To evaluate the biological properties of methacrylate-based experimental sealers containing calcium phosphates.

METHODOLOGY: Experimental sealers with addition of α -tricalcium phosphate (α -TCP) or hydroxyapatite (HAp), in 10%wt, were formulated and compared to AH Plus (AHP). For *in vitro* evaluation, SCAPs were plated (1×10^4 cells/well) and exposed to sealers' elute (10% concentrations). Cytotoxicity was assessed by 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) and sulforhodamine B (SRB) 24h after exposure. For *in vivo* evaluation, sterile polyethylene tubes containing the sealers were implanted in rats' subcutaneous tissue and histologically evaluated after the periods of 7, 30 and 90 days. Inflammatory content and collagen fibers condensation were scored. Data were analyzed using Kruskal-Wallis and Dunn tests ($P < 0.05$).

RESULTS: HAp and AHP did not presented statistical differences from each other in both citotoxicity assays ($P > 0.05$), and α -TCP presented a lower viability result in MTT assay, being statistically different from the other sealers ($P < 0.05$). *In vivo* assay demonstrated gradual decrease of the inflammatory content according to the periods. At 7 days, α -TCP and HAp showed results not statistically different from CT ($P > 0.05$), differing from AHP ($P < 0.05$). AHP was the only group that presented giant cells (7 days period). Collagen fibers condensation increased according to the periods, with no differences between the groups ($P > 0.05$).

CONCLUSIONS: Methacrylate-based sealers containing α -TCP and HAp presents biocompatibility outcomes and have great potential to be used as endodontic sealers in clinical practice.

INTRODUCTION

The filling of the root canal system (RCS) aims its three-dimensional sealing. Materials as gutta-percha associated with appropriate endodontic sealers are used to improve the quality of endodontic obturation. The ideal endodontic sealer must be biocompatible, dimensionally stable, radiopaque and capable of being removed by a solvent (Ørstavik 2005). To date, no commercially available sealer is capable to attend all the desired properties, and the association of bioactive compounds to a sealer in order to stimulate the healing of the periapical tissues have been studied (Prati & Gandolfi 2015).

Endodontic sealers may impair the adjacent tissue by releasing components or by direct contact, and these features must be evaluated performing biological assays such as cytotoxicity and histocompatibility. Calcium phosphate is a biomaterial widely used in biomedical area due to its biocompatible and osteoconduction/osteoinduction potential (Sun & Yang 2015). Experimental sealers containing variations of this compound in a polymer base have been studied *in vitro* in a cell culture model (Khashaba *et al.* 2009, Ashraf *et al.* 2012, Konjhodzic-Prcic *et al.* 2015) and *in vivo*, in rats' subcutaneous tissue (Scarparo *et al.* 2009, Khashaba *et al.* 2011, Hinata *et al.* 2017).

Different calcium phosphates compounds have been studied and its dissolution could promote ion accumulation and therefore mineral deposition, which contributes to its high bioactive potential (Gandolfi *et al.* 2010). α -tricalcium phosphate is a reactive compound that presents high biodegradation rate and progressive dissolution with formation of calcium-apatite (Padilla *et al.* 2006). Hydroxyapatite is a more stable calcium phosphate with low solubility, being used as a filler for composite resins (Domingo *et al.* 2003), adhesive systems (Leitune *et al.* 2013) and root canal sealers (Collares *et al.* 2012, Collares *et al.* 2017). In addition, studies evaluating experimental endodontic sealers with hydroxyapatite demonstrated good biological outcomes *in vitro* and *in vivo* (Jacob *et al.* 2014, Portella *et al.* 2015).

Methacrylate monomers have been used to produce endodontic sealers due to its good physical-chemical properties (Wong *et al.* 2013). On the other hand, Ames (2009), in a literature review about cytotoxicity and biocompatibility of resin materials for root canal obturation, evidenced a toxicity degree of this compound, also reported by Yamanaka *et al.* (2011) and Martinho *et al.* (2017). However, the effect of calcium phosphate in a methacrylate-based sealer at biocompatibility has never been investigated. Thus, the aim of this study was to evaluate the biological properties of experimental methacrylate-based endodontic sealers containing α -tricalcium phosphate or nanostructured hydroxyapatite.

METHODS

Ethics considerations

This study was approved by the Research Ethics Committee (protocol number 38542614.6.0000.5347) and the Animals Use Ethics Committee (protocol number 30466) of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil. It was structured in accordance with the principles of Law No. 11.794 (October 8th, 2008), which regulates the scientific use of animals and the Brazilian Directive for the Care and Use of Animals for Scientific and Educational Purposes (DBCA, 2013), of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Formulation of experimental sealers

The monomers used to produce an experimental root canal sealer were urethane dimethacrylate (UDMA), glycerol-1,3-dimethacrylate (GDMA), ethoxylated bisphenol A glycol dimethacrylate (BISEMA6), camphorquinone (CQ), N,N-dihydroxyethyl-para-toluidine (DHEPT), ethyl 4-dimethylaminobenzoate (EDAB) and benzoyl-peroxyde (BP), (Esstech Inc, Essington, PA, USA). Hydroxyapatite (HAp) and α -tricalcium phosphate (α -TCP) were used with a mean

particle size of 26.7 nm and 6.03 μm , respectively (Leitune *et al.* 2013, Collares *et al.* 2017). The experimental root canal sealers were formulated by mixing 70 wt.% UDMA, 15 wt.% BISEMA6 and 15 wt.% GDMA. CQ, DHEPT, EDAB and BP were added to produce a dual-cure root canal sealer. The filler particles used were a mixture of Yb_3F in a weight ratio of 40% for HAp, and $\alpha\text{-TCP}$ in a weight ratio of 10%. The filler particle mixture was added at 100 wt.% to the monomer blend.

Cell culture

Stem cells from apical papilla (SCAPs) were collected from one patient with third molars at the stage of incomplete root formation via apical opening and stored in a culture dish (35x10 mm; TPP - Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Swiss) containing Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification ($\alpha\text{-MEM}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA) and 1% penicillin and streptomycin (P/S, Gibco). The tissues were sectioned into fragments of approximately 1 mm^3 and kept in an incubator at 37°C, 100% humidity and 5% CO_2 . Culture medium was changed 24h after the tissue collection and every 48h to obtain explants of SCAPs. After 80% confluency, cells were washed with PBS 1X (Sigma-Aldrich), separated with Trypsin-EDTA 0.25% solution (Sigma-Aldrich), re-suspended in culture medium and transferred to a Falcon tube (TPP) thus forming a cell suspension that were transferred to cell culture bottles (TPP) that were kept in an incubator at 37°C, 100% humidity and 5% CO_2 until reaching 80% of confluency. Successive passages were prepared for cellular expansion, and the experiments were performed at the fourth cell passage.

To show mesenchymal cells potential, SCAPs were submitted to a flow cytometer analysis using specific molecular markers of mesenchymal cells. For this, the cells were incubated at 4°C during 30 minutes with the following antibodies: STRO1, CD146, CD44, CD45 and CD14, at 1:10 dilution, washed with phosphate buffer saline (PBS), fixed with a mixed solution (1% paraformaldehyde, 0,1% sodium azide and 0,5% FBS) and submitted to flow cytometry analysis.

For the elutes confection, the experimental sealers and AH Plus (Dentsply, York, PA, USA) were manipulated, placed in a 12-well plate (TPP) ($n = 4$) and filled with α -MEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S (volume = 360mm^3 per well). The plate was incubated at 37°C , 100% humidity and 5% de CO_2 for 24 hours and the elutes were collected in sterile Falcon tubes. The concentration of 10% of the elutes, diluted in culture medium, were used for cytotoxicity assays.

SCAPs (1×10^4 cells per well) were seeded in two 96-well plates (TPP) using α -MEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S. One day after plating, cells were exposed to the sealers elutes ($100 \mu\text{L}$ per well). The experiments were performed in triplicate and repeated at three independently times.

Cytotoxicity assays

Cytotoxicity was assessed by 3-(4,5-dimethyl-thiazoyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich), which evaluates cell's mitochondrial respiration through the quantification of the enzyme mitochondrial succinate dehydrogenase, and sulforhodamine B (SRB, Sigma-Aldrich), which evaluated cell's protein content, assays 24h after the cells exposure.

For MTT evaluation, $10 \mu\text{L}$ of a 5 mg/mL MTT solution were added in each well, followed by incubation for 3h at 37°C , 100% humidity and 5% de CO_2 . After this period, the wells contents were removed and the colorimetric product solubilized in $100 \mu\text{L}$ of acidified isopropanol ($\text{HCl } 0.4\text{N}$, Sigma-Aldrich). The optical densities of the solutions were measured in a spectrophotometer at 570 nm wavelength.

For SRB evaluation, $25 \mu\text{L}$ of a 50% trichloroacetic acid solution (Sigma-Aldrich) were added in each well, followed by incubation for 1h at 4°C . After this period, the wells contents were removed and $100 \mu\text{L}$ of SRB dye (0.4%) were added in each well for 30 minutes. The plate was washed with 1% acetic acid solution (Sigma-Aldrich) and $100 \mu\text{L}$ of Trizma Base (10mM) (Sigma-Aldrich) were added to solubilize the colorimetric product. The optical densities of the solutions were measured in a spectrophotometer at 560 nm wavelength.

For both experiments, α -MEM was used as a negative control, and hydrogen peroxide 10 mM (Sigma-Aldrich) as a positive control. The absorbance readouts were normalized with the absorbance of the control group and represented the activity of the viable cells.

Biocompatibility assay

Eighteen male *Wistar* rats aged 18 weeks were used for the experiments, that were divided in three groups, according to the experimental periods: 7, 30 and 90 days (n = 6/ group). The animals were anesthetized with 0.008 mL/100 g ketamine and 0.004 mL/100 g 2% xylazine hydrochloride (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brazil). Dorsal trichotomy was performed in an area comprising approximately 10 cm², followed by disinfection with an alcohol-iodine solution. Four 0.5 cm-long incisions were made in the animals' backs, 2 cm from the spine and at least 2 cm apart from one another, and using blunt-tipped scissors, 4 surgical cavities were made. Three sterile polyethylene tubes (10mm x 1mm) containing the evaluated materials and one empty tube (control group - CT) were placed into the surgical cavities parallel to the incision; the position in which each tube was implanted was randomized. The incisions were closed using a 3-0 silk thread (Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos, SP, Brazil).

At the end of each experimental period, the animals were euthanized by anesthetic overdose with 120 mL/kg pentobarbital (Syntec do Brasil Ltda., Cotia, SP, Brazil). Immediately, biopsy of the implant area was carried out with a 1-cm safety margin and fixed in 10% formalin solution for 24 h. Specimens were embedded in paraffin, and 3- μ m-thick sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin. Two blinded and calibrated examiners ($\kappa = 0.77$) analyzed the slices under a light microscope (Olympus BX41– Olympus America Inc., Melville, NY, EUA), using 40, 100, 400, and 1000 x magnification.

The inflammatory content was determined by the presence of neutrophils, eosinophils, giant cells, macrophages and lymphoplasmacytic cells. The events were classified according to the following scale: 0) Absent: inflammation was

either absent or within blood vessels; 1) Mild: cells were present although sparse or in reduced clusters; 2) Moderate: cells were present but did not dominate the microscopic field; 3) Intense: cells were present in the form of an infiltrate close to the material used. Fiber condensation were classified according to the following scale: 0) Absence of collagen fibers; 1) Presence of a thin layer of collagen fibers; 2) Presence of a thick layer of collagen fibers. Abscess formation was classified as follows: 0) Absence of an abscess; 1) Presence of an abscess in contact with the surgical cavity in which the material had been inserted; 2) Presence of abscess areas far from the surgical cavity in which the material had been inserted (Figueiredo *et al.* 2001).

Statistical analysis

Data were analyzed regarding normality (Shapiro-Wilk), and the statistical analysis were performed using Kruskal-Wallis test and Dunn's *post hoc*, with 5% significance level (GraphPadPrism 7 Software).

RESULTS

Characterization assay

At flow cytometer assay, cells presented the following outcomes for the surface markers (Figure 1): STRO1 (+), CD146 (+), CD 44 (+), CD45 (-) and CD14 (-), demonstrating its mesenchymal potential.

Cytotoxicity assays

HAp and AHP did not presented statistical differences from each other in both assays ($P > 0.05$), and α -TCP presented a lower viability result in MTT assay, being statistically different from the other sealers ($P < 0.05$).

Biocompatibility assay

The study results are summarized in Figures 3 and 4. At *in vivo* assay, the inflammatory content and its evaluated cells (macrophages, neutrophils and lymphoplasmacytic cells) scores were higher at the 7 days period, decreasing at 30 and 90 days. Regarding the inflammatory content at 7 days period, α -TCP and HAp showed no difference to CT ($P > 0.05$) and AHP showed statistical difference to CT ($P < 0.05$), presenting the highest scores (Figure 3). Furthermore, the AHP group was the only one that presented giant cells, at 7 days period (Figure 4, A).

At the specific cells evaluation (macrophages, neutrophils and lymphoplasmacytic cells), no statistical differences were found between the groups when compared to the CT ($P > 0.05$). HAp presented statistical difference for lymphoplasmacytic cells at the 7 days period when compared to the 30 days, occurring a decrease of the score ($P < 0.05$). None of the evaluated periods showed the presence of eosinophils cells nor abscess formation. Formation and condensation of new collagen fibers occurred from the first (7 days) until the last evaluated period (90 days), with no differences between the groups ($P > 0.05$) (Figure 3).

DISCUSSION

The addition of calcium phosphate to endodontic sealers aims to develop a bioactive material to improve the complete regeneration of the damaged apical periodontal attachment apparatus and surrounding bone (Prati & Gandolfi 2015). Literature has shown high bioactivity of α -tricalcium phosphate (α -TCP) and nanostructured hydroxyapatite (HAp), associated with good biological properties (Varalakshmi *et al.* 2013, Machado *et al.* 2016), corroborating with the findings of this study, demonstrating that the association between methacrylate and calcium phosphate compounds showed a low toxicity rate for the sealers, minimizing the adverse effects of this resin on the biological response.

The formulation of an endodontic sealer with α -TCP in a glycerol salicylate base was previously evaluated (Portella *et al.* 2015), showing reliable physical chemical properties, apatite-forming ability and cytotoxic levels similar to the gold standard sealer AH Plus. HAp was used to produce an experimental methacrylate-based sealer with promise results (Collares *et al.* 2012). However, biological studies are necessary to validate the use of those sealers.

The main goal of *in vitro* assays is to evaluate toxicity, while for *in vivo* assays, is to evaluate several characteristics of tissue response, in which toxicity is the major one. Thus, a significantly toxic material will predictably cause severe irritation to tissue, while if *in vitro* tests showed low toxicity levels, appropriate *in vivo* usage experimentation could be performed (Spångberg 1978). In the present study, cell culture methodologies were associated with histological evaluation aiming to evaluate the biological response of the sealers, as well as its possible risks. Regarding biological properties, the sealers exhibited promising results of viability and compatibility, suggesting they can be used for clinical practice.

In vitro methodologies presented in this study are commonly used to assess cytotoxicity of dental materials in different cell lines (Ashraf *et al.* 2012, Reis *et al.* 2016). The apical papilla is responsible for root development, and stem cells of the apical papilla (SCAPs) have demonstrated higher proliferation and differentiation potential than dental pulp stem cells (DPSCs), due to several differences that support the hypothesis that SCAPs are the source of primary odontoblasts responsible for root formation, whereas DPSCs are responsible for odontoblasts' replacement (Huang *et al.* 2008). These evidences suggest that SCAPs may represent a population of early stem/progenitor cells. Previous studies evaluating calcium phosphate-based materials (Ling *et al.* 2015, Saberi *et al.* 2016) demonstrated high viability and bioactivity rates, in addition to differentiation potential, for mesenchymal cell lines as SCAPs and DPSCs, what may aid the periapical healing process.

Studies evaluating resin-based sealers such as EndoRez, a methacrylate-based sealer (Ultradent, South Jordan, UT, USA) and AH Plus, an epoxy-resin sealer (Dentsply, York, PA, USA) show that they exhibit cytotoxicity *in vitro* at initial periods (1-3 days) (Ashraf *et al.* 2012, Konjhodzic-Prcic *et al.* 2015).

Nevertheless, a study evaluating the cytotoxicity of an experimental sealer composed of calcium phosphate in a methacrylate -base in primary human gingiva fibroblasts and mouse fibroblasts (L929) showed acceptable biological properties (Khashaba *et al.* 2009). Besides the methacrylate component, the presence of calcium phosphate in the experimental sealers promote high viability rates due to its proliferation potential in human mesenchymal stem cells (hMSCs) (Barrère *et al.* 2003).

In vivo methodology aimed to simulate the direct contact of the endodontic sealers to the periapical region, getting in contact with the connective tissue from this area. The inflammatory content and collagen fibers condensation are substantially associated with the healing process (Figueiredo *et al.* 2001); the outcomes of this study showed a higher amount of inflammatory cells at the first period (7 days) and a gradual decrease of those cells according to the periods, associated to an increase at collagen fibers condensation for all evaluated sealers. Besides, AHP was the only group that presented giant cells at the 7 days period, corroborating with previous studies (Baldasso *et al.* 2016). The experimental sealers with calcium phosphate addition used in this study showed good biocompatibility results.

When it comes to biocompatibility, methacrylate-based sealers (EndoRez) present intense inflammation levels, being less biocompatible than AH Plus (Scarparo *et al.* 2009). On the other hand, an experimental calcium phosphate-based sealer associated with a polymeric acid demonstrated favorable biocompatibility levels in subcutaneous connective tissue of rats (Khashaba *et al.* 2011).

The good results of this study may be also explained by the high degree of conversion obtained by the experimental methacrylate-based sealers (Collares *et al.* 2017). A low degree of conversion leads to higher amounts of non-polymerized monomers that could leach from the bulk of polymer and diffuse to soft tissue, increasing toxicity (Ferracane 2006, Maserejian *et al.* 2012). One could think that the decrease in leachability could jeopardize the calcium phosphate elution thus decreasing the remineralization property. However, it is known that even when in surface of material, calcium phosphates could promote mineral deposition

(Portella *et al.* 2015) and remineralization (Elkassas & Arafa 2014, Weir *et al.* 2017).

CONCLUSIONS

In conclusion, the calcium phosphate compounds evaluated in this study, α -TCP and HAp, in a methacrylate-based sealer, present biocompatibility outcomes. Besides, the presence of α -TCP and HAp in the sealer may minimize the toxicity effects induced by methacrylate, and have great potential to be used as endodontic sealers in clinical practice.

REFERENCES

Ames JM, Loushine RJ, Babb BR *et al* (2009) Contemporary methacrylate resin-based root canal sealers exhibit different degrees of ex vivo cytotoxicity when cured in their self-cured mode. *Journal of Endodontics* **35**,225-8.

Ashraf H, Moradimajd N, Mozayeni MA, Dianat O, Mahjour F, Yadegari Z (2012) Cytotoxicity evaluation of three resin-based sealers on an L929 cell line. *Dental Research Journal (Isfahan)* **9**,549-53.

Baldasso FE, Kopper PM, Morgental RD, Steier L, Figueiredo JA, Scarparo RK (2016) Biological tissue response to a new formulation of a silicone based endodontic sealer. *Brazilian Dental Journal* **27**,657-63.

Barrère F, van der Valk CM, Dalmeijer RA *et al* (2003) Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **15**,779-88.

Collares FM, Leitune VC, Rostirolla FV, Trommer RM, Bergmann CP, Samuel SM (2012) Nanostructured hydroxyapatite as filler for methacrylate-based root canal sealers. *International Endodontic Journal* **45**,63-7.

Collares FM, Leitune VCB, Portella FF *et al* (2017) Methacrylate-based root canal sealer containing chlorhexidine and α -tricalcium phosphate. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [Epub ahead of print].

Domingo C, Arcís RW, Osorio E *et al* (2003) Hydrolytic stability of experimental hydroxyapatite-filled dental composite materials. *Dental Materials* **19**,478-86.

Elkassas D, Arafa A (2014) Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *Journal of Dentistry* **42**,466-74.

Ferracane JL (2006) Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dental Materials* **22**,211-22.

Figueiredo JAP, Pesce HF, Gioso MA, Figueiredo MAS (2001) The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. *International Endodontic Journal* **34**,377-85.

Gandolfi MG, Ciapetti G, Taddei P *et al* (2010) Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dental Materials* **26**,974-92.

Hinata G, Yoshiba K, Han L, Edanami N, Yoshiba N, Okiji T (2017) Bioactivity and biomineralization ability of calcium silicate-based pulp-capping materials after subcutaneous implantation. *International Endodontic Journal* [Epub ahead of print].

Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S (2008) The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *Journal of Endodontics* **34**,645-51.

Jacob GM, Kumar A, Varughese JM, Varghese NO, Varma PR, Komath M (2014) Periapical tissue reaction to calcium phosphate root canal sealer in porcine model. *Indian Journal of Dental Research* **25**,22-7.

Khashaba RM, Chutkan NB, Borke JL (2009) Comparative study of biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers on fibroblasts derived from primary human gingiva and a mouse L929 cell line. *International Endodontic Journal* **42**,711-8.

Khashaba RM, Moussa MM, Chutkan NB, Borke JL (2011) The response of subcutaneous connective tissue to newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. *International Endodontic Journal* **44**,342-52.

Konjhodzic-Prcic A, Jakupovic S, Hasic-Brankovic L, Vukovic A (2015) In vitro comparison of cytotoxicity of four root canal sealers on human gingival fibroblasts. *Medical Archives* **69**,24-7.

Leitune VC, Collares FM, Trommer RM, Andrioli DG, Bergmann CP, Samuel SM (2013) The addition of nanostructured hydroxyapatite to an experimental adhesive resin. *Journal of Dentistry* **41**,321-7.

Ling LE, Feng L, Liu HC *et al* (2015) The effect of calcium phosphate composite scaffolds on the osteogenic differentiation of rabbit dental pulp stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **103**,1732-45.

Machado CP, Sartoretto SC, Alves AT *et al* (2016) Histomorphometric evaluation of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite as bone substitute in sheep. *Brazilian Oral Research* **30**,45e.

Martinho FC, Camargo SEA, Fernandes AMM, Campos MS, Prado RF, Camargo CHR, Valera MC (2017) Comparison of cytotoxicity, genotoxicity and immunological inflammatory biomarker activity of several endodontic sealers against immortalized human pulp cells. *International Endodontic Journal* [Epub ahead of print].

Maserejian NN, Trachtenberg FL, Hauser R *et al* (2012) Dental composite restorations and psychosocial function in children. *Pediatrics* **130**,328e.

Ørstavik D (2005) Materials used for root canal obturation: technical, biological and clinical testing. *Endodontic Topics* **12**,25–38.

Padilla S, Román J, Sánchez-Salcedo S, Vallet-Regí M (2006) Hydroxyapatite/SiO(2)-CaO-P(2)O(5) glass materials: in vitro bioactivity and biocompatibility. *Acta Biomaterialia* **2**,331-42.

Portella FF, Collares FM, Dos Santos LA *et al* (2015) Glycerol salicylate-based containing α -tricalcium phosphate as a bioactive root canal sealer. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **103**,1663-9.

Prati C, Gandolfi MG (2015) Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dental Materials* **31**,351-70.

Reis MV, Souza GL, Moura CC, Soares PB, Soares CJ (2016) Effect of different storage media on root dentine composition and viability of fibroblasts

evaluated by several assay methods. *International Endodontic Journal* [Epub ahead of print].

Saberi EA, Karkehabadi H, Mollashahi NF (2016) Cytotoxicity of Various Endodontic Materials on Stem Cells of Human Apical Papilla. *Iranian Endodontic Journal* **11**,17-22.

Scarpato RK, Grecca FS, Fachin EV (2009) Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. *Journal of Endodontics* **35**,229-32.

Spångberg LS (1978) Correlation of in vivo and in vitro screening tests. *Journal of Endodontics* **4**,296-9.

Sun H, Yang HL (2015) Calcium phosphate scaffolds combined with bone morphogenetic proteins or mesenchymal stem cells in bone tissue engineering. *Chinese Medical Journal* **128**,1121-7.

Varalakshmi PR, Kavitha M, Govindan R, Narasimhan S (2013) Effect of statins with α -tricalcium phosphate on proliferation, differentiation, and mineralization of human dental pulp cells. *Journal of Endodontics* **39**,806-12.

Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshida K, Yoshida N, Okiji T (2011) Immunohistochemical analysis of subcutaneous tissue reactions to methacrylate resin-based root canal sealers. *International Endodontic Journal* **44**,669-75.

Weir MD, Ruan J, Zhang N (2017) Effect of calcium phosphate nanocomposite on in vitro remineralization of human dentin lesions. *Dental Materials* [Epub ahead of print].

Wong JG, Caputo AA, Li P, White SN (2013) Microleakage of adhesive resinous materials in root canals. *Journal of Conservative Dentistry* **16**,213-8.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1) Immunophenotyping of stem cells from apical papilla (SCAPs) by flow cytometry after four passages. Expression of the STRO1, CD146 and CD44 markers.

Figure 2) Results of cytotoxicity assays of the sealers at human dental papilla stem cells (SCAPs). Different lowercase letters represent statistical difference between the groups at the same evaluated concentration.

Figure 3) Results of biocompatibility assays of the sealers at subcutaneous tissue of rats. Statistical differences between the groups at the same evaluated period were demonstrated with an asterisk symbol (*) on the graph. Statistical difference between the periods at the same evaluated group was demonstrated with a delta symbol (δ) on the graph.

Figure 4) Illustrative images of histological findings. A) Giant cells (arrows) at AHP (7 days, 40X); B) Neutrophil (arrow) and vessels at α -TCP (7 days, 100X); C) Macrophages (arrows) at HAp (7 days, 100X); thick layer of collagen fiber at α -TCP (D) and HAp (E) (90 days, 20X); F) Normal tissue aspect at CT (90 days, 10X).

FIGURES

Figure 1)

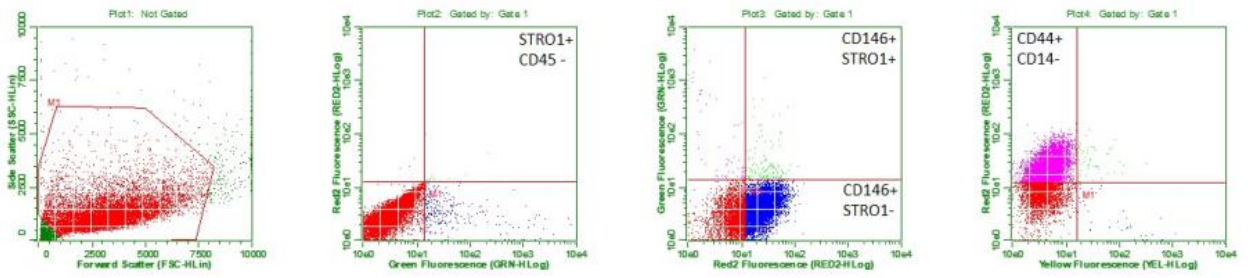


Figure 2)

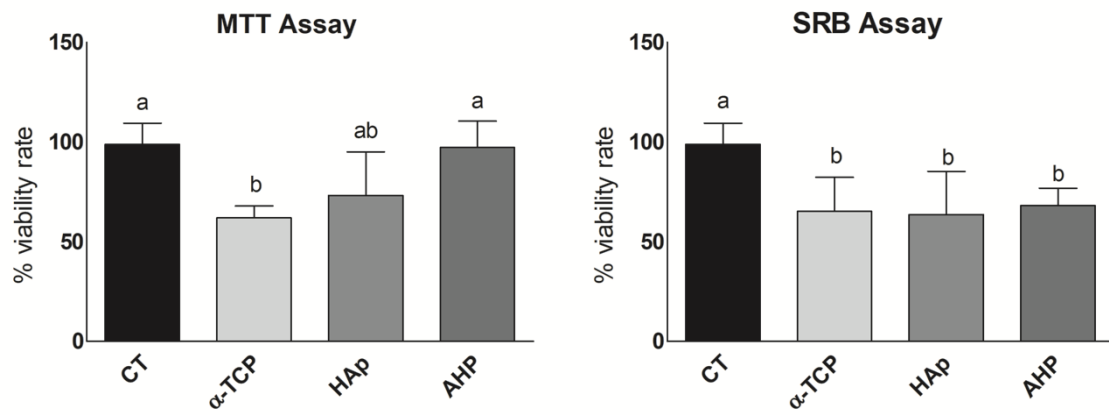


Figure 3)

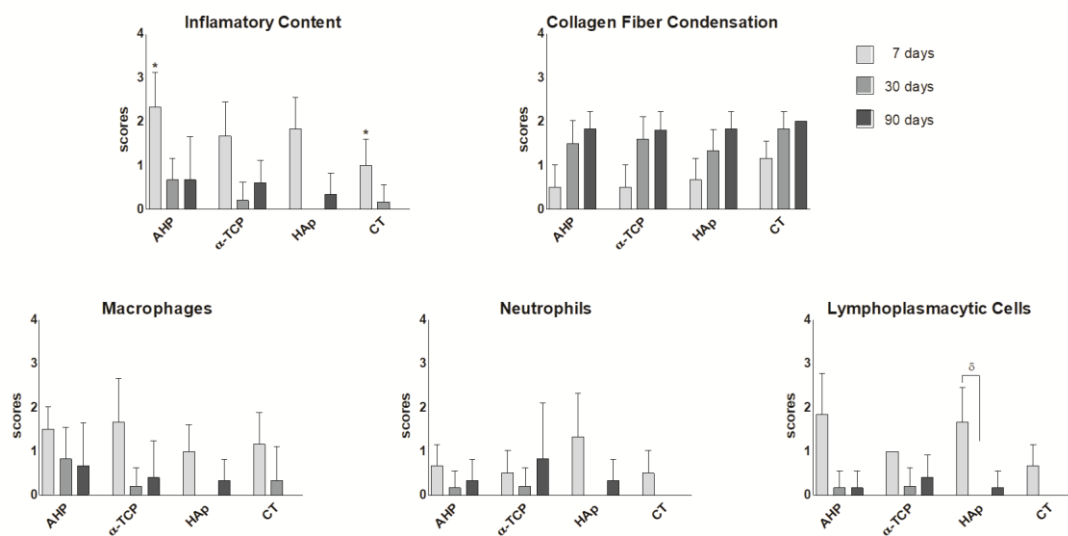
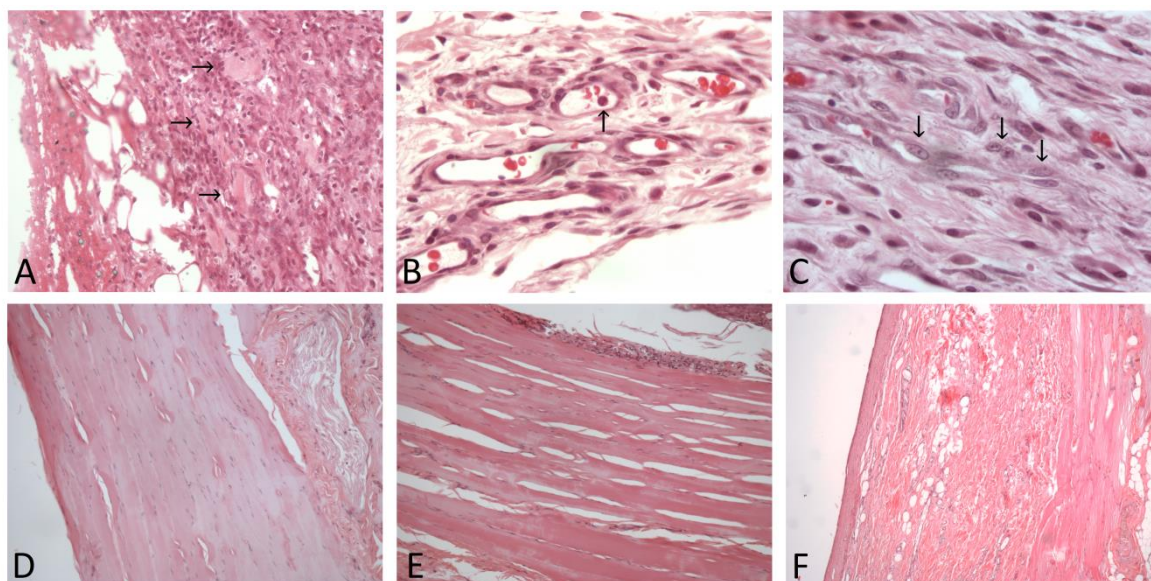


Figure 4)



ARTIGO 2**Bioactive potential of an experimental sealer containing α -tricalcium phosphate in a methacrylate-base***

*Artigo será submetido ao periódico *Journal of Endodontics*.

ABSTRACT

INTRODUCTION: This study aimed to evaluate bioactivity of experimental endodontic sealers containing calcium phosphates in a methacrylate resin base.

METHODS: α -tricalcium phosphate (α -TCP) or nanoparticulated hydroxyapatite (HAp) were associated to a methacrylate resin-base and compared to AH Plus (AHP). Stem cells from apical papilla (SCAPs) were used to assess bioactivity, by alkaline phosphatase enzyme activity (ALP) and Alizarin Red (AR) staining at 1, 5, 10 and 15 days. At *in vivo* assay, α -TCP was compared to AHP. Surgical cavities on rats' femur were filled with the sealers and bone deposition was measured after 30 and 90 days; an empty cavity was used as control. Statistical analysis was performed using ANOVA for *in vitro* and Kruskal-Wallis for *in vivo* assays ($P < 0.05$).

RESULTS: SCAPs showed an increase at ALP and mineralized nodules deposition according to periods. HAp and α -TCP were different from AHP at 5 days ($P < 0.05$), and the latter presented superior values at 10 and 15 days when compared to AHP ($P < 0.05$). At AR assay, experimental sealers were similar at 5 days ($P > 0.05$), and α -TCP showed the highest values at 10 and 15 days ($P > 0.05$). *In vivo* assay showed bone deposition at 30 days, increasing at the 90 days for control and α -TCP ($P < 0.05$). At 90 days, α -TCP and control showed similar results ($P > 0.05$), differing from AHP ($P < 0.05$).

CONCLUSIONS: The association of calcium phosphates to methacrylate-based sealers demonstrated bioactivity.

INTRODUCTION

The filling of the root canal system with specific materials aims the three-dimensional sealing of the same. For this, the endodontic sealer must be non-toxic, bacteriostatic, dimensionally stable, provide lateral and apical sealing, resist moisture, be radiopaque, removable and biocompatible (1). New sealers presenting calcium phosphates in its composition have been evaluated in animal model, demonstrating good tissue responses (2).

Calcium phosphate is a biomaterial that has been widely used in health due to its biocompatible and osteoconduction/ osteoinduction potential (3). Among the calcium phosphate cements that have been studied, α -tricalcium phosphate presents high rate of biodegradation by hydrolysis and progressive dissolution with formation of apatite crystals, which contributes to its high bioactive potential (4). Therefore, it is assumed that the addition of calcium phosphate in an endodontic sealer can increase the bioactivity potential due to its proliferation and differentiation ability in stem cells (5).

Methacrylate-based sealers have been evaluated as endodontic sealers due to its good dimensional stability and lower microleakage when compared to zinc oxide and eugenol-based sealers (6). Studies evaluating the cytotoxicity of EndoRez (Ultradent, South Jordan, UT, USA) showed low viability rates at initial periods *in vitro* (1-3 days) (7,8), decreasing in periods longer than 7 days (9). When biocompatibility was accessed, Scarparo *et al.* (10) observed intense and longer-lasting inflammation for EndoRez when compared to AH Plus (Dentsply, York, PA, USA).

The association between methacrylate resin and calcium has been recently reported by Rossato *et al.* (11), who observed adequate results for physical properties and antimicrobial activity, associated with moderate results of viability in rat fibroblasts cells. The authors suggest that the promising results of this association might result in the development of a new endodontic sealer. However, the bioactivity potential of calcium phosphate in a methacrylate-based sealer has never been investigated. Thus, the aim of this study was to evaluate bioactivity, *in*

vitro and *in vivo*, of an experimental endodontic sealer containing calcium phosphates in a methacrylate resin base.

METHODS

Ethics considerations

The present study was approved by the Research Ethics Committee (protocol number 38542614.6.0000.5347) and the Animals Use Ethics Committee (protocol number 30466) of the School of Dentistry of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

Formulation of experimental sealers

The monomers used to produce the experimental root canal sealers were urethane dimethacrylate (UDMA), glycerol-1,3-dimethacrylate (GDMA), ethoxylated bisphenol A glycol dimethacrylate (BISEMA6), camphorquinone (CQ), N,N-dihydroxyethyl-para-toluidine (DHEPT), ethyl 4-dimethylaminobenzoate (EDAB) and benzoyl-peroxyde (BP), (Esstech Inc, Essington, PA, USA). Nanoparticulated hydroxyapatite (HAp) and α -tricalcium phosphate (α -TCP) were used with a mean particle size of 26.7 nm and 6.03 μ m, respectively (12,13). The experimental root canal sealers were formulated by mixing 70 wt.% UDMA, 15 wt.% BISEMA6 and 15 wt.% GDMA. CQ, DHEPT, EDAB and BP were added to produce a dual-cure root canal sealer. The filler particles used were a mixture of Yb₃F in a weight ratio of 40% and HAp, α -TCP in a weight ratio of 10%. The filler particle mixture was added at 100 wt.% to the monomer blend.

Extract confection

For the extracts confection, AH Plus (Dentsply, York, PA, USA) and the experimental sealers (α -TCP and HAp) (Dental Materials Lab, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) were manipulated, placed in a 12-well plate (volume = 360mm³) and filled with Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification (α -MEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA) and 1% penicillin and streptomycin (P/S, Gibco). The plate were incubated at 37°C, 95% humidity and 5% de CO₂ for 24 hours and the extracts were collected in sterile Falcon tubes. All experiments were performed with 10% dilution of the extracts.

Cell culture

Stem cells from apical papilla (SCAPs) were collected from patients with third molars at the stage of incomplete root formation via apical opening and stored in a culture dish (35x10 mm) containing α -MEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S. The tissues were sectioned into fragments of approximately 1 mm³ and kept in at 37°C, 95% humidity and 5% CO₂. Culture medium was cHApped 24h after the tissue collection and every 48h to obtain explants of SCAPs. Successive passages were prepared for cellular expansion. Cells were characterized as mesenchymal stem cells by flow cytometer using the following molecular markers: STRO1 (+), CD146 (+), CD 44 (+), CD45 (-) and CD14 (-) (Figure 1).

SCAPs (1x10⁴ cells per well) were seeded in 24-well plates using α -MEM supplemented with 10% FBS and 1% P/S. One day after plating, cells were exposed to the sealers extracts at 10% concentration. The experiments were performed with cells from the fourth passage, and were repeated three times independently (n = 3/group).

In vitro biactivity assays

Bioactivity were assessed by alkaline phosphatase (ALP) enzyme activity, considered a marker of osteoblastic and odontoblastic activity; and Alizarin Red

(AR) staining, which identifies calcium and phosphate deposits in cell culture; both at the periods of 1, 5, 10 and 15 days.

For ALP evaluation, a commercial kit (Fosfatase Alcalina, Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brazil) were used. Cells were lysed with 0.1% sodium docecyl sulfate solution (SDS, Sigma-Aldrich) for 30 minutes and the experiment were performed according to the protocol described in the kit. Optical density were measured in a 96-well plate at 590 nm wavelength in a spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA), and the absorbance readouts were normalized by the number of viable cells at the respective culture period.

For AR evaluation, cells were fixed with 10% paraformaldehyde solution (Sigma-Aldrich), washed with distilled water and stained with AR 2% - pH 4.2 (Sigma-Aldrich). The wells were photographed (Canon EOS-1D; Canon Inc, Tokyo, Japan) for qualitative analysis of mineralized nodules formation. For quantitative analysis by absorbance evaluation, the nodules were solubilized with 10% cetylpyridinium chloride (Sigma-Aldrich) for 15 min, and the optical density was measured in a 96-well plate at 562 nm wavelength in a spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific Inc.).

In vivo biactivity assay

At *in vivo* assay, the experimental sealer α -TCP was compared to AHP in rats' femur bone. Eighteen male *Wistar* rats aged 18 weeks were used for the experiments, that were divided in three groups, according to the experimental periods: 30 and 90 days (n = 6/ group). The animals were anesthetized with 0.008 mL/100 g ketamine and 0.004 mL/100 g 2% xylazine hydrochloride (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP, Brazil).

Trichotomy of the right leg was made, followed by disinfection with an alcohol-iodine solution. Linear cutaneous and muscular incisions were performed with a 15-knife scalpel blade, tissues were separated by layers and the periosteum was incised with a scalpel. Three 6-mm-diameter cavities were prepared on the

cortical surface of the femur, 5 mm apart from each other, with a slow-rotation number 6 bur under constant irrigation with saline solution. Surgical cavities were randomly divided according to the groups: AH Plus, α -TCP and control (empty cavity - CT). The incisions were closed in layers (Vicryl Ethicon, Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda, São José dos Campos, SP, Brazil) and 50 mg/kg of an opioid analgesic (Tramal, Pfizer Indústria Farmacêutica, Guarulhos, SP, Brazil) was injected intramuscularly.

At the end of each experimental period, the animals were euthanized by anesthetic overdose with 120 mL/kg pentobarbital (Syntec do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brazil). The operated leg was disarticulated and dissected to isolate the femur, and with a slow-rotation diamond disc the bone was transversally sectioned to separate the surgical cavities. Tissue specimens were fixed in 10% formalin solution for 24 h, decalcified using Anna Morse solution (20% sodium citrate + 50% formic acid), embedded in paraffin and 3-mm-thick sections were obtained and stained with hematoxylin and eosin. Three blinded and calibrated examiners ($\kappa = 0.79$) analyzed the slices under a light microscope (Olympus BX41– Olympus America Inc., Melville, NY, EUA), using 40 and 100x magnification. The samples were photographed (Canon EOS-1D; Canon Inc, Tokyo, Japan), and hard tissue deposition were analyzed by the software ImageJ. The area of the wound (100%) and the new formatted bone were measured and calculated to obtain the percentage of bone deposition according to periods.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using ANOVA and Tukey's *post hoc* for *in vitro* assays and Kruskal-Wallis test and Dunn's *post hoc* for *in vivo* assay, both with 5% significance level.

RESULTS

In vitro bioactivity assays

The results are summarized in Figure 2.

ALP enzyme activity assay (A) demonstrated the increase at the enzyme activity from the 1 day to the 5 days evaluation to all groups ($P < 0.05$). At 1 day, α -TCP was different from CT ($P < 0.05$) and similar to the other sealers ($P > 0.05$). At 5 days, AHP was different from the other groups, presenting the lowest values ($P < 0.05$). At 10 days, α -TCP presented the higher enzyme activity outcomes, differing from the other groups ($P < 0.05$), that were similar to each other ($P > 0.05$). At 15 days, α -TCP presented higher values when compared to AHP ($P < 0.05$), but no statistical differences were found between these sealers and the groups HAp and CT ($P > 0.05$).

Alizarin Red staining (B) showed a statistical significant increase in the deposition of mineralized nodules for all evaluated sealers and CT after 5 days ($P < 0.05$). At 1 day, no statistical differences were found between the groups ($P > 0.05$). At 5 days, α -TCP and HAp were similar to each other and to CT ($P > 0.05$), differing from AHP ($P < 0.05$). At 10 and 15 days, α -TCP presented the highest values, being similar to CT ($P > 0.05$) and different from the other sealers ($P < 0.05$); AHP presented the lowest value of mineralized nodules deposition ($P < 0.05$).

In vivo bioactivity assay

The results are summarized in Figure 3. At *in vivo* assay, none of the groups presented the total close of bone cavities at 90 days period. The bone deposition increased from 30 days to 90 days period for α -TCP and CT ($P < 0.05$). CT presented the highest bone deposition levels at the 30 days ($P < 0.05$), while α -TCP and AHP presented not statistical different results ($P > 0.05$). At 90 days, α -TCP and CT showed similar results ($P > 0.05$), differing from AHP ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Literature reports high levels of cytotoxicity promoted by methacrylate-based sealers (14). Although, the experimental methacrylate-based sealers evaluated in this study presented good bioactivity rates, associated with mineral deposition *in vivo*. These results might be related with the high degree of conversion presented in the experimental sealers (13), differing from the conventional methacrylate sealers that, due to the high amounts of monomers that could leach from the bulk of polymer and diffuse to the tissue, demonstrating toxicity (15).

The addition of calcium phosphate to endodontic sealers aims to develop a bioactive material to improve the complete regeneration of the damaged apical periodontal attachment apparatus and surrounding bone; associated with the ability to set in wet conditions (4). Studies has shown high bioactivity of α -tricalcium phosphate (α -TCP), associated with good biocompatibility (16,17).

In vitro methodologies presented in this study are commonly used to assess bioactivity of dental materials in different cell lines. ALP enzyme activity and AR assays demonstrated the increase at the enzyme activity and mineralized nodules deposition, respectively, according to the periods. The sealers showed similar outcomes at the first period in both assays, but at the following periods, AHP presented lower values when compared to α -TCP and HAp ($P < 0.05$). When the two experimental sealers were compared, α -TCP presented higher ALP activity and mineralized nodules formation at 10 days when compared to HAp ($P < 0.05$); and this sealer also showed higher results for AR at 15 days ($P < 0.05$). It is well know that hydroxyapatite presents less solubility than tricalcium phosphates (18), thus contributing for the lower outcomes of this compound found in this study. α -TCP is designed to be degraded and substituted by bone, justifying it's high hydrolysis (19). In addition, this property can be associated to the liberation of calcium and phosphate ions from the experimental sealers, since they can act on cellular metabolism, stimulating proliferation, differentiation, and inducing mineralization *in vitro* (5,20).

Due to the favorable outcomes of α -TCP at *in vitro* assays, this sealer was chosen to perform the *in vivo* methodology, that aimed to simulate overflow of the endodontic sealers to the periapical region, getting in contact with the osseous tissue from this area; the formation of hard tissue barrier in order to close the cavity access is related to healing and regeneration of the bone tissue. The results demonstrated bone deposition at both periods, with the highest percentages at the 90 days period for CT and α -TCP being different to AHP ($P < 0.05$). The presence of calcium phosphate on the experimental sealer composition, that present high alkalinity inducing the formation of bone matrix compounds such as apatite, dicalcium phosphate dehydrate and octacalcium phosphate (21,22) explaining the results.

Moreover, calcium phosphates present high osteoconductivity, which is indicated by the increase in ALP enzyme activity, enhance of osteoblasts' activity, deposition of mineralized tissue and accelerated bone formation (23); besides, α -TCP is a resorbable compound that can be completely substituted by bone tissue after the mineralization stimuli (24). Studies evaluating this bioceramic demonstrate its potential in increasing several osteogenesis-related genes, such as bone morphogenetic proteins (25), RUNX2, a transcription factor associated with osteogenesis, alkaline phosphatase and collagen type I (20). The bioactivity of calcium phosphates was observed in this study, proving that the association of these compounds it is not modified by the presence of methacrylate resin in experimental sealers.

In conclusion, the association of calcium phosphates to methacrylate-based sealers demonstrated bioactivity *in vitro* and mineralized tissue deposition *in vivo*.

REFERENCES

1. Forough Reyhani M, Ghasemi N, Rahimi S, Salem Milani A, Mokhtari H, Shakouie S, Safarvand H. Push-Out Bond Strength of Dorifill, EpipHApy and MTA-Fillapex Sealers to Root Canal Dentin with and without Smear Layer. *Iran Endod J.* 2014;9(4):246–50.
2. Jacob GM, Kumar A, Varughese JM, Varghese NO, Varma PR, Komath M. Periapical tissue reaction to calcium phosphate root canal sealer in porcine model. *Indian J Dent Res.* 2014 Jan-Feb;25(1):22-7.
3. Sun H, Yang HL. Calcium phosphate scaffolds combined with bone morphogenetic proteins or mesenchymal stem cells in bone tissue engineering. *Chin Med J (Engl).* 2015 Apr 20;128(8):1121-7.
4. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.* 2015 Apr;31(4):351-70.
5. Barrère F, van der Valk CM, Dalmeijer RA, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K, Layrolle P. Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Sep 15;66(4):779-88.
6. Wong JG, Caputo AA, Li P, White SN. Microleakage of adhesive resinous materials in root canals. *J Conserv Dent.* 2013 May;16(3):213-8.
7. Ashraf H, Moradimajd N, Mozayeni MA, Dianat O, Mahjour F, Yadegari Z. Cytotoxicity evaluation of three resin-based sealers on an L929 cell line. *Dent Res J (IsfaHAp).* 2012 Sep;9(5):549-53.
8. Konjhodzic-Prcic A, Jakupovic S, Hasic-Brankovic L, Vukovic A. In vitro comparison of cytotoxicity of four root canal sealers on human gingival fibroblasts. *Med Arch.* 2015 Feb;69(1):24-7.
9. Silva EJ, Santos CC, Zaia AA. Long-term cytotoxic effects of contemporary root canal sealers. *J Appl Oral Sci.* 2013 Jan-Feb;21(1):43-7.
10. Scarparo RK, Grecca FS, Fachin EV. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. *J Endod.* 2009 Feb;35(2):229-32.

11. Rossato TCA, Gallas JA, da Rosa WLO, da Silva AF, Piva E, Peralta SL, Lund RG. Experimental Sealers Containing Metal Methacrylates: Physical and Biological Properties. *J Endod.* 2017 Oct;43(10):1725-9.
12. Leitune VC, Collares FM, Trommer RM, Andrioli DG, Bergmann CP, Samuel SM. The addition of nanostructured hydroxyapatite to an experimental adhesive resin. *J Dent.* 2013 Apr;41(4):321-7.
13. Collares FM, Leitune VCB, Portella FF, Santos PD, Balbinot GS, Dos Santos LA, Parolo CCF, Samuel SMW. Methacrylate-based root canal sealer containing chlorhexidine and α -tricalcium phosphate *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017 [Epub ahead of print].
14. Ames JM, Loushine RJ, Babb BR, Bryan TE, Lockwood PE, Sui M, Roberts S, Weller RN, Pashley DH, Tay FR. Contemporary methacrylate resin-based root canal sealers exhibit different degrees of ex vivo cytotoxicity when cured in their self-cured mode. *J Endod.* 2009 Feb;35(2):225-8.
15. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater.* 2006 Mar;22(3):211-22.
16. Machado CP, Sartoretto SC, Alves AT, Lima IB, Rossi AM, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD. Histomorphometric evaluation of strontium-containing nanostructured hydroxyapatite as bone substitute in sheep. *Braz Oral Res.* 2016;30(1):e45.
17. Varalakshmi PR, Kavitha M, Govindan R, NarasimHAp S. Effect of statins with α -tricalcium phosphate on proliferation, differentiation, and mineralization of human dental pulp cells. *J Endod.* 2013 Jun;39(6):806-12.
18. Padilla S, Román J, Sánchez-Salcedo S, Vallet-Regí M. Hydroxyapatite/SiO(2)-CaO-P(2)O(5) glass materials: in vitro bioactivity and biocompatibility. *Acta Biomater.* 2006 May;2(3):331-42.
19. Lee JB, Park SJ, Kim HH, Kwon YS, Lee KW, Min KS. Physical properties and biological/odontogenic effects of an experimentally developed fast-setting α -tricalcium phosphate-based pulp capping material. *BMC Oral Health.* 2014 Jul 11;14:87.
20. Liu J, Zhao L, Ni L, Qiao C, Li D, Sun H, ZHApG Z. The effect of synthetic α -tricalcium phosphate on osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells. *Am J Transl Res.* 2015 Sep 15;7(9):1588-601.

21. Markovic M, Chow LC. An octacalcium phosphate forming cement. *J Res Natl Inst Stand Technol* 2010; 115: 257-265.
22. Suzuki Y, Hayashi M, Yasukawa T, Kobayashi H, Makino K, Hirano Y, Takagi S, Chow LC, Ogiso B. Development of a novel fluorapatite-forming calcium phosphate cement with calcium silicate: in vitro and in vivo characteristics. *Dent Mater J.* 2015;34(2):263-9.
23. Sugawara A, Fujikawa K, Takagi S, Chow LC. Histological analysis of calcium phosphate bone grafts for surgically created periodontal bone defects in dogs. *Dent Mater J.* 2008 Nov;27(6):787-94.
24. Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J Biomater Appl.* 2008;23(3):197–212
25. Vamze J, Pilmane M, Skagers A. Biocompatibility of pure and mixed hydroxyapatite and α -tricalcium phosphate implanted in rabbit bone. *J Mater Sci Mater Med.* 2015 Feb;26(2):73.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1) Immunophenotyping of stem cells from apical papilla (SCAPs) by flow cytometry assay after four cell passages. Expression of STRO1, CD146 and CD44 molecular markers.

Figure 2) Alkaline phosphatase enzyme activity (A), mineralized nodule formation quantification by Alizarin Red dye (B) and illustrative images of mineralized nodule formation by Alizarin Red dye (C) in stem cells from apical papilla (SCAPs) after treatment with experimental sealers (α -TCP and HAp) and AH Plus at different periods. Different lowercase letters represent statistical difference between the groups at the same period. Different capital letters represent statistical difference between the periods at the same group.

Figure 3) A) Bone deposition (%) in rats' femur after treatment with AH Plus and experimental sealer (α -TCP) at 30 and 90 days. Different lowercase letters represent statistical difference between the groups at the same period. Different capital letters represent statistical difference between the periods at the same group. B) Illustrative images of bone deposition for AH Plus (AHP), α -TCP and control group (CT) after 30 days, the cortical bone of the sample is represented with a letter b.

FIGURES

Figure 1)

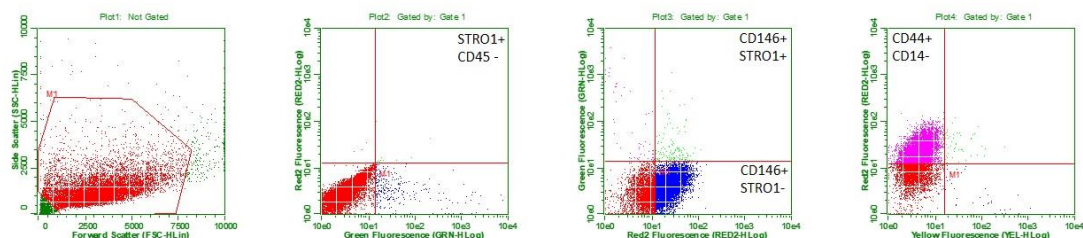


Figure 2)

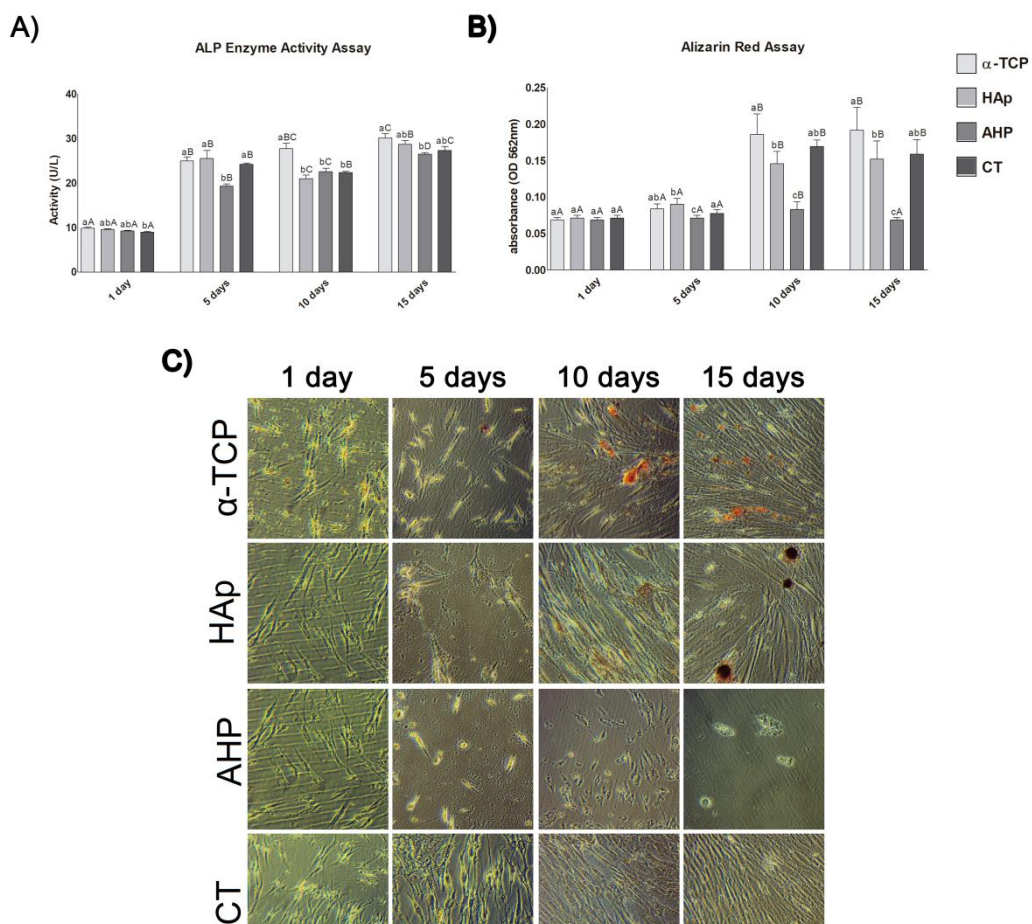
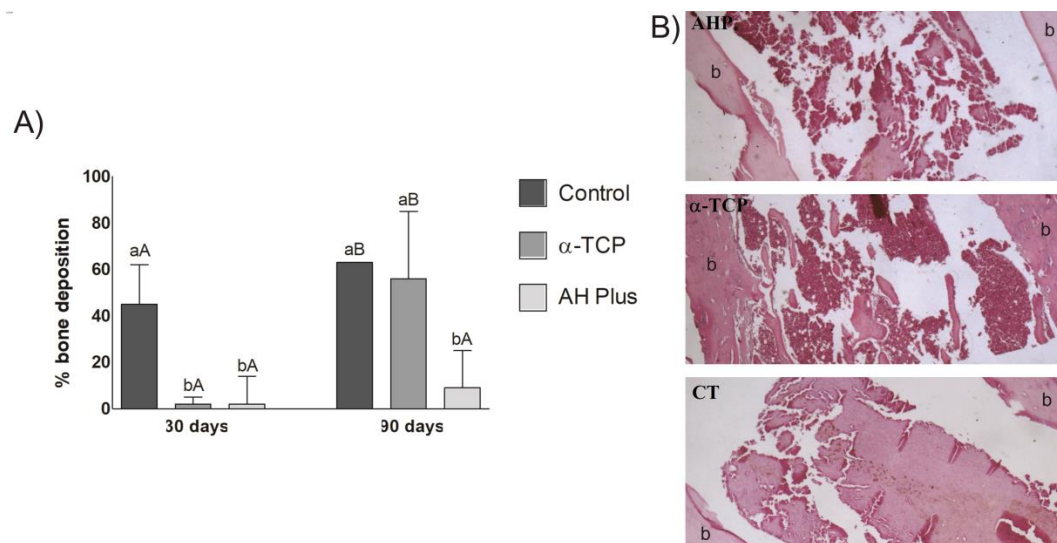


Figure 3)



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novos cimentos endodônticos para obturação do SCR estão sendo desenvolvidos almejando um material com boas propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas. A associação de um cimento experimental à base de resina metacrilato a fosfatos de cálcio e o radiopacificador fluoreto de itérbio tem como propósito a elaboração de um material que apresente boas propriedades físico-químicas associadas à biocompatibilidade e bioatividade. Este trabalho objetivou a avaliação das propriedades biológicas desta associação, *in vitro* e *in vivo*.

No Artigo 1, a biocompatibilidade de dois cimentos experimentais, elaborados pela associação do polímero metacrilato aos compostos de fosfato de cálcio α -tricálcio fosfato (α -TCP) ou hidroxiapatita nanoparticulada (HAp), foi avaliada e comparada à resposta promovida pelo cimento endodôntico AH Plus (AHP). No Artigo 2, os mesmos materiais foram avaliados quanto a sua bioatividade e potencial de deposição de tecido mineralizado.

Para as metodologias *in vitro*, células-tronco da papila apical (SCAPs) foram escolhidas devido ao seu elevado potencial de proliferação e diferenciação, representando uma população de células progenitoras, associadas à formação radicular (HUANG et al., 2008). Neste estudo, SCAPs foram isoladas de um dente com formação radicular incompleta, e submetidas à análise em citometria de fluxo para verificação do seu potencial de diferenciação em células mesenquimais (HASS et al., 2011). Além disso, as metodologias utilizadas são comumente empregadas para avaliação da citotoxicidade e bioatividade de materiais (REIS et al., 2016).

Em relação aos resultados *in vitro*, no Artigo 1 observou-se boa viabilidade para os cimentos experimentais α -TCP e HAp em ambos os ensaios realizados. Esses resultados sugerem que a associação de fosfatos de cálcio à um polímero pode diminuir os efeitos tóxicos do mesmo, corroborando com estudo de Khashaba *et al.* (2009), que também avaliou esta associação. No Artigo 2, os ensaios de bioatividade demonstraram aumento na atividade da enzima fosfatase

alcalina (ALP), associada à osteogênese e odontogênese, em todos os grupos no decorrer dos períodos experimentais, bem como aumento na deposição de conteúdo mineralizado na cultura celular. O α -TCP apresentou maiores valores de atividade da enzima ALP e deposição de nódulos mineralizados nos períodos de 10 e 15 dias, o que justificou a escolha deste cimento para avaliação da deposição mineral *in vivo*.

O uso de ratos como modelo experimental *in vivo* é viável devido ao seu rápido metabolismo (MORETTON et al., 2000), fácil manuseio e possibilidade de extrapolar os resultados em humanos, uma vez que nestes há uma resposta conjunta de todo organismo envolvido (SPÅNGBERG, 1978). Utilizando-se deste modelo para avaliação da resposta inflamatória (Artigo 1), observou-se a presença de células inflamatórias no tecido conjuntivo de ratos tanto para as associações da resina metacrilato com α -TCP e HAp quanto para o cimento AHP no período inicial de 7 dias. Entretanto, apenas o último evidenciou a presença de células-gigantes no infiltrado inflamatório e a presença de material adjacente ao tecido, o que já foi previamente descrito por diversos autores (SCARPARO et al., 2009; FARHAD et al., 2011; GRECCA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2011). Os bons resultados obtidos pelos cimentos experimentais também podem ser justificados pela composição da resina metacrilato utilizada na associação aos fosfatos de cálcio, que apresenta elevado grau de conversão (COLLARES et al., 2017), o que resulta em poucos monômeros residuais livres, diminuindo a difusão dos mesmos aos tecidos adjacentes e, como consequência, a toxicidade do material. (MASEREJIAN et al., 2012).

Ainda no modelo *in vivo*, o Artigo 2 propôs a avaliação da bioatividade promovida pelo cimento experimental α -TCP, observando a deposição óssea ao longo dos períodos avaliados, sendo comparado ao controle e diferindo do AHP, que demonstrou menor deposição de tecido mineralizado. O fato deste composto de fosfato de cálcio apresentar elevada solubilidade, liberando íons cálcio e fosfato no tecido (PRATI, GANDOLFI, 2015) leva à expressão de genes associados à osteogênese, aumentando a expressão da enzima fosfatase alcalina, a atividade osteoblástica e a deposição de tecido mineralizado

(SUGAWARA et al., 2008), acelerando o processo de reparo ósseo e caracterizando a osteoindução promovida por este material.

Por fim, conclui-se que a associação de fosfatos de cálcio a uma base de resina metacrilato apresenta bons resultados de biocompatibilidade e bioatividade *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar os bons resultados dessa associação e posteriormente, aprovar sua utilização como cimentos obturadores na prática clínica.

REFERÊNCIAS

- AMES, J.M. et al. Contemporary methacrylate resin-based root canal sealers exhibit different degrees of ex vivo cytotoxicity when cured in their self-cured mode. *J Endod.*, Nova York, v. 35, n. 2, p. 225-8, 2009.
- ANTONIJEVIC, D. et al. Addition of a fluoride-containing radiopacifier improves micromechanical and biological characteristics of modified calcium silicate cements. *J Endod.*, Nova York, v. 41, n. 12, p. 2050-7, 2015.
- ASGARY, S. et al. Scanning electron microscopy study of dental gutta-percha after cutting. *Iran Endod J.*, Irã, v. 1, n. 2, p. 57-9, 2006.
- ASHRAF, H. et al. Cytotoxicity evaluation of three resin-based sealers on an L929 cell line. *Dent Res J (Isfahan)*., Mumbai, v. 9, n. 5, p. 549-53, 2012.
- ASSMANN, E. et al. Evaluation of bone tissue response to a sealer containing mineral trioxide aggregate. *J Endod.*, Nova York, v. 41, n. 1, p. 62-6, 2015.
- AZAR, N.G. et al. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J Endod.*, Nova York, v. 26, n. 8, p. 462-5, 2000.
- BIN, C.V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod.*, Nova York, v. 38, n. 4, p. 495-500, 2012.
- BARTOLOMÉ, J.F. et al. In vitro and in vivo evaluation of a new zirconia/niobium biocermet for hard tissue replacement. *Biomaterials.*, Oxford, v. 76, p. 313-20, 2016.
- BOGEN, G.; KUTTLER, S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. *J Endod.* Nova York, v. 35, n. 6, p. 777-90, 2009.
- CAMILLERI J. Color stability of white mineral trioxide aggregate in contact with hypochlorite solution. *J Endod.*, Nova York, v. 40, n. 3, p. 436-40, 2014.
- CAMILLERI J. Tricalcium silicate cements with resins and alternative radiopacifiers. *J Endod.*, Nova York, v. 40, n. 2, p. 2030-5, 2014.

CAMILLERI, J. Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine Used for Pulpotomy Procedures. *J Endod.*, Nova York, v. 41, n. 7, p. 1139-45, 2015.

CAMILLERI, J. Will bioceramics be the future root canal filling materials? *Curr Oral Health Rep.*, Suíça, 2017 [Epub ahead of print].

CHISNOIU, R. et al. The influence of three endodontic sealers on bone healing: an experimental study. *Folia Morphol (Warsz.)*, Polônia, v. 75, n. 1, p. 14-20, 2016.

COLLARES, F.M. et al. Ytterbium trifluoride as a radiopaque agent for dental cements. *Int Endod J.*, Oxford, v. 43, n. 9, p. 792-7, 2010.

COLLARES, F.M. et al. Nanostructured hydroxyapatite as filler for methacrylate-based root canal sealers. *Int Endod J.*, Oxford, v. 45, n. 1, p. 63-7, 2012.

COLLARES, F.M. et al. Methacrylate-based root canal sealer containing chlorhexidine and α -tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, Hoboken, 2017 [Epub ahead of print].

DE SOUZA, M.O. et al. Physical-mechanical properties of Bis-EMA based root canal sealer with different fillers addition. *J Conserv Dent.*, Mumbai, v. 18, n. 3, p. 227-31, 2015.

DOMINGO, C. et al. Hydrolytic stability of experimental hydroxyapatite-filled dental composite materials. *Dent Mater.*, Oxford, v. 19, n. 6, p. 478-86, 2003.

DRYNDA, A. et al. Rare earth metals used in biodegradable magnesium-based stents do not interfere with proliferation of smooth muscle cells but do induce the upregulation of inflammatory genes. *J Biomed Mater Res A.*, Hoboken, v. 91, n. 2, p. 360-9, 2009.

FARHAD, A.R. et al. Histopathologic evaluation of subcutaneous tissue response to three endodontic sealers in rats. *J Oral Sci.*, Tóquio, v. 53, n. 1, p. 15-21, 2011.

FOROUGH REYHANI, M. et al. Push-Out Bond Strength of Dorifill, Epiphany and MTA-Fillapex Sealers to Root Canal Dentin with and without Smear Layer. *Iran Endod J.*, Irã, v. 9, n. 4, p. 246-50, 2014.

GANDOLFI, M.G. et al. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dent Mater.*, Oxford, v. 26, n. 10, p. 974-92, 2010.

GANDOLFI, M.G. et al. Alpha-TCP improves the apatite-formation ability of calcium-silicate hydraulic cement soaked in phosphate solutions *Mater Sci Eng.*, Libertyville, v. 31, n. 7, p. 1412-22, 2011.

GANDOLFI, M.G. et al. Calcium silicate/calcium phosphate biphasic cements for vital pulp therapy: chemical-physical properties and human pulp cells response. *Clin Oral Investig.*, Berlim, v. 19, n. 8, p. 2075-89, 2015.

GRECCA, F.S. et al. Biocompatibility of RealSeal, its primer and AH Plus implanted in subcutaneous connective tissue of rats. *J Appl Oral Sci.*, Bauru, v. 19, n. 1, p. 52-6, 2011.

HASS, R. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.*, Londres, v. 14, n. 9, p. 12, 2011.

HONG, Y.C. et al. The periapical tissue reactions to a calcium phosphate cement in the teeth of monkeys. *J Biomed Mater Res.*, Hoboken, v. 25, n. 4, p. 485-98, 1991.

HUANG, G.T. et al. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.*, Nova York, v. 34, n. 6, p. 645-51, 2008.

HOLLAND, R. et al. Influence of the type of vehicle and limit of obturation on apical and periapical tissue response in dogs' teeth after root canal filling with mineral trioxide aggregate. *J Endod.*, Nova York, v. 33, n. 6, p. 693-7, 2007.

JACOB, G.M. et al. Periapical tissue reaction to calcium phosphate root canal sealer in porcine model. *Indian J Dent Res.*, Mumbai, v. 25, n. 1, p. 22-7, 2014.

JOHNS, J.I.; O'DONNELL, J.N.; SKRTIC, D. Selected physicochemical properties of the experimental endodontic sealer. *J Mater Sci Mater Med.*, Hoboken, v. 21, n. 2, p. 797-805, 2010.

KHASHABA, R.M.; CHUTKAN, N.B.; BORKE, J.L. Comparative study of biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers on fibroblasts derived from primary human gingiva and a mouse L929 cell line. *Int Endod J.*, Oxford, v. 42, n. 8, p. 711-8, 2009.

KHASHABA, R.M. et al. The response of subcutaneous connective tissue to newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. *Int Endod J.*, Oxford, v. 44, n. 4, p. 342-52, 2011.

KONJHODZIC-PRCIC, A. et al. In vitro comparison of cytotoxicity of four root canal sealers on human gingival fibroblasts. *Med Arch.*, Sarajevo, Bosnia e Herzegovina, v. 69, n. 1, p. 24-7, 2015.

LEE, S.J. et al. Characteristics of novel root-end filling material using epoxy resin and Portland cement. *Clin Oral Investig.*, Berlim, v. 17, n. 3, p. 1009-15, 2013.

LEITUNE, V.C. et al. Niobium pentoxide as a new filler for methacrylate-based root canal sealers. *Int Endod J.*, Oxford, v. 46, n. 3, p. 205-10, 2012.

LEITUNE, V.C. et al. The addition of nanostructured hydroxyapatite to an experimental adhesive resin. *J Dent.*, Inglaterra, v. 41, n. 4, p. 321-7, 2013.

LEONARDO, M.R. et al. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol.*, Copenhagen, v. 15, n. 1, p.28-32, 1999.

LEYHAUSEN, G. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of the epoxy resin-based root canal sealer AH plus. *J Endod.*, Nova York, v. 25, n. 2, p. 109-13, 1999.

MASEREJIAN, N.N. et al. Dental composite restorations and psychosocial function in children. *Pediatrics.*, Springfield, v. 130, n. 2, p. e328-38, 2012.

MORETTON, T.R. et al. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res.*, Hoboken, v. 52, n. 3, p. 528-33, 2000.

OGATA, H. et al. Effects of a calcium phosphate cement on mineralized nodule formation compared with endodontic cements. *Dent Mater J.*, Tóquio, v. 3, n. 31, p. 92-7, 2012.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.*, Nova York, v. 36, n. 1, p. 16-27, 2010.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.*, Nova York, v. 36, n. 3, p. 400-13, 2010.

PORTELLA, F.F. et al. Synthesis and characterization of a glycerol salicylate resin for bioactive root canal sealers. *Int Endod J.*, Oxford, v. 47, n. 4, p. 339-45, 2014.

PORTELLA, F.F. et al. Glycerol salicylate-based containing α -tricalcium phosphate as a bioactive root canal sealer. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, Hoboken, v. 103, n. 8, p.1663-9, 2015.

PRATI, C.; GANDOLFI, M.G. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.*, Copenhagen, v. 31, n. 4, p. 351-70, 2015.

REIS, M.V. et al. Effect of different storage media on root dentine composition and viability of fibroblasts evaluated by several assay methods. *Int Endod J.*, Oxford, v. 50, n. 12, p. 1185-19, 2017.

ROSSATO, T.C.A. et al. Experimental sealers containing metal methacrylates: physical and biological properties. *J Endod.*, Nova York, v. 43, n. 10, p. 1725-9, 2017.

SALLES, L.P. et al. Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod.*, Nova York, v. 38, n. 7, p. 971-6, 2012.

SAURO, S. et al. Novel light-curable materials containing experimental bioactive micro-fillers remineralise mineral-depleted bonded-dentine interfaces. *J Biomater Sci Polym Ed.*, Inglaterra, v. 24, n. 8, p. 940-56, 2013.

SCARPARO, R.K.; GRECCA, F.S.; FACHIN, E.V. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. *J Endod.*, Nova York, v. 35, n. 2, p. 940-56, 2013.

SHON, W.J. et al. Effects of calcium phosphate endodontic sealers on the behavior of human periodontal ligament fibroblasts and MG63 osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, Hoboken, v. 100, n. 8, p. 2141-7, 2012.

SILVEIRA, C.M. et al. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J.*, Ribeirão Preto, v. 22, n. 1, p. 21-7, 2011.

SPÅNGBERG, L.S. Correlation of in vivo and in vitro screening tests. *J Endod.*, Nova York, v. 4, n. 10, p. 296-0, 1978.

SUN, H.; YANG, H.L. Calcium phosphate scaffolds combined with bone morphogenetic proteins or mesenchymal stem cells in bone tissue engineering. *Chin Med J (Engl)*, Pequim, v. 128, n. 8, p. 1121-7, 2015.

TORABINEJAD, M.; WHITE, D.J. Tooth filling material and method of use. *US Patent.*, Estados Unidos da América, v. 5, n. 415, p. 547, 1993.

TORABINEJAD, M.; PARIROKH, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.*, Nova York, v. 36, n. 2, p. 190-202, 2010.

VIOLA, N.V. et al. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, Hoboken, v. 100, n. 7, p. 1773-81, 2012.

VITTI, R.P. et al. Physical properties of MTA Fillapex sealer. *J Endod.*, Nova York, v. 39, n. 7, p. 915-8, 2013.

YALTIRIK, M. et al. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod.*, Nova York, v. 30, n. 2, p. 95-9, 2004.

ZMENER, O. et al. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod.*, Nova York, v. 38, n. 9, p. 1233-8, 2012.

ANEXOS

Anexo 1) Parecer do Comitê de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia

PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE PESQUISA

Parecer aprovado em reunião do dia 17 de outubro de 2014.

ATA nº 12/2014.

A Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul após análise aprovou o projeto abaixo citado com o seguinte parecer:

Resumo: O objetivo deste estudo será isolar e caracterizar células da polpa, do folículo e da papila dentária de terceiros molares humanos extraídos durante a fase de rizogênese incompleta e avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e bioatividade dos novos cimentos endodônticos a base de silicato de cálcio (MTA Plus e Biodentine) nas mesmas, comparando-os com cimentos tradicionalmente utilizados na prática clínica nos casos de obturação do sistema de canais radiculares e retrobturação. Após isolamento, as células das culturas primárias serão avaliadas quanto a presença de características imunofenotípicas e pluripotenciais que possam qualificar a presença de uma subpopulação de células-tronco pelos ensaios citometria de fluxo, PCR Real Time e diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Após a obtenção das culturas de células-tronco, os cimentos endodônticos serão divididos em 2 grupos: 1) análise dos cimentos obturadores (cimentos: MTA Plus, Biodentine, AH Plus, Fillapex e FillCanal); e 2) análise dos cimentos retrobturadores (cimentos: MTA Plus, Biodentine, MTA Branco, Sealer 26 e FillCanal), ambos utilizando células obtidas da papila dentária humana. Serão realizados ensaios para avaliação da citotoxicidade (MTT), viabilidade (Alamar Blue), genotoxicidade (Cometa), bioatividade (atividade da enzima fosfatase alcalina e coloração com Alizarin Red) e expressão de marcadores moleculares associados à osteogênese e odontogênese (PCR Real Time). Todos os resultados obtidos serão analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 5, sendo considerado o nível de significância de 5%.

O projeto possui mérito científico e está bem descrito. O parecer é pela aprovação. Os pesquisadores deverão registrar o projeto na Plataforma Brasil para posterior encaminhamento ao CEP UFRGS.

PROJETO: 27832 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E BIOATIVIDADE DE CULTURAS PRIMÁRIAS DO ÓRGÃO DENTÁRIO FRENTE A NOVOS MATERIAIS ENDODÔNTICOS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: FABIANA SOARES GRECCA VILELLA

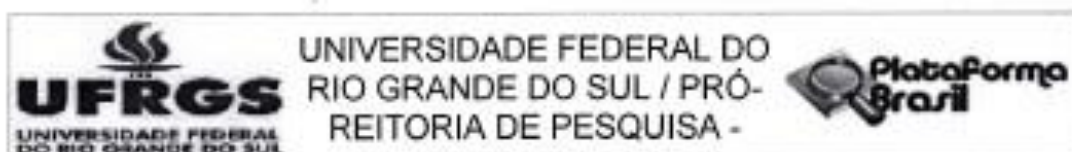
Porto Alegre, 22 de outubro de 2014.


Prof. Dra. Juliana Jobim Jardim

Coordenadora da

Comissão de Pesquisa ODONTOLOGIA UFRGS

Anexo 2) Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (página 1/3).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E BIOATIVIDADE DE CULTURAS PRIMÁRIAS DO ÓRGÃO DENTÁRIO FRENTE A NOVOS MATERIAIS ENDODÔNTICOS

Pesquisador: Fabiana Soares Grecca

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 38542614.6.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.112.948

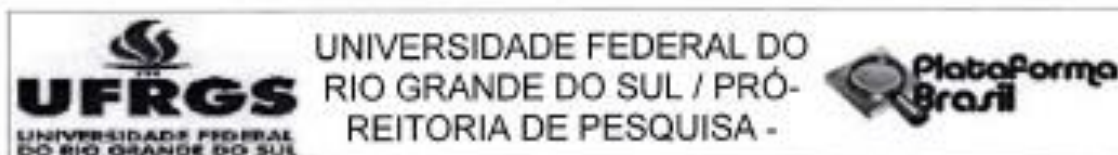
Data da Relatoria: 28/05/2015

Apresentação do Projeto:

Materiais a base de silicato de cálcio vêm sendo considerados materiais de escolha para o tratamento de perfurações, reabsorções, obturação retrógrada, proteção pulpar e, mais recentemente, para obturação do sistema de canais radiculares. Visto isso, novos cimentos a base de silicato de cálcio foram lançados no mercado, como o MTA Plus (Avalon Biomed Inc., Bradenton, FL, USA) e o Biodentine (Septodont, Lancaster, PA, USA). O objetivo deste estudo será isolar e caracterizar células da polpa, do folículo e da papila dentária de terceiros molares humanos extraídos durante a fase de rizogênese incompleta e avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e bioatividade dos novos cimentos endodônticos a base de silicato de cálcio (MTA Plus e Biodentine) nas mesmas, comparando-os com cimentos tradicionalmente utilizados na prática clínica nos casos de obturação do sistema de canais radiculares e retrobturação. Após isolamento, as células das culturas primárias serão avaliadas quanto a presença de características imunofenotípicas e pluripotenciais que possam qualificar a presença de uma subpopulação de células-tronco pelos ensaios citometria de fluxo, PCR Real Time e diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Após a obtenção das culturas de células-tronco, os cimentos endodônticos serão divididos em 2 grupos: 1) análise dos cimentos obturadores (cimentos: MTA Plus, Biodentine, AH, Plus, Filapex e FilCanal); e 2) análise dos cimentos retrobturadores (cimentos: MTA Plus,

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Fátima CEP: 91.045-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3326-3738 Fax: (51)3308-4065 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br

Anexo 2) Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (página 2/3).



Continuação do Parecer: 1.112.048

Biodontine, MTA Branco, Sealer 26 e FillCanal), ambos utilizando células obtidas da papila dentária humana. Serão realizados ensaios para avaliação da citotoxicidade (MTT), viabilidade (Alamar Blue), genotoxicidade (Cometa), bioatividade (atividade da enzima fosfatase alcalina e coloração com Alizarin Red) expressão de marcadores moleculares associados à osteogênese e odontogênese (PCR Real Time). Todos os resultados obtidos serão analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 5, sendo considerado o nível de significância de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Realizar ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade, bioatividade e expressão gênica de marcadores moleculares para avaliação de novos cimentos endodônticos in vitro em células-bronco obtidas do órgão dentário.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Estão descritos de forma completa e são válidos para a população do estudo nesta nova versão do projeto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo tem aprovação da Compesq Odontologia, e possui portanto mérito científico. A nova versão do projeto apresenta população elegível para o estudo entre 18 e 22 anos, o que atende questões éticas e metodológicas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória já estavam de acordo com a legislação.

Recomendações:

O presente projeto de pesquisa está em condições de aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pela aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

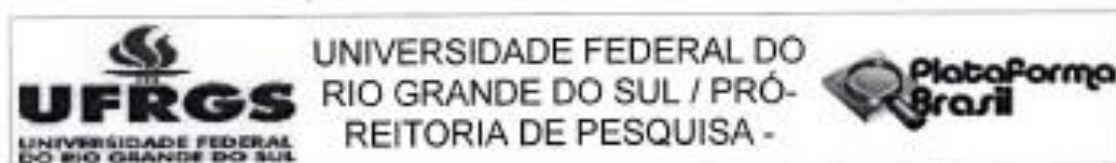
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
 Bairro: Fátima CEP: 90.040-060
 UF: RS Município: PORTO ALEGRE
 Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

Anexo 2) Parecer do Comitê de Ética de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (página 3/3).



Continuação do Parecer: 1.112.945

PORTO ALEGRE, 18 de Junho de 2015

Assinado por:

MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 91.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3306-4085 E-mail: etica@propeq.ufrgs.br

Anexo 3) Parecer do Comitê Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE CIÊNCIA

A Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto de pesquisa:

Número: 30466

TÍTULO: AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS EM CULTURA DE CÉLULAS TRIDIMENSIONAL

Pesquisador responsável: FABIANA SOARES GRECCA VILELLA

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA/UFRGS) está ciente que o presente estudo irá utilizar células de ratos 3T3 tridimensional. Serão manipulados os seguintes materiais: AH Plus (Dentsply, York, PA, USA), MTA Fillapex (Angelus S/A, Londrina, PR, Brazil) e BC Sealer (Endosequence, Brasseler, Savannah, GA, USA).

Porto Alegre, 02 de maio de 2016.

Marcelo Meller Alievi
Coordenador da CEUA/UFRGS