

CAROLINE PARDUCCI ARRUDA

**Biocompatibilidade de diferentes cimentos endodônticos biocerâmicos.
Análise de cultura de osteoblastos**

São Paulo

2023

CAROLINE PARDUCCI ARRUDA

Biocompatibilidade de diferentes cimentos endodônticos biocerâmicos.

Análise de cultura de osteoblastos

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez

São Paulo

2023

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Arruda, Caroline Parducci.

Biocompatibilidade de diferentes cimentos endodônticos biocerâmicos. Análise de cultura de osteoblastos / Caroline Parducci Arruda; orientador Victor Elias Arana-Chavez. -- São Paulo, 2023.

85 p. : tab., fig., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Biocompatibilidade. 2. Biocerâmico. 3. Osteoblasto. 4. Endodontia. 5. Microscopia eletrônica de varredura. I. Arana-Chavez, Victor Elias. II. Título.

Arruda CP. Biocompatibilidade de diferentes cimentos endodônticos biocerâmicos. Análise de cultura de osteoblastos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 04/07/2023

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marcelo dos Santos

Instituição: FO - USP. Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Andréia Aparecida Traina

Instituição: FO - USP. Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Lorraine Perciliano de Faria

Instituição: Externo Julgamento: Aprovado

Dedico este trabalho ao meu pai **Luiz Dionizio Arruda** (*in memoriam*) que me ofereceu apoio e conhecimento para me tornar a pessoa que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Professor Dr. Victor Elias Arana-Chavez** que participa desde o início da minha formação, como professor de graduação e posteriormente como professor orientador em iniciação científica, despertando meu interesse pela área acadêmica. Agradeço por acreditar no meu potencial, ter compartilhado seu conhecimento, me orientar em todas as etapas necessárias e sempre incentivar a me tornar cada vez melhor.

A todos os **meus familiares** que participaram direta ou indiretamente da minha formação, e forneceram apoio durante toda a minha vida, em especial a minha mãe **Lúcia** que sempre esteve ao meu lado.

A **FOUSP** por oferecer toda a estrutura necessária para minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos **professores do departamento** de Biomateriais e Biologia Oral, por todos os ensinamentos.

Ao professor **Edgard Michel Crosato** que compartilhou seus ensinamentos durante as disciplinas de pós-graduação, e ofereceu auxílio na etapa final de conclusão desta dissertação.

A **Elisângela Chinen**, e **Douglas Nasadal**, técnicos do Laboratório de Biologia Oral, que me ensinaram muito, sempre estiveram disponíveis e ofereceram suporte durante o decorrer deste trabalho.

"Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento".

Albert Einstein

RESUMO

Arruda CP. Biocompatibilidade de diferentes cimentos endodônticos biocerâmicos. Análise de cultura de osteoblastos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão Corrigida.

O material obturador pode ser um coadjuvante no processo reparador após o tratamento endodôntico, caso seja biocompatível e possua componentes que tenham estas propriedades. Os cimentos endodônticos biocerâmicos foram desenvolvidos a fim de manter as propriedades do cimento reparador MTA, porém com consistência fluída, permitindo o escoamento nos condutos radiculares acessórios e nos túbulos dentinários; usualmente possuem como componente principal o silicato de cálcio, mas existem diversas formulações comerciais, o que pode alterar a compatibilidade celular, efeitos biológicos e propriedades físicas. Assim sendo, este trabalho buscou investigar *in vitro* a biocompatibilidade de três diferentes cimentos endodônticos biocerâmicos a base de silicato de cálcio e óxido de zircônia e o cimento MTA em cultura de osteoblastos. Foi realizada cultura de osteoblastos da linhagem MC3T3-E1; as culturas foram divididas em grupos de acordo com os cimentos utilizados: BioC Sealer (G1), Endosequence (G2), BioC Sealer Ion (G3) e MTA (G4), além dos grupos controle de vida (CV) e controle de morte (CM). Os cimentos foram depositados no fundo das placas de cultura, e após a presa final as células foram depositadas e o meio difundido, realizando avaliações em tempos experimentais de 24, 48 e 72 horas. A análise de citotoxicidade direta pelo método do MTT foi realizada para determinar a viabilidade celular das amostras e a morfologia celular foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura. Todos os cimentos apresentaram biocompatibilidade e permitiram o crescimento celular, os grupos teste G1, G3 e G4 apresentaram maior crescimento celular e adesão celular a sua superfície, sendo o G3 aquele que apresentou maior crescimento e adesão celular, bem como maior índice de viabilidade celular.

Palavras-chave: Biocompatibilidade. Biocerâmico. Osteoblasto. Endodontia. Microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

Arruda CP. Biocompatibility of three bioceramic endodontic sealers. Analysis in osteoblast culture [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. *Versão Corrigida*.

The biocompatible endodontic sealer can aid the healing process after the endodontic treatment, and if the sealer has components that stimulate the bone cells, the direct contact or diffusion of those components to the periapical region may act in the osteoblast located in this area. The bioceramic sealers were developed with the aim to maintain the properties of MTA, but with more fluidity, allowing the material to fill the root canal areas. Bioceramic sealers usually have calcium silicate as their main component, but there are several commercial formulations, which can interfere on their biocompatibility, biological effects and their physical properties. Therefore, this *in vitro* study investigated the biocompatibility of three bioceramic sealers (hydraulic cements) with calcium silicate and zirconia oxide and MTA on osteoblast cell cultures. The culture of MC3T3-E1 osteoblasts was carried out according to the groups: BioC Sealer (G1), Endosequence (G2), BioC Sealer Ion (G3) and MTA (G4), control group (CV) and negative control (CM). The sealers were placed at the bottom of the culture plates, and after the final setting, the cells were added and the medium diffused. Evaluations at experimental times of 24, 48 and 72 hours were performed. Direct cytotoxicity analysis by the MTT method was performed to determine the sample cell viability. In addition, the cell morphology was evaluated by scanning electron microscopy. All sealers were biocompatible and allowed cell growth, the sealers in G1, G3 and G4 showed more cell growth and cell adhesion to their surface and the G3 sealer showed greater cell growth and adhesion, as well as a higher cell viability.

Keywords: Biocompatibility. Bioceramic. Hydraulic cements. Endodontics. Osteoblast.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 – Seringas de tuberculina com material teste transferido para seu interior e identificadas com a ordem numérica do respectivo grupo teste44
- Figura 4.2 –Placa de cultura de 96 poços. Observação dos poços de cultura contendo cimento endodôntico dos grupos teste em triplicata45
- Figura 4.3 – Demonstração da forma de colocação do material teste ao fundo dos poços de cultura das placas de 96 poços. (A) Material teste no fundo do poço de cultura. (B) desenho representativo do material teste no fundo do poço de cultura.....45
- Figura 4.4 – Placa de cultura de 24 poços. Observação das lamínulas circulares no fundo dos poços de cultura, com camada de cimento endodôntico no centro da lamínula.46
- Figura 4.5 – Demonstração da forma de colocação do material teste ao fundo dos poços de cultura das placas de 24 poços. (A) Material teste depositado acima da lamínula de vidro, no fundo do poço de cultura. (B) desenho representativo.46
- Figura 4.6 – Detalhe das lamínulas de vidro. (A) Lamínula de vidro após processo de fixação, sendo levada ao suporte de alumínio. (B) Lamínula de vidro fixada ao suporte de alumínio já metalizada com camada de ouro47
- Figura 5.1 – Microscopia eletrônica de varredura – Superfície do material dos grupos teste. MEV aumento de 1500X. (A) grupo G1, (B) grupo G2, (C) grupo G3 e (D) grupo G4. Escala 10 μ m.58

Figura 5.2 – Microscopia eletrônica de varredura– Osteoblastos aderidos a superfície do material dos grupos teste. MEV aumento de 1000X. (A) grupo G1, (B) grupo G2, (C) grupo G3 e (D) grupo G4. Escala 10µm. 59

Figura 5.3 – Microscopia eletrônica de varredura –Osteoblastos aderidos a superfície do material dos grupos teste. Observação dos prolongamentos celulares estabelecendo contatos intercelulares (setas). MEV aumento de 1000X. (A) grupo G1, (B) grupo G3, (C) grupo G4. Escala 10µm. 60

Figura 5.4 – Microscopia eletrônica de varredura – Osteoblastos aderidos a lamínula de vidro, região da periferia dos materiais dos grupos teste. MEV aumento de 250X. (A) grupo G1, (B) grupo G2, (C) grupo G3 e (D) grupo G4. Escala 100µm. 61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 – Gráfico de barras - Viabilidade celular para os diferentes tempos experimentais.....	52
Gráfico 5.2 – Gráfico de barras - Viabilidade celular para os diferentes grupos.....	54
Gráfico 5.3 – Gráfico de barras - Comparação entre viabilidade celular dos diferentes grupos entre diferentes tempos experimentais	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – ANOVA dois fatores – Viabilidade celular e tempos experimentais.....	51
Tabela 5.2 – Post-Hoc - Comparação da viabilidade celular entre os diferentes tempos experimentais	52
Tabela 5.3 – Post-Hoc – Comparação da viabilidade celular entre os grupos	53
Tabela 5.4 - Tabela 5.4 – Post-Hoc – Comparação da viabilidade celular entre os diferentes tempos experimentais e diferentes grupos	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB	controle branco
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CM	controle de morte
CO ₂	gás carbônico
CV	controle de vida
DMSO	dimetilsulfóxido
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
G	grupos
G1	grupo teste 1
G2	grupo teste 2
G3	grupo teste 3
G4	grupo teste 4
HMDS	hexametildisizilano
LBO	Laboratório de Biologia Oral
MEM	minimum essential medium
MEV	microscópio eletrônico de varredura
MTA	agregado trióxido mineral
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio
O ₂	gás oxigênio
PBS	tampão fosfato salino
pH	potencial de hidrogênio
SDH	enzima succinato desidrogenase
SiO ₂	dióxido de silício
T	tempo experimental

LISTA DE SÍMBOLOS

®	marca registrada
%	porcentagem
°C	graus Celsius
α	alfa
10^n	expoente de potência na base 10
cm^3	centímetros cúbicos
μl	microlitro
mg	miligrama
ml	mililitro
M	concentração molar
nm	nanômetro
k	quilo
VA	voltampere
>	maior
=	igual
<	menor
X	sinal de multiplicação (aumento)
μm	micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	31
3	PROPOSIÇÃO	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5	RESULTADOS	49
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXOS.....	83

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo está em constante remodelação, processo fisiológico que envolve a atividade de células responsáveis pela reabsorção óssea, os osteoclastos, e células envolvidas na síntese e mineralização da matriz óssea, osteoblastos (1). Algumas patologias dentais levam a perda do osso alveolar, quando ocorre uma patologia pulpar, devido a estrita comunicação com o forame apical, a perda óssea ocorre na região periapical.

As patologias pulpares necessitam de intervenção, sendo então realizado o tratamento endodôntico, que tem por finalidade remover o tecido pulpar alterado através da modelagem e desinfecção do sistema de canais radiculares, seguido da colocação de um material de selamento que irá prevenir futuras contaminações (2).

Quando o tratamento é realizado de forma compatível com a cura, o osso alveolar reabsorvido na região periapical tem condições de se regenerar. Devido a alta complexidade do sistema de canais radiculares, técnica de limpeza e modelagem utilizadas, ampliação foraminal e agitação ultrassônica, pode ocorrer o extravasamento de material obturador, levando ao contato direto, ou então difusão de seus componentes aos tecidos perirradiculares, justificando a necessidade da utilização de cimentos obturadores biocompatíveis (3, 4, 5).

A fim de estimular e auxiliar o reparo do osso alveolar, em 1995 Torabinejad (6) descreveu o agregado trióxido mineral (MTA), que ainda é o material de escolha para tratamentos radiculares e cirurgias apicais. Este material permite selamento com as paredes dentinárias, apresenta propriedades biológicas que favorecem o crescimento de osteoblastos e possui potencial indutor de calcificação (7, 8, 9, 10).

Apesar de apresentar excelentes propriedades o MTA não pode ser utilizado como um cimento obturador por apresentar alta viscosidade e por sua difícil manipulação e inserção nos canais radiculares (6). Foi então, desenvolvida uma nova classe de cimentos endodônticos, conhecidos como biocerâmicos ou *hydraulic cements*, com a finalidade de manter as propriedades biológicas do MTA, porém com consistência fluída, permitindo o escoamento nos condutos radiculares e túbulos dentinários (11, 12).

Os materiais considerados como biocerâmicos possuem grande utilização dentro da medicina atual e são definidos como materiais compostos por cerâmicas, produzidas através de variados processos químicos. Usualmente possuem em sua composição alumina, zircônia, vidro bioativo, cerâmica de vidro, hidroxiapatita e fosfato de cálcio (13, 14, 15). São utilizados para reparar danos em tecido ósseo, podendo ou não, ter interação com tecidos adjacentes (16, 17, 18, 19, 20, 21, 22).

Estudos prévios que avaliaram cimentos experimentais a base de silicato de cálcio, concluíram que estes materiais são passíveis de utilização como cimentos obturadores (23, 24). No que diz respeito a biocompatibilidade, foi recomendada a realização de estudos com células do tecido ósseo a fim de compreender a reação deste tipo celular com os cimentos obturadores biocerâmicos (25).

Apesar dos cimentos biocerâmicos possuírem como componente principal o silicato de cálcio, existem diversas formulações comerciais com diferentes composições, podendo alterar a compatibilidade celular, efeitos biológicos e propriedades físicas. Assim sendo, este trabalho buscou investigar a biocompatibilidade *in vitro* de três diferentes cimentos endodônticos obturadores biocerâmicos a base de silicato de cálcio e óxido de zircônia em cultura de osteoblastos, em comparação com o cimento reparador MTA.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O tratamento endodôntico é realizado com finalidade de remover o tecido pulpar doente através da modelagem e desinfecção do sistema de canais radiculares, seguido da colocação de um material de selamento que irá prevenir futuras contaminações, permitindo manter ou restaurar a integridade apical (2). O tratamento se divide em etapas, sendo todas fundamentais, tanto do ponto de vista mecânico quanto biológico, sendo a obturação a etapa final do tratamento, na qual é feito o preenchimento intrarradicular com o material obturador.

A obturação tem como objetivo principal a manutenção da limpeza e desinfecção realizadas durante as etapas anteriores, preenchendo o espaço intrarradicular e impedindo que microrganismos ou seus subprodutos metabólicos alcancem a região periapical, o que causaria ou permitiria a manutenção da doença (26).

Como demonstrado (27) a persistência microbiana no interior dos canais radiculares pode levar a manutenção da periodontite apical, por este motivo o tratamento endodôntico deve reduzir significativamente o número de microrganismos através dos agentes químicos e preparo mecânico, por fim promover o selamento adequado, mantendo a possível contaminação intrarradicular a nível subcrítico compatível com a cura, e por este motivo a massa obturadora deve promover boa vedação e preenchimento do sistema de canais radiculares da forma mais completa possível (26, 27, 28).

Os materiais obturadores são divididos em duas categorias, os sólidos (cones de guta percha), e os cimentos endodônticos. O cone de guta percha irá preencher o maior volume do canal radicular enquanto o cimento, através de sua baixa viscosidade, irá promover a adesão do material sólido as paredes radiculares e preencher os espaços remanescentes, eventualmente preenchendo canais acessórios, podendo estravasas a região apical (3, 5, 29).

As propriedades ideais do cimento obturador são descritas (29, 30) devendo ser pegajoso a fim de promover boa adesão as paredes do canal radicular, promover selamento hermético, não apresentar contração após a presa final, não ser solúvel a fluidos tissulares, ter estabilidade dimensional, ser radiopaco, não manchar as estruturas dentais, ter ação bactericida ou bacteriostática, ter tempo de presa lento,

ser biocompatível e ser passível de remoção. Até o momento, nenhum cimento obturador atendeu a todos os requisitos de material ideal, desta forma a utilização acaba sendo baseada na necessidade clínica e propriedades do cimento de escolha.

Biocompatibilidade é a capacidade de um material medicinal de atuar em um tecido ou organismo vivo através de uma reação biológica favorável em determinada aplicação clínica (de acordo com a ISO 10993). A avaliação da resposta biológica a este determinado material medicinal é uma abordagem prática para assegurar que este não interfira negativamente ao organismo ou tecido vivo (13, 14, 15)

Materiais bioinertes são aqueles que entram em contato direto com tecidos vivos e não causam reação entre material e células as células do tecido. Já os materiais bioativos são aqueles que possuem a capacidade de promover reações que favorecem o desenvolvimento, quando em contato com tecidos vivos, tais como fixação de implantes osseointegrados, regeneração de tecidos ou biodegradação do material (13, 14, 15)

Os cimentos endodônticos são comumente divididos de acordo com sua composição química: cimentos à base de hidróxido de cálcio, cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, cimentos à base de ionômero de vidro, cimentos resinosos, cimentos a base de MTA e cimentos biocerâmicos.

Cimentos à base de hidróxido de cálcio foram desenvolvidos a fim de manter as propriedades biológicas do hidróxido de cálcio como a biocompatibilidade, a atividade antimicrobiana e o potencial osteoindutor. Porém, durante a reação química de presa, ocorre dissociação do hidróxido de cálcio em íons cálcio e íons hidroxila, solubilidade que não permite uma adesividade as paredes do canal radicular, e nem o vedamento necessário, além de não possuir estabilidade dimensional. Apesar de seus efeitos biológicos favoráveis, possuem pequena toxicidade tornando sua ação antimicrobiana questionável (31, 32, 33).

Introduzidos por Grossman, os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol são cimentos compostos por um pó à base de óxido de zinco que é misturado com eugenol. Possuem propriedades adequadas, tais como alto tempo de trabalho e boa ação antimicrobiana. Durante a reação de presa são formados cristais ocasionando a presença de eugenol livre até que se obtenha a presa final (29, 30, 33). A presença de eugenol é responsável pela alta citotoxicidade deste material, tornando-os irritantes aos tecidos periapicais, o que é desfavorável em relação a biocompatibilidade. Os mecanismos de citotoxicidade do eugenol avaliados (34) em cultura de osteoblastos

observou que a presença de eugenol inibe o crescimento e a proliferação celular, sendo um potencial agente tóxico quando em contato com a região perirradicular.

Cimentos à base de ionômero de vidro foram introduzidos na odontologia (35) pela vantagem de sua composição química permitir alta adesividade a dentina, e conseqüentemente alta capacidade de selamento (36). Possuem alta viscosidade e tempo de presa curto o que acaba dificultando sua manipulação, além disso, sua alta dureza e o fato de serem insolúveis a solventes de guta-percha tornam sua remoção muito difícil (37).

Desenvolvidos para melhorar as propriedades de adesão as paredes radiculares, os cimentos endodônticos resinosos permitiram um melhor vedamento do espaço intrarradicular, apresentam boas características de manipulação e tempo de presa além de possuírem excelente estabilidade dimensional. Sua composição torna o material altamente prejudicial aos tecidos periapicais, e por sua natureza química, não são passíveis de reabsorção em casos de extravasamento nas regiões perirradiculares (33). Em avaliação de citotoxicidade *ex vivo*, em cultura de fibroblastos (18) concluem que o cimento resinoso AH Plus foi significativamente mais prejudicial as células se comparado ao MTA.

Em busca das propriedades de um cimento ideal, surgiram os cimentos obturadores à base de MTA, já que este apresenta alta biocompatibilidade, potencial indutor de mineralização e excelente vedamento (6, 7). Os cimentos desta categoria foram formulados com componentes resinosos adicionados a componentes do MTA, o que acarretou em resultados biológicos desfavoráveis, por apresentar citotoxicidade superior aos cimentos resinosos.

Em um estudo *in vitro*, com finalidade de avaliar a resposta celular a cimentos resinosos (38) observaram que estes cimentos aumentaram o índice de apoptose, o estresse oxidativo além do aumento de marcadores celulares para citotoxicidade. Neste mesmo estudo o cimento a base de MTA se mostrou mais danoso, sendo indutor de estresse oxidativo e aumentando a expressão de genes associados a danos ao material genético das células em cultura.

Com resultados desfavoráveis dos cimentos a base de MTA, com o avanço da tecnologia dos materiais e da nanotecnologia (15) surgiram os cimentos biocerâmicos com a intenção de manter as propriedades biológicas do MTA, que são classificados com biomateriais (13).

Os biomateriais foram inicialmente definidos como sendo materiais que entram em contato com sistemas biológicos, humano ou animal, com a finalidade de realizar uma função desejada através de suas propriedades, podendo ser composto por diversos materiais, apresentando-se nas formas sólida, líquida ou em gel (14).

Com o avanço tecnológico e conseqüentemente aumento de sua utilização, foram propostas novas definições com base na literatura (39), sendo portanto, o biomaterial um material sintético utilizado para repor parte de um organismo vivo ou ter a função em contato íntimo com tecidos vivos; substância inerte designada para implantação ou incorporação de sistemas vivos; material de origem natural ou sintética que entra em contato com tecidos, sangue e fluídos biológicos utilizado com finalidade protética, diagnóstica ou terapêutica sem afetar negativamente o organismo vivo e seus componentes; qualquer substância ou combinação de substâncias sintética e natural que pode ser utilizada por qualquer período de tempo como parte do sistema vivo, com finalidade de tratamento ou reposição de um órgão, tecido ou função.

Atualmente denominados como terceira geração, os biomateriais são classificados de acordo com sua origem, sendo: sintéticos (metais, polímeros, cerâmicas e compósitos), naturais (derivados de plantas, tecidos vivos ou animais) ou então semi-sintéticos (híbridos) (14). Os biocerâmicos são portanto, biomateriais sintéticos de origem cerâmica, que incluem zircônia, alumina, vidro bioativo, cerâmicas vítreas, hidroxiapatitas, fosfato de cálcio reabsorvível, entre outros. São compostos por estruturas policristalinas e podem ser bioinertes ou bioativos(13, 15). Na odontologia podem ser utilizados em sua forma rígida, por exemplo restaurações indiretas, em forma de pó, ou agregados a outros compostos, permitindo o preenchimento de defeitos ósseos, tratamentos de doenças dentais e também regeneração guiada (14, 15).

Na endodontia os materiais biocerâmicos se iniciaram com o MTA (6) que possui as vantagens de ser biocompatível, ter estabilidade dimensional, possuir efeito osteocondutor e induz resposta regenerativa no corpo humano (3, 6, 7). O MTA é um cimento endodôntico reparador, ou seja, material utilizado para tratamentos radiculares, comumente de extenso diâmetro, que necessitam de contato direto com tecidos perirradiculares ou pulpares, tais como: perfurações radiculares, retroobturação, apicificação, proteção pulpar direta, entre outros (44).

Os biocerâmicos podem ser classificados de acordo com composição: fosfato de cálcio, fosfato tricálcio, hidroxiapatita, silicato de cálcio ou mistura de silicato e fosfato de cálcio (15).

Os cimentos obturadores endodônticos classificados como biocerâmicos foram desenvolvidos recentemente com a evolução da nanotecnologia, permitindo a produção de materiais de baixa viscosidade com intuito de manter propriedades do MTA, tais como potencial indutor de mineralização e biocompatibilidade (40, 41). Estes cimentos são pastas de pronto uso, comercializadas em seringas pré-carregadas, prontas para inserção no canal radicular com tempo de trabalho aproximado em 30 minutos, e com presa iniciada pela umidade dos túbulos dentinários, sendo a presa inicial obtida dentro de 4 horas, e presa final após 24 horas (42, 43, 44, 45).

Em testes experimentais (23) com cimentos à base de tetrasilicato, derivados do cimento portland branco (MTA) foi demonstrado que este material suporta o crescimento de osteoblastos em cultura, afirmando que possuem propriedades para utilização como material obturador endodôntico. A resposta celular a diferentes cimentos endodônticos experimentais à base de silicato em quatro diferentes formulações foi avaliada *in vitro* (24), os osteoblastos em cultura apresentaram aderência aos materiais, e em conclusão os cimentos a base de silicato de cálcio se mostraram atóxicos.

No que diz respeito a capacidade de selamento, se comparados ao MTA, os cimentos biocerâmicos apresentam maior índice de infiltração (46), porém em um estudo comparativo (47) conclui que os cimentos biocerâmicos possuem a mesma capacidade de preenchimento de canais laterais que o cimento resinoso AH Plus. Em comparação da capacidade de adesão de cimentos endodônticos (48) os autores concluem que a umidade presente nos túbulos dentinários afeta a adesão de cimentos resinosos, e sob estas condições de umidade o cimento biocerâmico apresenta melhor adesão. Em relação a atividade antimicrobiana, apresentaram resultados semelhantes se comparados ao MTA (49), possuindo ação antimicrobiana efetiva contra *enterococcus faecalis* (50).

Em estudo *in vitro* (51) a fim de avaliar a capacidade de remoção do material obturador, comparando dois instrumentos endodônticos e diferentes cimentos obturadores, puderam observar que a remoção do material obturador com cimento obturador biocerâmico foi mais longa.

O potencial bioativo destes cimentos se relaciona com a capacidade de liberação de íons através da solubilidade, o que pode comprometer a qualidade do selamento do sistema de canais radiculares (52). Em avaliação de infiltração para cinco cimentos endodônticos resinosos ou biocerâmicos (53) concluem que todos os cimentos apresentam infiltração coronária, sendo o biocerâmico aquele que apresentou maior taxa de infiltração.

No que se refere a potencial bioativo, em estudo *in vitro* (54) induziram a formação do tecido mineral em cultura de células pulpares, concluindo que os cimentos a base de silicato de cálcio possuem alta bioatividade. Em estudo semelhante com células mesenquimais (55) observaram que cimentos a base de silicato de cálcio foram capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos.

Em revisão sistemática (56) sobre avaliação da resposta celular a materiais biocerâmicos foi possível estabelecer que o MTA ou a Biodentina são materiais de referência prevalentes, e os autores sugerem que pelo menos um destes materiais seja utilizado como comparação quando realizada uma avaliação de um novo material biocerâmico. Na literatura atual sobre a utilização dos biocerâmicos na odontologia (13) observam que os resultados são favoráveis a utilização destes materiais de forma geral, porém concluem que há necessidade de mais estudos de acordo com o surgimento de novos materiais no mercado, oferecendo dados suficientes que assegurem sua utilização clínica.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade para três cimentos obturadores biocerâmicos a base de silicato de cálcio e óxido de zircônia, e cimento agregado trióxido mineral (MTA) em cultura celular de osteoblastos da linhagem MC3T3-E1.

Assim, este trabalho investigou os seguintes aspectos relacionados à biocompatibilidade dos cimentos biocerâmicos avaliados:

- Examinar a superfície dos cimentos antes de iniciar as culturas celulares.
- Avaliar a viabilidade celular frente aos cimentos em vários tempos experimentais.
- Examinar a adesão e a morfologia celular na superfície dos cimentos ao final do experimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Amostras

Foram utilizados os cimentos endodônticos biocerâmicos BioC Sealer® (Angelus, Londrina, PR, Brasil), Endosequence® BC Sealer (Brassler, Savannah, GA, Estados Unidos da América), BioC Sealer Ion® (Angelus, Londrina, PR, Brasil) e MTA Angelus® (Angelus, Londrina, PR, Brasil).

Grupo CV (controle): poços de cultura sem cimento obturador, mantidos como controle de vida.

Grupo G1 (teste): cimento endodôntico obturador composto por silicato de cálcio e óxido de zircônia mais aluminato de cálcio, óxido de ferro e dióxido de silício (BioC Sealer®).

Grupo G2 (teste): cimento endodôntico obturador composto por silicato de cálcio e óxido de zircônia mais hidróxido de cálcio (Endosequence®).

Grupo G3 (teste): cimento endodôntico obturador composto por silicato de cálcio e óxido de zircônia mais silicato de magnésio, sulfato de cálcio, sulfato de potássio e dióxido de silício (BioC Sealer Ion®).

Grupo G4 (teste): cimento endodôntico reparador composto por silicato tricálcico, silicato dicálcio, aluminato tricálcio, óxido de cálcio e tungstato de cálcio (MTA Angelus®).

Grupo CM (controle de morte): poços de cultura sem cimento obturador, com posterior adição de fenol, que causa morte celular.

4.1.2 Obtenção de células

As células utilizadas neste estudo foram da linhagem celular MC3T3-E1, caracterizadas como pré-osteoblastos de aspecto morfológico semelhante a fibroblastos, oriundos de calvária de ratos recém-nascidos. As células foram obtidas no banco de células do Laboratório de Biologia Oral (LBO) da faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). O presente trabalho foi isento de análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOUSP por não utilizar animais para obtenção das células (Protocolo 001/2023I) (Anexo A).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo das amostras

A fim de manter a assepsia, todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, e por se tratar de materiais de pronto uso, inicialmente todos os cimentos foram transferidos de suas seringas originais para seringas de tuberculina estéreis e imediatamente após a transferência, cada seringa foi identificada com o número de seu respectivo grupo. O grupo teste MTA (G4) por não ser um material de pronto uso, foi manipulado de acordo com as orientações do fabricante (44), e concluída a manipulação, o material também foi transferido para a seringa de tuberculina estéril e devidamente identificado (Figura 4.1).

Após o preparo dos materiais, também em capela de fluxo laminar, os cimentos foram acondicionados nas respectivas placas de cultura de células, em triplicata, as quais receberam identificação do tempo teste (Figura 4.3 e Figura 4.5). Determinado através de estudo piloto e com base nas informações do fabricante, a presa final dos materiais teste foi obtida após as amostras permanecerem por um período de 24 horas em estufa com 95% de umidade relativa a 37 °C. Apesar da manipulação ter ocorrido em ambiente controlado e com materiais estéreis, as amostras passaram por tratamento com antibiótico em concentração 5 mg/ml (*Penicilin-streptomycin* – Sigma

Aldrich® Chemical Co.) durante um período de 24 horas a fim de assegurar a esterilidade das amostras (57).

4.2.2 Cultura de células

O cultivo das células foi realizado no Laboratório de Cultivo Celular do LBO da FOU SP. Realizada cultura primária de osteoblastos MC3T3-E1, cultivados em meio de cultura α -MEM (*minimum essential medium alfa médium* - Sigma Aldrich® Chemical Co.), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) e 1% de solução antimicrobiana (*Penicilin-streptomycin* – Sigma Aldrich® Chemical Co.).

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar para a manutenção da esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para cultivo celular. As células foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida (95% de umidade), contendo 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂). O meio de cultura foi trocado periodicamente (a cada 48 horas) e a progressão da cultura avaliada por microscópio invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL).

4.2.3 Análise de citotoxicidade direta: ensaio de MTT

O teste de citotoxicidade envolveu inicialmente a obtenção de células viáveis. Os protocolos utilizados nos ensaios foram baseados em metodologia prévia (57).

Após atingirem a subconfluência, as células foram removidas dos frascos e contadas. A contagem foi realizada por meio de microscópio invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) e um hemocítômetro (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA).

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços (Corning®, New York, EUA) (Figura 4.2). Após a contagem as células foram depositadas na concentração de $3,5 \times 10^3/\text{cm}^3$ sobre os grupos teste que possuíam cimento no fundo do poço (Figura 4.3), e nos grupos controle de vida e controle de morte, os osteoblastos foram

depositados diretamente no interior dos poços sem a presença de cimento, em igual concentração celular. Em seguida, o meio de cultura foi difundido em todos os poços, e sobre as amostras nos grupos teste, as placas foram mantidas em estufa, em condições favoráveis para seu crescimento. As análises executadas foram feitas com 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. Transcorridos os tempos experimentais, as placas foram preparadas para leitura de absorbância.

O meio de cultura foi retirado e os poços lavados com solução tampão PBS estéril (*phosphate buffered saline* – tampão fosfato salino). Em seguida, em cada poço do grupo controle (CV) e nos grupos dos cimentos (G1, G2, G3 e G4) foram adicionados 100µl de brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazólio, em concentração de 5 mg/ml em PBS. Os poços do grupo controle de morte (CM) receberam 100µl de fenol. A placa de cultura foi então incubada em estufa a 37 °C durante 3 horas. Transcorrido este período, a solução foi aspirada dos poços, seguida da adição de 100µl de DMSO (dimetilsulfóxido) em temperatura ambiente, que permaneceu sob agitação durante 15 minutos, para solubilizar os cristais de coloração azul-violeta formados pela clivagem dos anéis de tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase (SDH) das mitocôndrias ativas. Após a solubilização, as soluções foram transferidas para uma nova placa de poços e então efetuada a leitura em espectrofotômetro de placas (leitor de microplacas Synergy – BioTek), no comprimento de onda de 540nm. Os grupos foram nomeados conforme descrito, sendo G1, G2, G3 e G4 grupos testes, CV controle de vida, CM controle de morte e CB como branco, sendo este um grupo de poços em branco, necessários para a leitura do espectrofotômetro, o qual é um controle em relação ao grupo CM.

4.2.4 Análise morfológica: microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A observação em MEV foi realizada para avaliar a morfologia das células e a adesão as superfícies dos materiais obturadores. Os ensaios foram realizados em triplicata em placas de 24 poços (Corning®, New York, EUA) (Figura 4.4).

Após atingirem subconfluência, as células foram removidas dos frascos de cultura e contadas. A contagem das células foi realizada por meio de microscópio

invertido (Zeiss Axiovert 40 CFL) e hemocítômetro (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA), em seguida as células foram depositadas sobre os poços na concentração de $2 \times 10^4/\text{cm}^3$.

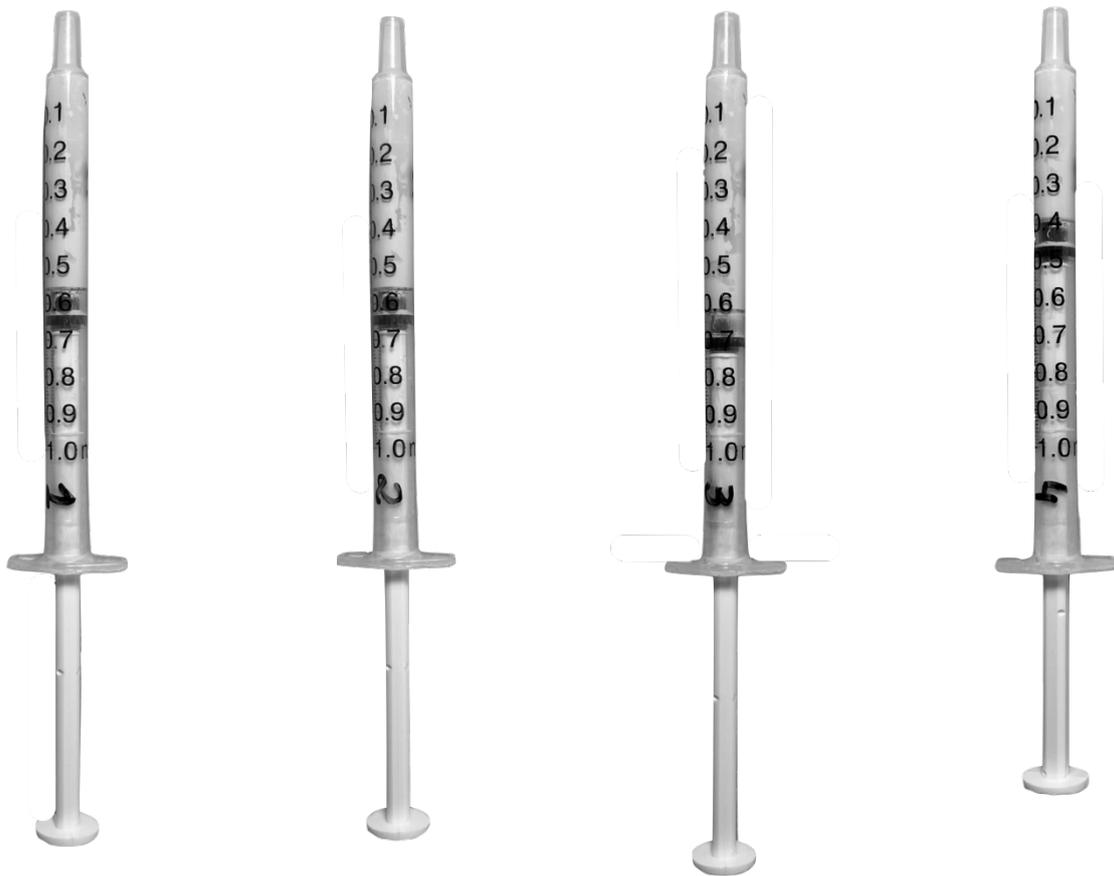
Os poços foram preparados com os materiais dos grupos teste: lamínula de vidro circular estéril com camada de cimento obturador no centro da superfície da lamínula (Figura 4.5) com a presa final já obtida, em seguida o meio de cultura foi difundido em todos os poços e as placas incubadas em condições favoráveis para seu desenvolvimento. Decorrido o tempo de 72 horas o meio de cultura foi removido, os poços lavados com solução tampão cacodilato de sódio 0,05M – pH 7,4, seguido pela fixação das amostras com solução de 2% de glutaraldeído, no mesmo tampão, durante 30 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido esse período, as amostras foram lavadas com tampão, desidratadas em crescentes diluições de etanol, de 30% até o absoluto, com adição final de hexametildisilizano (HMDS) a 100% por 10 minutos, em seguida foi removido, sendo deixadas para secar em temperatura ambiente. As placas foram acondicionadas em estufa seca a 37 °C por pelo menos 24 horas. As amostras de 72 horas foram montadas em suporte de alumínio (Figura 4.6 A) e metalizadas em aparelho específico (Baltec SCD 050), com uma camada de aproximadamente 25nm de ouro (Figuras 4.6 B) para então seguir para avaliação em microscópio eletrônico de varredura (MEV- LEO 430, operado com 15kVA).

4.2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada para os resultados obtidos no teste de citotoxicidade direta (MTT), os quais foram mensurados através de absorvância de luz em aparelho espectrofotômetro. O valor de absorvância se relaciona diretamente com a viabilidade celular da amostra, sendo, portanto, denominada desta forma. Os dados de absorvância obtidos foram analisados pelo software JAMOV (58), inicialmente foi realizada estatística descritiva e os testes de normalidade e homogeneidade, concluindo que os resultados tiveram aderência a normalidade (Anexos B e C) (Shapiro-Wilk $p > 0,05$), sendo então selecionados testes estatísticos paramétricos para avaliar as diferenças entre os grupos.

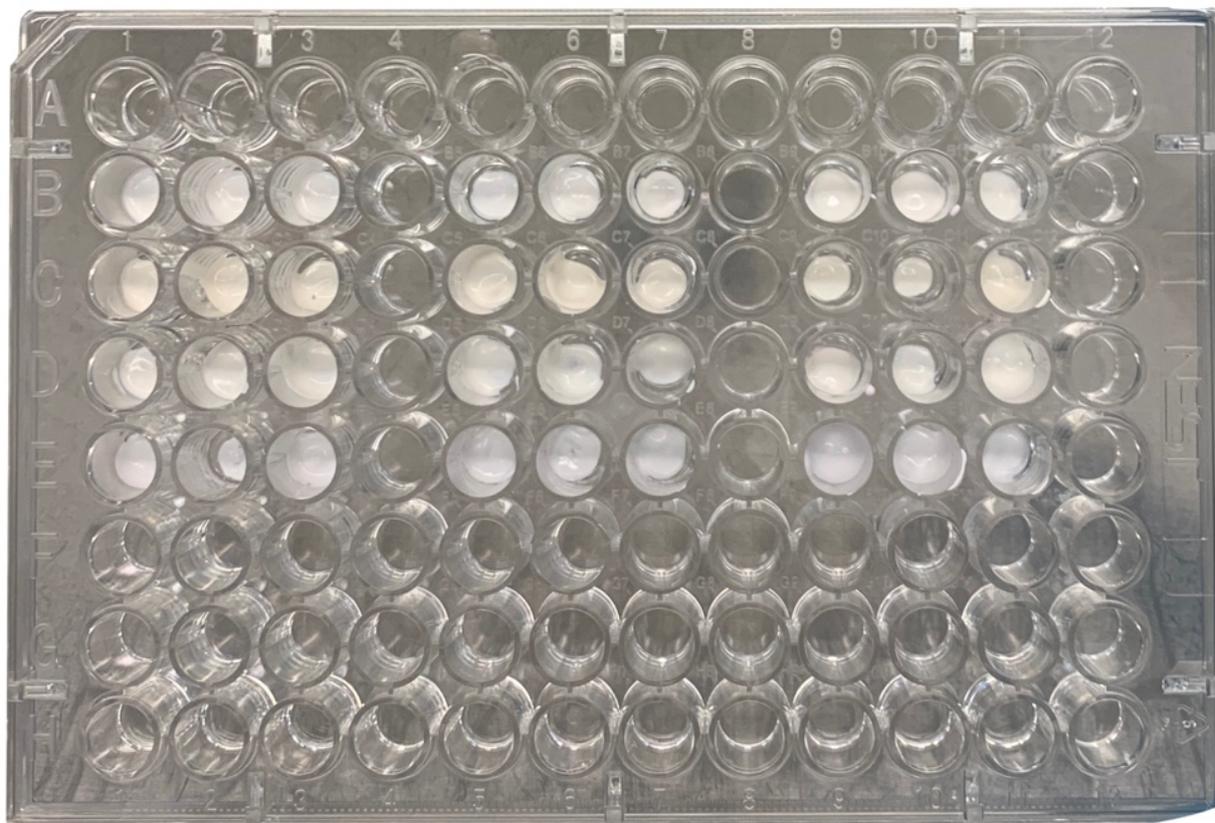
O teste ANOVA de dois fatores foi utilizado para verificar se haviam diferenças entre as médias dos diferentes grupos e tempos, já o teste estatístico Post-Hoc de Tuckey foi utilizado para determinar onde ocorrem as diferenças entre os diferentes grupos e tempos. Foi determinado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Figura 4.1 – Seringas de tuberculina com material teste transferido para seu interior e identificadas com a ordem numérica do respectivo grupo teste.



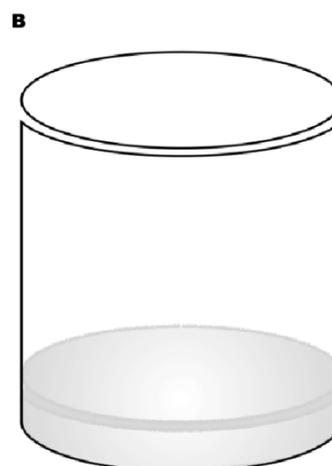
Fonte: O autor.

Figura 4.2 – Placa de cultura de 96 poços. Observação dos poços de cultura contendo cimento endodôntico dos grupos teste em triplicata.



Fonte: O autor.

Figura 4.3 – Demonstração da forma de colocação do material teste ao fundo dos poços de cultura das placas de 96 poços. (A) Material teste no fundo do poço de cultura. (B) desenho representativo do material teste no fundo do poço de cultura.



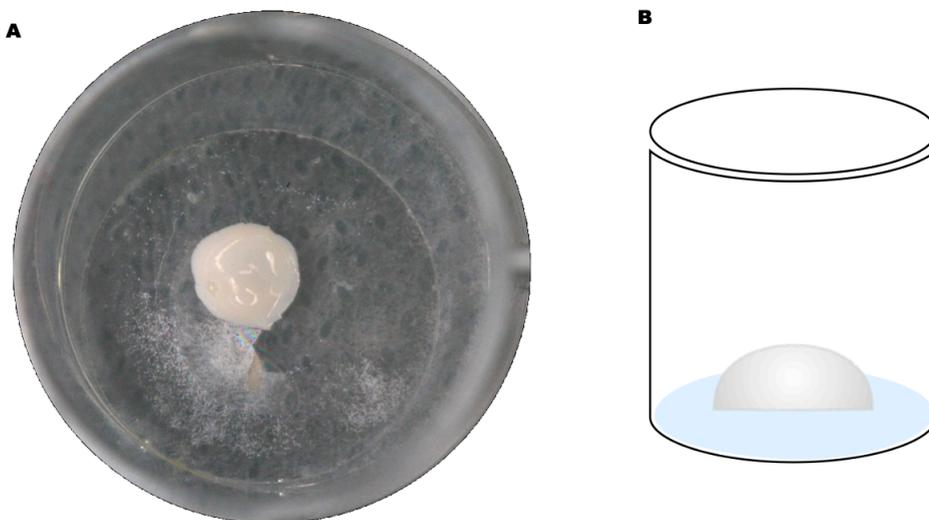
Fonte: O autor.

Figura 4.4 – Placa de cultura de 24 poços. Observação das lamínulas circulares no fundo dos poços de cultura, com camada de cimento endodôntico no centro da lamínula



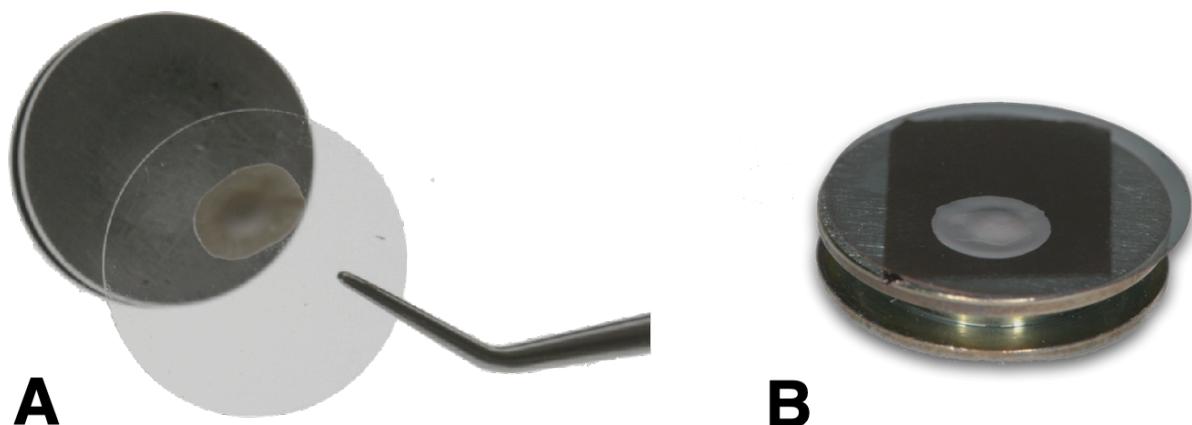
Fonte: O autor.

Figura 4.5 – Demonstração da forma de colocação do material teste ao fundo dos poços de cultura das placas de 24 poços. (A) Material teste depositado acima da lamínula de vidro, no fundo do poço de cultura. (B) desenho representativo.



Fonte: O autor.

Figura 4.6 – Detalhe das lamínulas de vidro. (A) Lamínula de vidro após processo de fixação, sendo levada ao suporte de alumínio. (B) Lamínula de vidro fixada ao suporte de alumínio já metalizada com camada de ouro



Fonte: O autor.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DIRETA: ENSAIO DE MTT

O teste paramétrico ANOVA de dois fatores apontou diferenças estatísticas significativas entre as médias de viabilidade celular dos diferentes grupos e entre os diferentes tempos experimentais (Tabela 5.1). Para T (tempo) $p < 0,01$, G (grupos) $p < 0,01$ e T*G (comparação entre tempos e grupos) $p < 0,01$.

Na comparação entre a variável de tempos experimentais, através do teste Post-Hoc (Tabela 5.2) verificou-se diferença estatística significativa entre os tempos 72 e 24 horas ($p < 0,01$) e entre 72 e 48 horas ($p < 0,01$). Não houve diferença estatística significativa entre os tempos 24 e 48 horas ($p = 0,958$) (Gráfico 5.1).

Em comparação entre a variável grupos, o grupo G3 apresentou maior viabilidade celular, se comparado aos demais grupos, havendo diferença estatística significativa entre as médias de absorbância entre os grupos ($p < 0,01$). Não foi possível observar diferença estatística significativa entre os grupos G1, G2, G4 e CV ($p > 0,05$) (Tabela 5.3) (Gráficos 5.2).

Foi possível observar diferença estatística significativa entre o grupo controle de morte (CM) e os grupos teste G1, G2, G3 e G4 ($p < 0,01$) e entre o grupo controle de vida CV ($p < 0,05$). Não houve diferença estatística entre os grupos CM e CB ($p = 1,00$) (Tabela 5.3) (Gráficos 5.2).

Em análise estatística de comparação entre os diferentes grupos e diferentes tempos experimentais (Tabela 5.4) o teste Post Hoc apontou diferença estatística entre G1 24h e G3 24h ($p = 0,030$), G1 24h e G3 72h ($p < 0,001$), G1 48h e G3 72h ($p < 0,001$), G1 72h e G3, CB e CM 72h ($p < 0,001$), G2 24h e G3 72h ($p < 0,001$), G2 48h e G3 72h ($p < 0,001$), G2 72h e G3, CB, CM 72h ($p < 0,001$), G3 24h e CB, CM, CV ($p < 0,001$), G3 24h e G4, CB, CM, CV 48h ($p < 0,05$), G3 24h e G3, CB, CM, CV 72h ($p < 0,05$), G3 48h e CB, CM, CV 48h ($p < 0,05$), G3 48h e G3, CB, CM, CV 72h ($p < 0,001$), G3 72h e G4, CB, CM, CV 72h ($p < 0,001$), G4 72h e CB, CM 72h ($p < 0,05$), CB 24h e CV 72h ($p = 0,003$), CB 48h e CV 72h ($p = 0,011$), CB 72h e CV 72h ($p = 0,008$). O grupo controle de morte CM não apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle branco CB. O grupo controle de morte apresentou diferença

estatística significativa em relação ao grupo controle de vida nos tempos de 24, 48 e 72 horas em relação ao controle de vida de 72 horas ($p < 0,05$) (Gráfico 5.3).

5.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA: MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Na análise por microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a superfície dos materiais teste (Figura 5.1). Os grupos G2 e G3 apresentaram superfície mais homogênea e regular. Os grupos G1 e G4 apresentaram em toda extensão de sua superfície irregularidades superficiais, com formatos poligonais ou circulares (Figura 5.1).

Notou-se a presença de células em todos os grupos teste, porém no grupo G2 havia menos células aderidas a superfície do material, presentes de forma isolada com citoplasma escasso, pouco desenvolvido e poucos prolongamentos celulares, consequentemente havia grande área de superfície sem células aderidas (Figura 5.2). Já nos grupos G1 e G3 observou-se mais células aderidas a superfície do material, com pequenas e raras regiões sem presença de células. As células observadas nestes grupos apresentaram citoplasma bastante desenvolvido, núcleo central e prolongamentos celulares bem desenvolvidos, estabelecendo comunicações intercelulares (Figuras 5.2 e 5.3).

Na superfície da lamínula de vidro houve maior acúmulo celular a região da borda do material depositado no grupo G2 e G4. Nos grupos G1 e G3 a distribuição de células pela superfície ocorreu de forma mais homogênea. No grupo G2 verificou-se a presença de mais células na região da lamínula, se comparado a superfície do material teste, células que possuíam poucos prolongamentos e citoplasma fusiforme (Figura 5.4). Nos grupos G1, G3 e G4 as células presentes na lamínula apresentaram citoplasma e prolongamentos bem desenvolvidos, observando-se diversos pontos de comunicação intercelular. O grupo G4 apresentou mais células na região da lamínula, se comparado aos demais grupos, havendo inclusive sobreposição celular (Figura 5.4).

Tabela 5.1 – ANOVA dois fatores – Viabilidade celular e tempos experimentais.

ANOVA - Absorbância 540 nm

	Soma de Quadrados	gl	Quadrado médio	F	p	η^2	η^2p	ω^2
Modelo Global	0.3428	20	0.01714	26.55	< .001			
T	0.0448	2	0.02241	34.72	< .001	0.099	0.292	0.096
G	0.2357	6	0.03929	60.86	< .001	0.522	0.685	0.513
T * G	0.0622	12	0.00519	8.03	< .001	0.138	0.365	0.121
Resíduos	0.1085	168	6.46e-4					

Nota: T = tempos; G = grupos; T*G = comparação entre tempos e grupos
 gl = grau de liberdade; η^2 = variância das médias amostrais (ETA ao quadrado); η^2p = média das variâncias amostrais; ω^2 = ômega quadrado; p = valor de p.

Fonte: O autor.

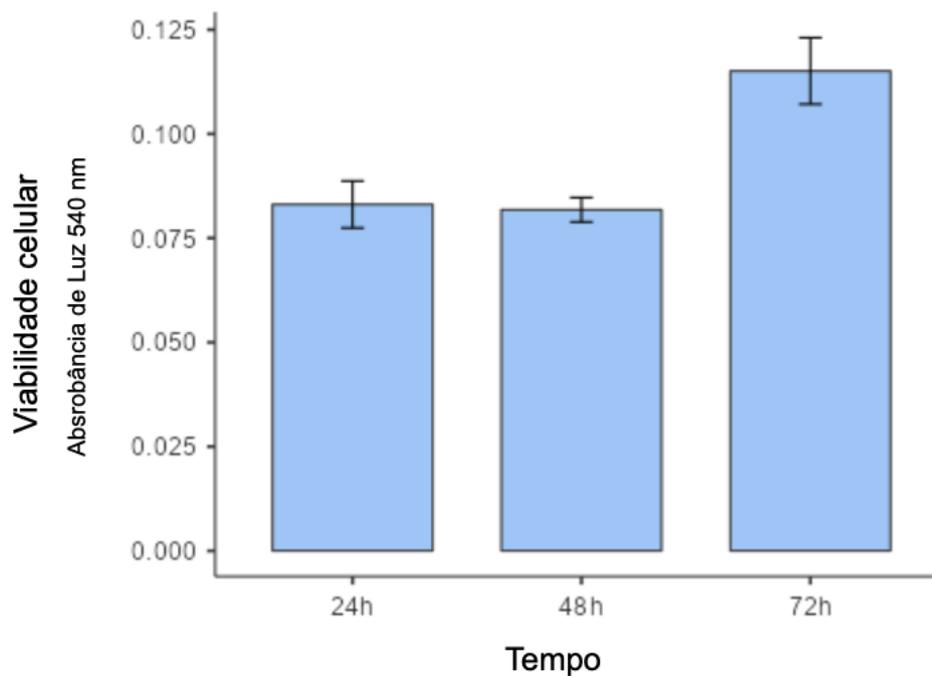
Tabela 5.2 – Post-Hoc - Comparação da viabilidade celular entre os diferentes tempos experimentais.

Comparações Post Hoc - Tempo							
Comparação		Diferença Média	Erro-padrão	gl	t	Ptukey	Pbonferroni
T	T						
24h	- 48h	0.00127	0.00453	168	0.280	0.958	1.000
	- 72h	-0.03202	0.00453	168	-7.072	< .001	< .001
48h	- 72h	-0.03329	0.00453	168	-7.352	< .001	< .001

Nota: T = tempos ; gl = grau de liberdade; t = valor de t para teste t; Ptukey = valor de p para teste de Tukey; Pbonferroni = valor de p para teste bonferroni
 Comparações baseadas nas médias marginais estimadas

Fonte: O autor.

Gráfico 5.1 – Gráfico de barras - Viabilidade celular para os diferentes tempos experimentais.



Fonte: O autor.

Tabela 5.3 – Post-Hoc – Comparação da viabilidade celular entre os grupos.

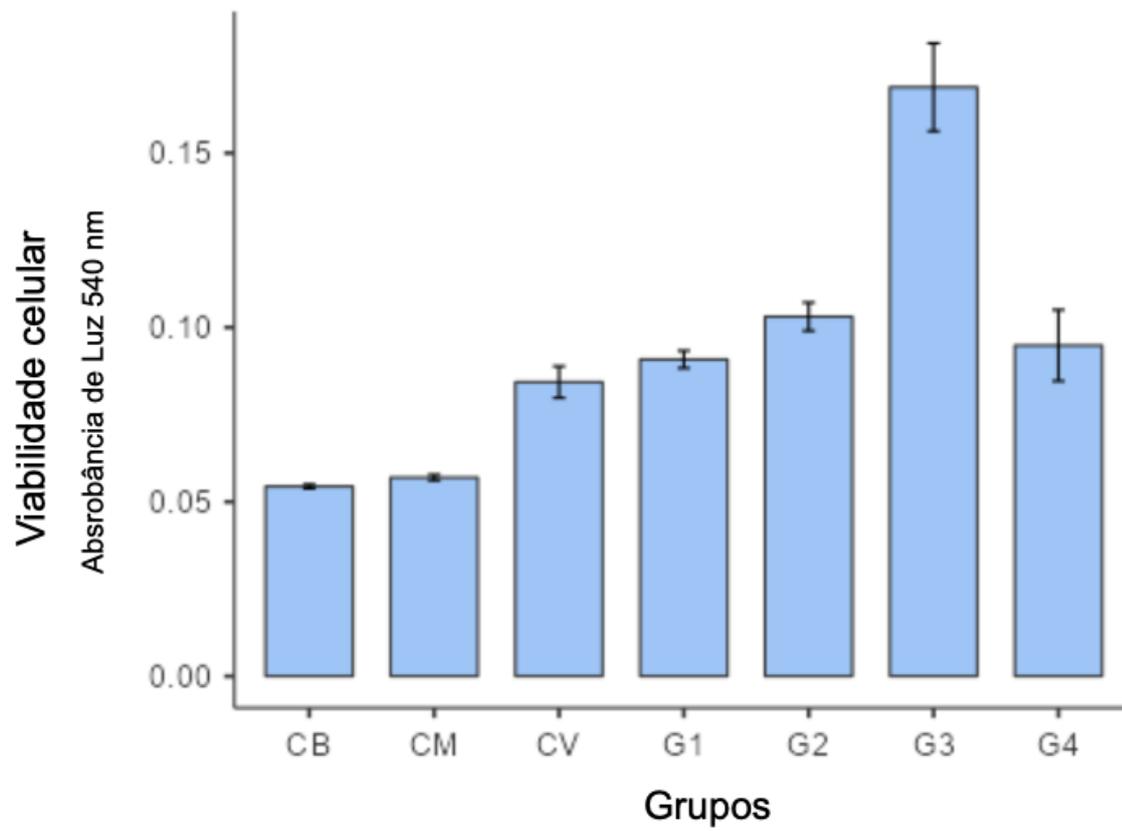
Comparações Post Hoc - Grupos							
Comparação							
G	G	Diferença Média	Erro-padrão	gl	t	Ptukey	Pbonferroni
G1	- G2	-0.01226	0.00692	168	-1.773	0.568	1.000
	- G3	-0.07807	0.00692	168	-11.290	< .001	< .001
	- G4	-0.00400	0.00692	168	-0.578	0.997	1.000
	- CM	0.03385	0.00692	168	-4.895	< .001	< .001
	- CV	0.00648	0.00692	168	-0.937	0.966	1.000
G2	- G3	-0.06581	0.00692	168	-9.517	< .001	< .001
	- G4	0.00826	0.00692	168	1.194	0.895	1.000
	- CM	0.04611	0.00692	168	-6.668	< .001	< .001
	- CV	0.01874	0.00692	168	-2.710	0.102	0.156
G3	- G4	0.07407	0.00692	168	10.712	< .001	< .001
	- CM	0.11193	0.00692	168	-16.185	< .001	< .001
	- CV	0.08456	0.00692	168	-12.227	< .001	< .001
G4	- CM	0.03785	0.00692	168	-5.474	< .001	< .001
	- CV	0.01048	0.00692	168	-1.516	0.735	1.000
CM	- CV	-0.02737	0.00692	168	-3.958	0.002	0.002
	- CB	-0.00256	0.00692	168	-0.370	1.000	1.000

Nota: G = grupos; gl = grau de liberdade; t = valor de t para teste t; Ptukey = valor de p para teste Tukey; Pbonferroni = valor de p para teste bonferroni

Comparações baseadas nas médias marginais estimadas

Fonte: O autor.

Gráfico 5.2 – Gráfico de barras - Viabilidade celular para os diferentes grupos.



Fonte: O autor.

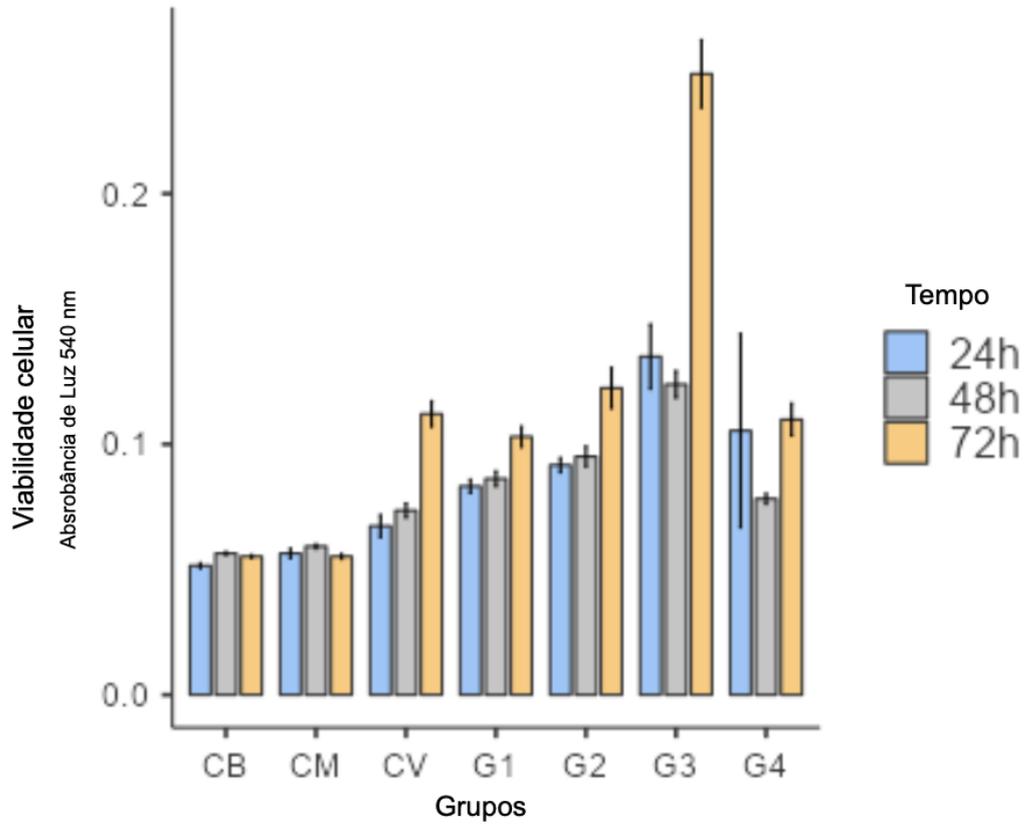
Tabela 5.4 – Post-Hoc – Comparação da viabilidade celular entre os diferentes tempos experimentais e diferentes grupos.

Comparação Post Hoc T * G																
G		T	24h – 24h		24h – 48h		24h – 72h		48h – 48h		48h – 72h		72h – 72h			
G	G	T	T	p	T	p	T	p	T	T	P	T	p	T	T	p
G1	G1	24h	24h	-	48h	1.000	72h	0.999	48h	48h	-	72h	1.000	72h	72h	-
	G2			1.000		0.360		1.000			0.525		0.999			
	G3			0.030		<0.001		0.443			<0.001		<0.001			
	G4			1.000		0.947		1.000			0.986		1.000			
	CB			0.776		0.945		0.858			0.807		0.076			
	CM			0.9545		0.983		0.940			0.807		0.076			
	CV			1.000		0.889		1.000			0.961		1.000			
G2	G2	24h	24h	-	48h	1.000	72h	0.817	48h	48h	-	72h	0.933	72h	72h	-
	G3			0.185		<0.001		0.893			<0.001		<0.001			
	G4			1.000		1.000		1.000			1.000		1.000			
	CB			0.316		0.583		0.389			0.327		<0.001			
	CM			0.583		0.737		0.544			0.327		<0.001			
	CV			0.980		1.000		0.996			1.000		1.000			
	G3			G3		24h		24h			-		48h			1.000
G4		0.389	0.008	0.119	1.000		<0.001									
CB		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001									
CM		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		<0.001									
CV		<0.001	0.002	0.991	0.042		1.000									
G4	G4	24h	24h	-	48h	1.000	72h	1.000	48h	48h	-	72h	0.776	72h	72h	-
	CB			0.141		0.327		0.995			0.990		0.014			
	CM			0.327		0.474		0.999			0.990		0.014			
	CV			0.886		0.991		1.000			0.659		1.000			
CB	CB	24h	24h	-	48h	1.000	72h	1.000	48h	48h	-	72h	1.000	72h	72h	-
	CM			1.000		1.000		1.000			1.000		1.000			
	CV			1.000		0.994		1.000			0.011		0.008			
CM	CM	24h	24h	-	48h	1.000	72h	1.000	48h	48h	-	72h	1.000	72h	72h	-
	CV			1.000		1.000		1.000			0.023		0.008			
CV	CV	24h	24h	-	48h	1.000	72h	0.141	48h	48h	-	72h	0.395	72h		-

Legenda: T: tempo experimental; G: grupo, p: valor de p para teste estatístico Post Hoc de Tuckey.

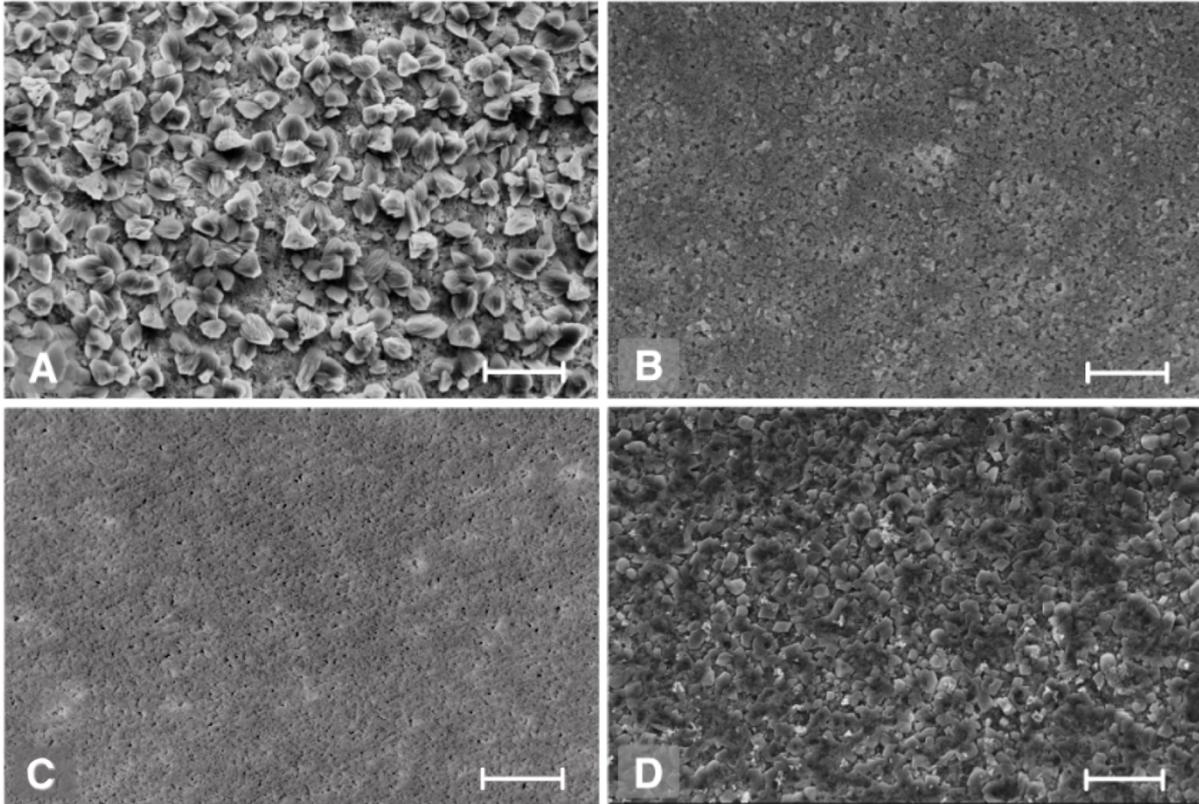
Nota. Comparações baseadas nas médias marginais estimadas. Erro padrão= 0.0134. Grau de liberdade = 192.

Gráfico 5.3 – Gráfico de barras - Comparação entre viabilidade celular dos diferentes grupos entre diferentes tempos experimentais.



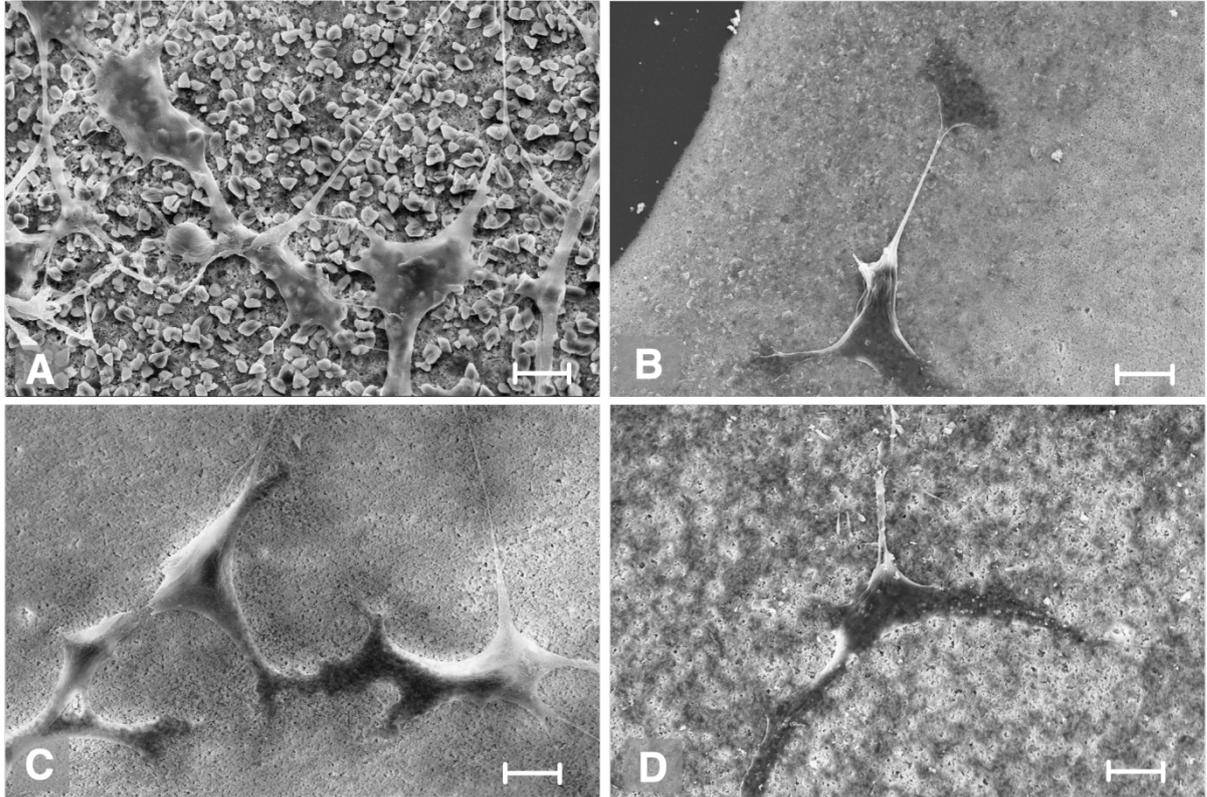
Fonte: O autor.

Figura 5.1 – Microscopia eletrônica de varredura – Superfície do material dos grupos teste MEV aumento de 1500X. (A) grupo G1, (B) grupo G2, (C) grupo G3 e (D) grupo G4. Escala 10 μ m



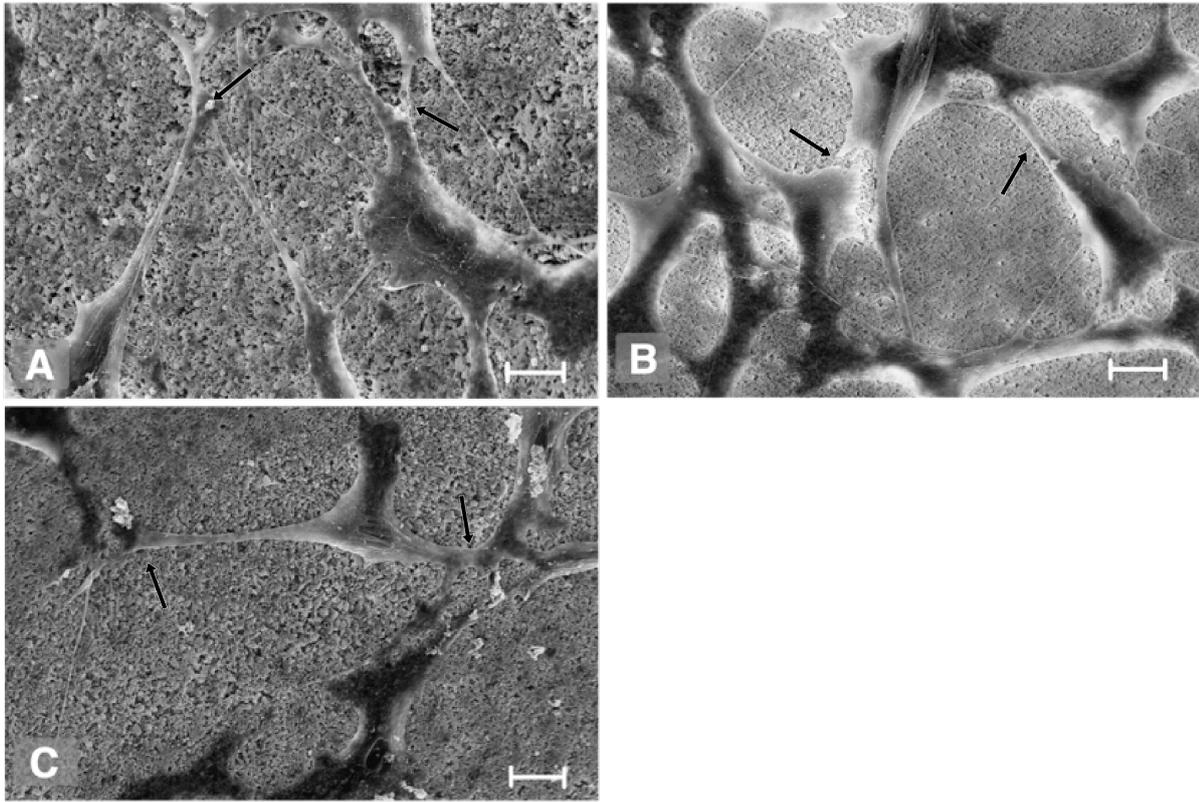
Fonte: O autor.

Figura 5.2 - Microscopia eletrônica de varredura – Osteoblastos aderidos a superfície do material dos grupos teste MEV aumento de 1000X. (A) grupo G1, (B) grupo G2, (C) grupo G3 e (D) grupo G4. Escala 10 μ m



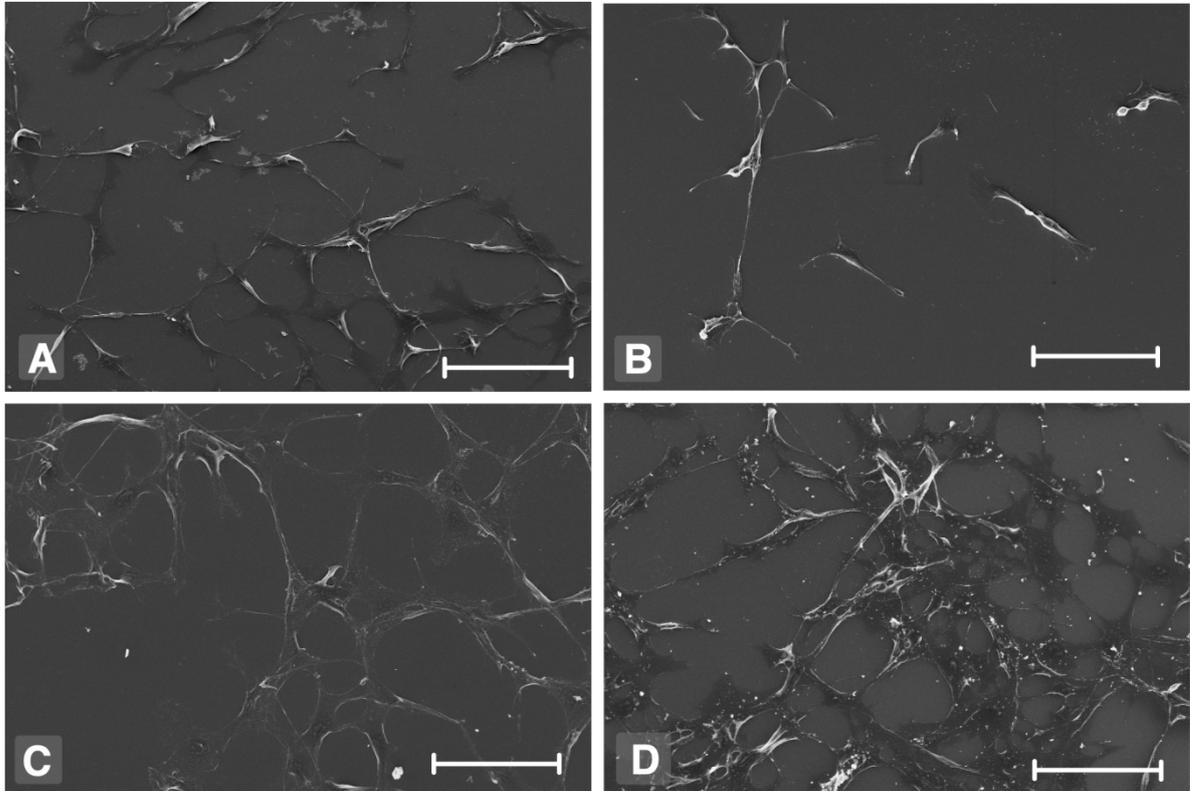
Fonte: O autor.

Figura 5.3 - Microscopia eletrônica de varredura – Osteoblastos aderidos a superfície do material dos grupos teste. Observação dos prolongamentos celulares estabelecendo contatos intercelulares (setas) MEV aumento de 1000X. (A) grupo G1, (B) grupo G3, (C) grupo G4. Escala 10 μ m



Fonte: O autor.

Figura 5.4 - Microscopia eletrônica de varredura – Osteoblastos aderidos a lamínula de vidro, região da periferia dos materiais dos grupos teste MEV aumento de 250X. (A) grupo G1, (B) grupo G2, (C) grupo G3 e (D) grupo G4. Escala 100 μ m



Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo *in vitro* analisando osteoblastos cultivados sobre vários cimentos biocerâmicos mostrou que todos eles apresentaram biocompatibilidade, permitindo o crescimento e a adesão celular na sua superfície. O MTA e os cimentos contendo outros componentes que não o hidróxido de cálcio apresentaram melhor biocompatibilidade.

O desenvolvimento recente dos cimentos obturadores biocerâmicos é baseado na tentativa de melhorar as propriedades biológicas para trazer mais benefícios e, eventualmente, torná-los o material de primeira escolha na obturação endodôntica. As propriedades biológicas idealizadas para este tipo de cimento obturador tiveram como base o MTA, cimento endodôntico reparador tradicionalmente utilizado para tratamentos intrarradiculares que envolvem a comunicação com o osso alveolar (6, 7).

A fim de verificar essas propriedades biológicas o MTA foi utilizado neste estudo, por ser um material biocerâmico que possui boas características físicas além de efeitos biológicos comprovados pela literatura (6, 7).

Os resultados obtidos pelo ensaio de MTT apontaram maior absorvância para todos os grupos no tempo de 72 horas, o que indica a presença de um maior número de células neste intervalo, portanto, as análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas apenas para estas amostras. O ensaio de MTT apresenta resultados baseados na atividade mitocondrial das células, não permitindo avaliar se estão ou não aderidas ao material ou como se relacionam com o material teste, portanto, a análise de citotoxicidade direta (MTT) e a análise morfológica (MEV) são complementares.

Deve ser levado em consideração que durante o processo de lavagem e desidratação pelo qual o material passa antes de ser examinado no microscópio eletrônico de varredura, células com fraca adesão ao substrato podem se soltar, o que levaria a falsos resultados quantitativos. Assim, na observação em MEV a contagem das células observadas não foi realizada.

A análise morfológica realizada através de microscopia eletrônica de varredura foi realizada com finalidade de avaliar a morfologia e adesão celular aos materiais testados. A morfologia celular observada no presente estudo é compatível com a morfologia observada em cultura de osteoblastos da linhagem MC3T3-E1.

Observou-se que as células cultivadas sobre os materiais teste apresentaram aspecto fusiforme, adesão ao substrato, citoplasma e prolongamentos celulares bem desenvolvidos. Em cultura, células oriundas de tecidos duros se proliferam em monocamadas e apresentam aspecto fusiforme (59), sendo mais um indicativo de que os materiais ofereceram condições favoráveis para a proliferação dos osteoblastos.

Quando em cultura, células em estado degenerativo se apresentam com aspecto circular por não aderirem ao substrato, o que seria um indicativo de ausência de biocompatibilidade (59). Desta forma, as evidências morfológicas encontradas neste trabalho permitem afirmar que todos os materiais testados são biocompatíveis.

A microscopia eletrônica de varredura também possibilitou verificar diferenças entre a topografia dos diferentes materiais testados. As estruturas arredondadas ou poligonais, que confeririam irregularidade de superfície a dois dos materiais testados, foram também observadas sob este tipo de microscopia eletrônica em estudo prévio com biocerâmicos (60), sendo denominadas estruturas cristalinas superficiais, consideradas normais para esta classe de material.

Em relação as diferentes texturas de superfície, Guadarrama e colaboradores (61) observaram que osteoblastos da linhagem MC3T3-E1 apresentaram mais prolongamentos celulares em superfícies com microporosidades, se comparadas a superfícies lisas. Estes dados enfatizam a influência da textura superficial com a adesão celular. As irregularidades de superfície podem funcionar como zonas de micro retenção, facilitando a adesão das numerosas células observadas no presente estudo.

O resultado da análise morfológica em MEV para os cimentos com superfície mais lisa mostrou diferença na adesão celular. Enquanto poucas células estavam aderidas ao material que contém hidróxido de cálcio, observou-se mais células aderidas na superfície do cimento com silicato de magnésio. Assim, não somente a textura de superfície influenciaria na adesão, mas a ausência de hidróxido de cálcio na composição pode estar relacionada a uma maior quantidade de células no cimento.

O cimento que possui em sua formulação componentes diferentes dos demais, entre eles o silicato de magnésio, foi o que apresentou mais células aderidas e com longos prolongamentos desenvolvidos também em contato com a superfície desse cimento. Estudos prévios demonstram que materiais que liberam íons magnésio são eficientes no tratamento de defeitos ósseos, promovendo diferenciação osteogênica e grande deposição mineral (61). Os íons magnésio induzem aumento significativo da

fosfatase alcalina em osteoblastos, e aumento de junções intercelulares (62, 63) mostrando que há relação entre este componente e a alta atividade celular observada no cimento que o possui.

O hidróxido de cálcio presente na composição de apenas um cimento teste, é um composto utilizado dentro da endodontia por possuir diversas propriedades biológicas, tais como aumento da expressão de sialoproteína ósea (64, 65), porém em altas concentrações o hidróxido de cálcio se torna citotóxico, principalmente pela elevação do pH do meio (66). O grupo teste que tem hidróxido de cálcio em sua formulação apresentou poucas células aderidas em sua superfície em comparação aos demais grupos.

Os resultados observados neste trabalho não mostraram diferença estatística significativa na viabilidade celular entre os grupos que não possuem silicato de magnésio, já em microscopia eletrônica de varredura foi possível observar que o cimento com hidróxido de cálcio apresentou poucas células aderidas em sua superfície se comparado aos demais grupos. Além disso, neste grupo observou-se mais células na região da lamínula de vidro, mostrando um maior desenvolvimento em uma região que não apresenta contato direto com o cimento.

Estes resultados sugerem que os componentes do cimento com hidróxido de cálcio são biocompatíveis, porém a falta de aderência celular em sua superfície deve estar relacionada com o contato direto entre as células e o material, o qual de alguma forma interfere na adesão e no desenvolvimento celular, indicando que o hidróxido de cálcio teria um efeito de superfície desfavorável.

Dois dos cimentos testados apresentaram mais células aderidas a sua superfície se comparados aos demais. A observação destas células aderidas é um indicativo de biocompatibilidade dos materiais. Ambos cimentos possuem em sua formulação o dióxido de silício (SiO_2), composto que possui diversos efeitos biológicos conhecidos.

No que diz respeito ao efeito do silício em cultura de osteoblastos, foi observado que promove aumento da área de mineralização óssea através do aumento da expressão de genes que regulam a síntese de colágeno (67). Também em estudo com osteoblastos (68) verificaram aumento da mineralização e aumento da expressão de fosfatase alcalina. Estes indicativos mostram que o SiO_2 é um composto promissor para o reparo ósseo, e pode ter influenciado na presença de mais células observadas nos cimentos que possuem este componente.

Os dois cimentos testados que continham aluminato de cálcio apresentaram bons índices de viabilidade celular, evidenciando sua biocompatibilidade. Estudos prévios, também em cultura de células ósseas, a exposição ao aluminato de cálcio permitiu que as células exibissem maior potencial osteogênico, maior índice de viabilidade, maior atividade da fosfatase alcalina e expressão de fatores gênicos relacionados a sialoproteína óssea e osteocalcina (69, 70).

Diferentemente dos demais cimentos, o cimento com silicato de magnésio possui também compostos sulfatados. Este cimento apresentou uma grande proliferação e adesão celular em sua superfície. Estudos prévios observaram que compostos sulfatados exercem potencial osteogênico, e assim como neste trabalho, observaram alta adesão de células, recomendando sua utilização como coadjuvante a regeneração óssea (71, 72).

Estudos em cultura de osteoblastos mostram que o sulfato de cálcio promove aumento da expressão de genes associados a produção de matriz óssea, tal como proteína óssea morfogenética, se associando a ativação molecular da síntese de matriz óssea (73, 74). Justificando a necessidade de futuras investigações sobre interações celulares com o cimento que o possui em sua formulação, já que este foi o grupo teste com maior índice de viabilidade celular.

Todos os grupos de cimentos obturadores possuem em sua composição silicato de cálcio, que também é o principal componente do MTA. Além da ampla literatura sobre as propriedades do MTA, estudos prévios com cimentos obturadores a base de silicato de cálcio comprovam sua biocompatibilidade (23, 24, 54, 55). Outro componente de todos os cimentos obturadores é o óxido de zircônia, que além de ser adicionado para aumentar a radiopacidade (75), não apresenta citotoxicidade (76) e possui efeitos biológicos que levam a alteração da expressão gênica, estimulando a proliferação de osteoblastos (77). Portanto a presença destes dois compostos condiz com os resultados vistos no presente estudo, que mostraram viabilidade e proliferação celular para todos os grupos teste.

Em geral, os cimentos obturadores biocerâmicos aqui testados, por possuírem composição semelhante ao MTA, material que já apresentou resultados favoráveis, juntamente ao fato de liberarem íons cálcio (78), mostraram biocompatibilidade, podendo ser considerados materiais com potencial de induzir ou acelerar a mineralização óssea.

Foi avaliada a biocompatibilidade destes materiais frente a uma linhagem de osteoblastos, as células formadoras de tecido ósseo, pois a reparação desse tecido na região periapical é um dos principais objetivos do tratamento endodôntico. Os resultados de viabilidade celular, bem como a adesão dos osteoblastos na superfície dos cimentos, desenvolvendo, inclusive, prolongamentos que estabeleciam contatos entre eles mostram a necessidade de mais trabalhos para comprovar o potencial osteoindutor dos materiais *in vitro* e, posteriormente, estudos *in vivo* que permitam avaliar interações fisiológicas, imunológicas, fatores externos ou do hospedeiro que se relacionam com a função de um organismo vivo.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram concluir que: todos os cimentos apresentaram biocompatibilidade, permitindo o crescimento e a adesão celular em sua superfície.

Os grupos de cimento que não possuem hidróxido de cálcio apresentaram maior crescimento celular, bem como adesão a superfície do material.

Os cimentos que possuem dióxido de silício apresentaram mais células aderidas a sua superfície.

O cimento que contém silicato de magnésio apresentou maior índice de viabilidade celular, maior crescimento celular com mais células aderidas a sua superfície.

REFERÊNCIAS¹

1. Katchburian E, Arana-Chavez VE. *Histologia e Embriologia Oral: texto, atlas, correlações clínicas*. 4th ed.: Guanabara Koogan; 2017.
2. AAE. [Online].; 2023 [cited 2023 maio 05. Available from:"<https://www.aae.org>"]
3. Jung S, Mielert J, Kleinheinz J, Dammaschke T. Human oral cells' response to different endodontic restorative materials: an in vitro study. *Head Face Med*. 2014 Dec 23;10:55. doi: 10.1186/s13005-014-0055-4.
4. Giacomino CM, Wealleans JA, Kuhn N, Diogenes A. Comparative Biocompatibility and Osteogenic Potential of Two Bioceramic Sealers. *J Endod*. 2019 Jan;45(1):51-6. doi: 10.1016/j.joen.2018.08.007.
5. Granchi D, Stea S, Ciapetti G, Cavedagna D, Stea S, Pizzoferrato A. Endodontic cements induce alterations in the cell cycle of in vitro cultured osteoblasts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Mar;79(3):359-66. doi: 10.1016/s1079-2104(05)80230-6.
6. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod*. 1995 Jul;21(7):349-53. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80967-2.
7. Torabinejad M, Ford TR, Abedi HR, Kariyawasam SP, Tang HM. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. *J Endod*. 1998 Jul;24(7):468-71. doi: 10.1016/s0099-2399(98)80048-4. PMID: 9693572.
8. Washington JT, Schneiderman E, Spears R, Fernandez CR, He J, Opperman LA. Biocompatibility and osteogenic potential of new generation endodontic materials established by using primary osteoblasts. *J Endod*. 2011 Aug;37(8):1166-70. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.011
9. Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Hori K, Akamine A. Mineral trioxide aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expression and calcification in human periodontal ligament cells. *J Endod*. 2010 Apr;36(4):647-52. doi: 10.1016/j.joen.2009.12.024.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

10. Yuan Z, Peng B, Jiang H, Bian Z, Yan P. Effect of bioaggregate on mineral-associated gene expression in osteoblast cells. *J Endod.* 2010 Jul;36(7):1145-8. doi: 10.1016/j.joen.2010.03.025. Epub 2010 May 10.
11. McMichael GE, Primus CM, Opperman LA. Dentinal Tubule Penetration of Tricalcium Silicate Sealers. *J Endod.* 2016 Apr;42(4):632-6. doi: 10.1016/j.joen.2015.12.012.
12. Al-Haddad A, Che Ab Aziz ZA. Bioceramic-Based Root Canal Sealers: A Review. *Int J Biomater.* 2016;2016:9753210. doi: 10.1155/2016/9753210.
13. Jitaru S, Hodisan I, Timis L, Lucian A, Bud M. The use of bioceramics in endodontics - literature review. *Clujul Med.* 2016;89(4):470-3. doi: 10.15386/cjmed-612.
14. Kulinets I. Biomaterials and their application in medicine. Regulatory affairs for biomaterials and medical devices. In Kulinets I. Biomaterials and their application in medicine.: Materials Science, Biology; 2015. p. 1-10. doi: 10.1533/9780857099204.1.
15. Raghavendra SS, Jadhav GR, Gathani KM, Kotadia P. Bioceramics in endodontics - a review. *J Istanbul Univ Fac Dent.* 2017 Dec 2;51(3 Suppl 1):S128-S137. doi: 10.17096/jiufd.63659.
16. Roy M, Bandyopadhyay A, Bose S. Ceramics in bone grafts and coated implants. In Bose S, Bandyopadhyay A. Materials and devices for bone disorders.: Academic press; 2017. p. 265-314. doi: 10.1016/B978-0-12-802792-9.00006-9.
17. da Silva EJNL, Zaia AA, Peters OA. Cytocompatibility of calcium silicate-based sealers in a three-dimensional cell culture model. *Clin Oral Investig.* 2017 Jun;21(5):1531-6. doi: 10.1007/s00784-016-1918-9.
18. Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *Int Endod J.* 2010 Sep;43(9):769-74. doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01733.x.
19. De-Deus G, Canabarro A, Alves GG, Marins JR, Linhares AB, Granjeiro JM. Cytocompatibility of the ready-to-use bioceramic putty repair cement

iRoot BP Plus with primary human osteoblasts. *Int Endod J.* 2012 Jun;45(6):508-13. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.02003.x.

20. Castro-Raucci LMS, Teixeira LN, Oliveira IR, Raucci-Neto W, Jacobovitz M, Rosa AL, de Oliveira PT. Osteogenic cell response to calcium aluminate-based cement. *Int Endod J.* 2017 Aug;50(8):771-9. doi: 10.1111/iej.12682.

21. Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *J Endod.* 2014 Aug;40(8):1194-200. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.001.

22. Bortoluzzi EA, Niu LN, Palani CD, El-Awady AR, Hammond BD, Pei DD, Tian FC, Cutler CW, Pashley DH, Tay FR. Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. *Dent Mater.* 2015 Dec;31(12):1510-22. doi: 10.1016/j.dental.2015.09.020.
23. Gandolfi MG, Perut F, Ciapetti G, Mongiorgi R, Prati C. New Portland cement-based materials for endodontics mixed with articaine solution: a study of cellular response. *J Endod.* 2008 Jan;34(1):39-44. doi: 10.1016/j.joen.2007.09.001.
24. Gandolfi MG, Pagani S, Perut F, Ciapetti G, Baldini N, Mongiorgi R, Prati C. Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Nov;87(2):477-86. doi: 10.1002/jbm.a.31795.
25. Kapralos V, Böcker J, Vach K, Altenburger M, Proksch S, Karygianni L. On the biocompatibility of endodontic sealers. *Swiss Dent J.* 2022 Sep 5;132(9):586-97. Epub 2022 May 9.
26. Jacobson SM, von Fraunhofer JA. The investigation of microleakage in root canal therapy. An electrochemical technique. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1976 Dec;42(6):817-23. doi: 10.1016/0030-4220(76)90105-5.
27. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008 Nov;34(11):1291-301.e3. doi: 10.1016/j.joen.2008.07.028.

28. Beatty RG, Vertucci FJ, Zakariasen KL. Apical sealing efficacy of endodontic obturation techniques. *Int Endod J*. 1986 Sep;19(5):237-41. doi: 10.1111/j.1365-2591.1986.tb00484.x.
29. Gopikrishna V. *Grossman's endodontic practice*. 14th ed.: Wolters Kluwer; 2020.
30. Grossman LI, Oliet S, Del Rio CE. *Endodontic practice*: Lippincott Williams & Williams; 1988.
31. Manhart MJ. The calcium hydroxide method of endodontic sealing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1982 Aug;54(2):219-24. doi: 10.1016/0030-4220(82)90220-1.
32. Desai S, Chandler N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. *J Endod*. 2009 Apr;35(4):475-80. doi: 10.1016/j.joen.2008.11.026.
33. Gatewood RS. *Endodontic materials*. *Dent Clin North Am*. 2007 Jul;51(3):695-712, vii. doi: 10.1016/j.cden.2007.04.005.
34. Ho YC, Huang FM, Chang YC. Mechanisms of cytotoxicity of eugenol in human osteoblastic cells in vitro. *Int Endod J*. 2006 May;39(5):389-93. doi: 10.1111/j.1365-2591.2006.01091.x.

35. Wilson AD, Kent BE. A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. *Br Dent J.* 1972 Feb 15;132(4):133-5. doi: 10.1038/sj.bdj.4802810.

36. Lee CQ, Harandi L, Cobb CM. Evaluation of glass ionomer as an endodontic sealant: an in vitro study. *J Endod.* 1997 Apr;23(4):209-12. doi: 10.1016/S0099-2399(97)80047-7.

37. Moshonov J, Trope M, Friedman S. Retreatment efficacy 3 months after obturation using glass ionomer cement, zinc oxide-eugenol, and epoxy resin sealers. *J Endod.* 1994 Feb;20(2):90-2. doi: 10.1016/S0099-2399(06)81189-1.

38. Victoria-Escandell A, Ibañez-Cabellos JS, de Cutanda SB, Berenguer-Pascual E, Beltrán-García J, García-López E, Pallardó FV, García-Giménez JL, Pallarés-Sabater A, Zarzosa-López I, Monterde M. Cellular Responses in Human Dental Pulp Stem Cells Treated with Three Endodontic Materials. *Stem Cells Int.* 2017;2017:8920356. doi: 10.1155/2017/8920356.

39. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine.* 3rd ed.: Academic press; 2012. ISBN: 9780080877808.

40. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J.* 2017 Dec;50 Suppl 2:e31-e39. doi: 10.1111/iej.12780.

41. Rodrigues EM, Cornélio ALG, Mestieri LB, Fuentes ASC, Salles LP, Rossa-Junior C, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *Int Endod J.* 2017 Aug;50(8):780-9. doi: 10.1111/iej.12683.

42. USA B. Brassler USA Dental. [Online].; 2023 [cited 2023 Maio 06]. Available from: <https://brasselerusadental.com/wp-content/uploads/sites/9/2018/01/SDS-0001-EndoSequence-BC-Sealer-SDS-REVC.pdf>.

43. Angelus. Angelus Ind. [Online].; 2023 [cited 2023 Maio 06]. Available from: https://angelus.ind.br/assets/uploads/2019/12/1804240907_BIO-C-SEALER-Bula-ONLINE-0205032018.pdf.

44. Angelus. Angelus Ind. [Online].; 2023 [cited 2023 Maio 06]. Available from: <https://angelus.ind.br/assets/uploads/2019/12/Perfil-Tecnico-MTA-ANGELUS.pdf>.

45. Angelus. Angelus Dental. [Online].; 2023 [cited 2023 Maio 06]. Available from: https://www.angelusdental.com/img/arquivos/bula_bio_c_sealer_ion_022_022.pdf

46. Hirschberg CS, Patel NS, Patel LM, Kadouri DE, Hartwell GR. Comparison of sealing ability of MTA and EndoSequence Bioceramic Root Repair Material: a bacterial leakage study. *Quintessence Int.* 2013 May;44(5):e157-62.

47. Candeiro GTM, Lavor AB, Lima ITF, Vasconcelos BC, Gomes NV, Iglecias EF, Gavini G. Penetration of bioceramic and epoxy-resin endodontic cements into lateral canals. *Braz Oral Res.* 2019 May 27;33:e049. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0049.

48. Nagas E, Uyanik MO, Eymirli A, Cehreli ZC, Vallittu PK, Lassila LV, Durmaz V. Dentin moisture conditions affect the adhesion of root canal sealers. *J Endod.* 2012 Feb;38(2):240-4. doi: 10.1016/j.joen.2011.09.027.

49. Lovato KF, Sedgley CM. Antibacterial activity of endosequence root repair material and proroot MTA against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2011 Nov;37(11):1542-6. doi: 10.1016/j.joen.2011.06.022.

50. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2009 Jul;35(7):1051-5. doi: 10.1016/j.joen.2009.04.022.

51. Romeiro K, de Almeida A, Cassimiro M, Gominho L, Dantas E, Chagas N, Velozo C, Freire L, Albuquerque D. Reciproc and Reciproc Blue in the removal of bioceramic and resin-based sealers in retreatment procedures. *Clin Oral Investig.* 2020 Jan;24(1):405-16. doi: 10.1007/s00784-019-02956-3.

52. Donnermeyer D, Bürklein S, Dammaschke T, Schäfer E. Endodontic sealers based on calcium silicates: a systematic review. *Odontology.* 2019 Oct;107(4):421-36. doi: 10.1007/s10266-018-0400-3.

53. Vo K, Daniel J, Ahn C, Primus C, Komabayashi T. Coronal and apical leakage among five endodontic sealers. *J Oral Sci.* 2022 Jan 19;64(1):95-8. doi: 10.2334/josnurd.21-0433.

54. Camps J, Jeanneau C, El Ayachi I, Laurent P, About I. Bioactivity of a Calcium Silicate-based Endodontic Cement (BioRoot RCS): Interactions with Human Periodontal Ligament Cells In Vitro. *J Endod.* 2015 Sep;41(9):1469-73. doi: 10.1016/j.joen.2015.04.011.

55. Lee BN, Lee KN, Koh JT, Min KS, Chang HS, Hwang IN, Hwang YC, Oh WM. Effects of 3 endodontic bioactive cements on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J Endod.* 2014 Aug;40(8):1217-22. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.036.

56. Sanz JL, Rodríguez-Lozano FJ, Llena C, Sauro S, Forner L. Bioactivity of Bioceramic Materials Used in the Dentin-Pulp Complex Therapy: A Systematic Review. *Materials (Basel).* 2019 Mar 27;12(7):1015. doi: 10.3390/ma12071015.

57. de Faria LP, Sueyoshi G, de Oliveira TC, Holliday LS, Arana-Chavez VE. Effects of Alendronate and Dexamethasone on Osteoclast Gene Expression and Bone Resorption in Mouse Marrow Cultures. *J Histochem Cytochem.* 2022 Feb;70(2):169-79. doi: 10.1369/00221554211063519.

58. JAMOVI.org. The jamovi project. 2022. version 2.3.

59. Freshney RI, Capes-Davis A. *Freshney's Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications.* 8th ed.: Wiley-Blackwell;2021.

60. Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. *J Endod.* 2011 Jun;37(6):793-8. doi: 10.1016/j.joen.2011.02.029.

61. Guadarrama Bello D, Fouillen A, Badia A, Nanci A. A nanoporous titanium surface promotes the maturation of focal adhesions and formation of filopodia with distinctive nanoscale protrusions by osteogenic cells. *Acta Biomater.* 2017 Sep 15;60:339-349. doi: 10.1016/j.actbio.2017.07.022. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28728969.

62. Yuan Z, Wei P, Huang Y, Zhang W, Chen F, Zhang X, Mao J, Chen D, Cai Q, Yang X. Injectable PLGA microspheres with tunable magnesium ion release for promoting bone regeneration. *Acta Biomater.* 2019 Feb;85:294-309. doi: 10.1016/j.actbio.2018.12.017.

63. He LY, Zhang XM, Liu B, Tian Y, Ma WH. Effect of magnesium ion on human osteoblast activity. *Braz J Med Biol Res.* 2016 Jul 4;49(7):e5257. doi: 10.1590/1414-431X20165257.
64. Choi S, Kim KJ, Cheon S, Kim EM, Kim YA, Park C, Kim KK. Biochemical activity of magnesium ions on human osteoblast migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Oct 22;531(4):588-94. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.07.057.
65. Wang S, Sasaki Y, Ogata Y. Calcium hydroxide regulates bone sialoprotein gene transcription in human osteoblast-like Saos2 cells. *J Oral Sci.* 2011 Mar;53(1):77-86. doi: 10.2334/josnusd.53.77.
66. Wang S, Noda K, Yang Y, Shen Z, Chen Z, Ogata Y. Calcium hydroxide regulates transcription of the bone sialoprotein gene via a calcium-sensing receptor in osteoblast-like ROS 17/2.8 cells. *Eur J Oral Sci.* 2018 Feb;126(1):13-23. doi: 10.1111/eos.12392.
67. Kim EJ, Bu SY, Sung MK, Choi MK. Effects of silicon on osteoblast activity and bone mineralization of MC3T3-E1 cells. *Biol Trace Elem Res.* 2013 Apr;152(1):105-12. doi: 10.1007/s12011-012-9593-4.
68. Shao N, Guan Y, Liu S, Li X, Zhou D, Huang Y. A Multi-Functional Silicon Nanoparticle Designed for Enhanced Osteoblast Calcification and Related Combination Therapy. *Macromol Biosci.* 2019 Dec;19(12):e1900255. doi: 10.1002/mabi.201900255.
69. Castro-Raucci LMS, Teixeira LN, Oliveira IR, Raucci-Neto W, Jacobovitz M, Rosa AL, de Oliveira PT. Osteogenic cell response to calcium aluminate-based cement. *Int Endod J.* 2017 Aug;50(8):771-9. doi: 10.1111/iej.12682.
70. Castro-Raucci LM, Oliveira IR, Teixeira LN, Rosa AL, Oliveira PT, Jacobovitz M. Effects of a novel calcium aluminate cement on the early events of the progression of osteogenic cell cultures. *Braz Dent J.* 2011;22(2):99-104. doi: 10.1590/s0103-64402011000200002.
71. Chaterji S, Gemeinhart RA. Enhanced osteoblast-like cell adhesion and proliferation using sulfonate-bearing polymeric scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2007 Dec 15;83(4):990-8. doi: 10.1002/jbm.a.31283.

72. Thomas MV, Puleo DA, Al-Sabbagh M. Calcium sulfate: a review. *J Long Term Eff Med Implants*. 2005;15(6):599-607. doi:10.1615/jlongtermeffmedimplants.v15.i6.30.
73. Palmieri A, Pezzetti F, Brunelli G, Scapoli L, Lo Muzio L, Scarano A, Martinelli M, Carinci F. Calcium sulfate acts on the miRNA of MG63E osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008 Feb;84(2):369-74. doi: 10.1002/jbm.b.30880.
74. Carinci F, Piattelli A, Stabellini G, Palmieri A, Scapoli L, Laino G, Caputi S, Pezzetti F. Calcium sulfate: analysis of MG63 osteoblast-like cell response by means of a microarray technology. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004 Nov 15;71(2):260-7. doi: 10.1002/jbm.b.30133.
75. Ochoa-Rodríguez VM, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Guerreiro-Tanomaru JM, Spin-Neto R, Faria G. Addition of zirconium oxide to Biodentine increases radiopacity and does not alter its physicochemical and biological properties. *J Appl Oral Sci*. 2019 Apr 1;27:e20180429. doi: 10.1590/1678-7757-2018-0429.
76. Gomes Cornélio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):203-10. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.017.
77. Belal RS, Edanami N, Yoshiba K, Yoshiba N, Ohkura N, Takenaka S, Noiri Y. Comparison of calcium and hydroxyl ion release ability and in vivo apatite-forming ability of three bioceramic-containing root canal sealers. *Clin Oral Investig*. 2022 Feb;26(2):1443-51. doi: 10.1007/s00784-021-04118-w.

ANEXO A – Certificado de isenção da comissão de ética no uso de animais

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

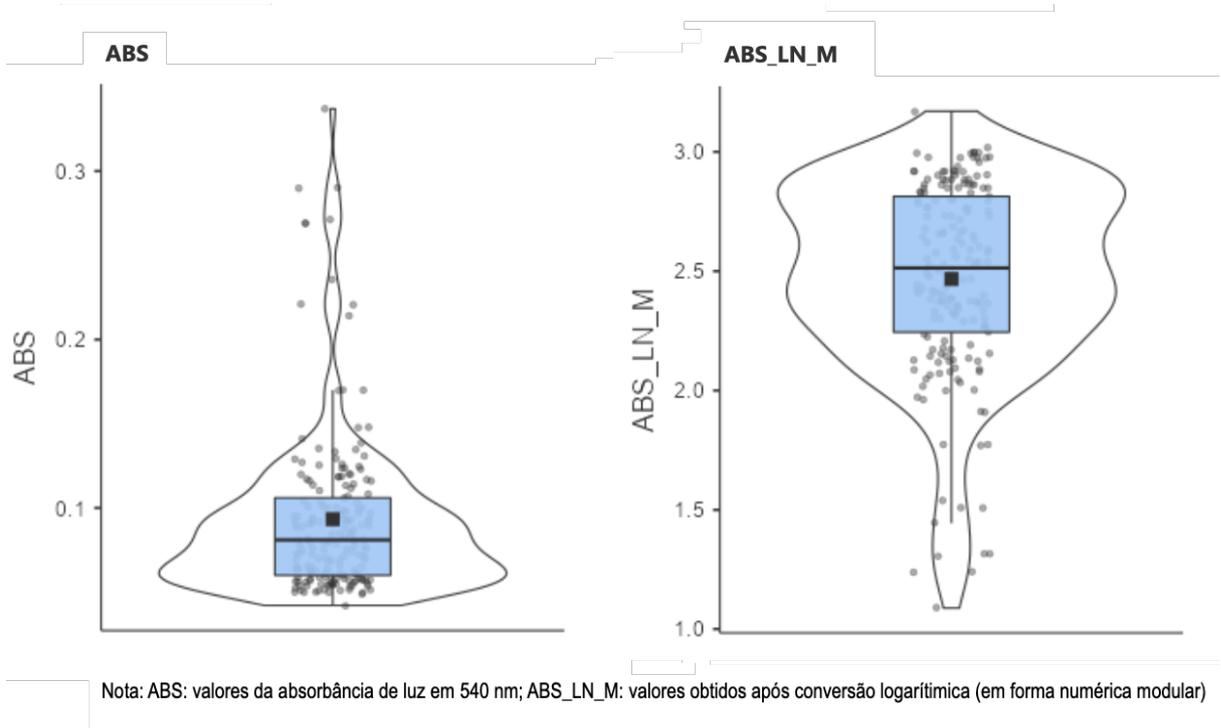
CERTIFICADO ISENÇÃO CEUA-FOUSP/014

Certificamos que o Protocolo CEUA/FOUSP N° 001/2023-I referente ao projeto intitulado: *"Biocompatibilidade e potencial indutor de diferentes cimentos endodônticos biocerâmicos. Análise em cultura de osteoblastos de camundongo."* sob a responsabilidade de execução do autor Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, foi analisado e considerado isento de análise da CEUA por utilizar material de origem animal: *linhagem celular imortalizada – MC3T3-E1*.

São Paulo, 13 de fevereiro de 2023.

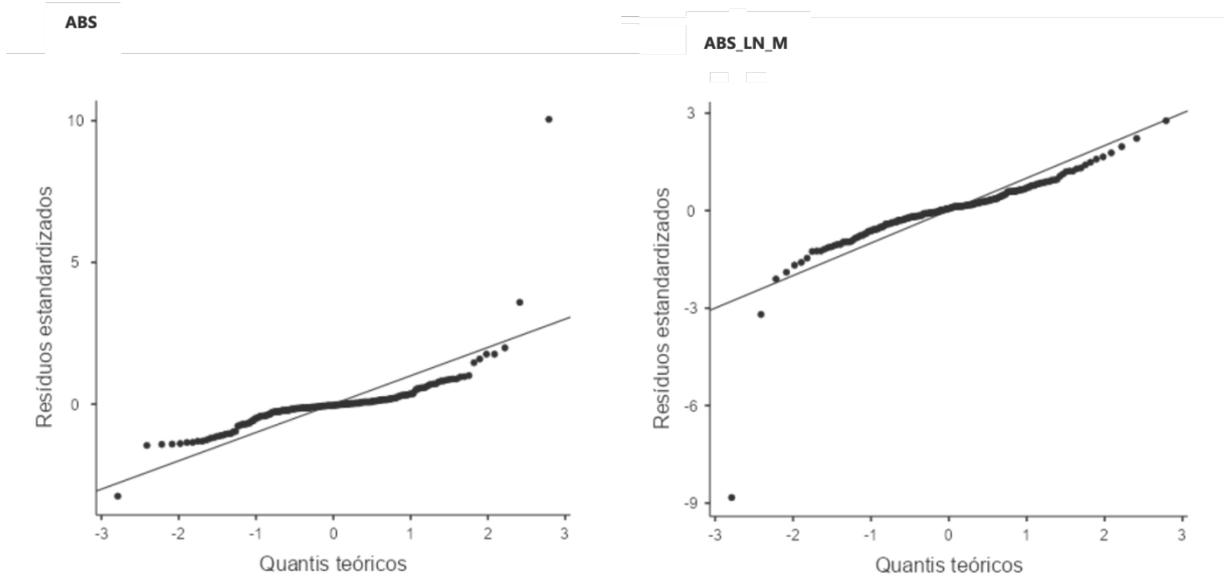
Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador da CEUA/FOUSP

ANEXO B – Análise estatística descritiva: gráficos box-plot demonstrando operação matemática logarítmica para avaliação de aderência a curva de normalidade.



Fonte: O autor.

ANEXO C – Análise estatística descritiva: gráfico Q-Q, comparação de quantis teóricos, demonstrando distribuição normal da amostra.



Nota: ABS: valores da absorvância de luz em 540 nm; ABS_LN_M: valores obtidos após conversão logarítmica (em forma numérica modular)

Fonte: O autor.