

**Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO**

Raffaella Sacchetti Estellita

Citotoxicidade de dois cimentos à base de silicato de cálcio

**Duque de Caxias
2017**

Raffaella Sacchetti Estellita

Citotoxicidade de dois cimentos à base de silicato de cálcio

Dissertação apresentada à Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy” como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Endodontia

Orientadores: Profa. Dra. Thais Accorsi-Mendonça

Prof. Dr. Edson Jorge Lima Moreira

Duque de Caxias

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE/BIBLIOTECA - UNIGRANRIO

E79c Estellita, Raffaella Sacchetti.
Citotoxicidade de dois cimentos à base de silicato de cálcio / Raffaella Sacchetti Estellita. - Duque de Caxias, 2017.
35 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado em Odontologia/Endodontia) – Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy", Escola de Ciências da Saúde, 2017.
"Orientadora: Profa. Dra. Thais Accorsi Mendonça".
"Orientador: Prof. Dr. Edson Jorge Lima Moreira".
Bibliografia.

1. Odontologia. 2. Endodontia. 3. Citotoxicidade. 4. Materiais dentários.
5. Cimentos dentários. I. Mendonça, Thais Accorsi. II. Moreira, Edson Jorge Lima. III. Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy". IV. Título.

CDD – 617.6

Raffaella Sacchetti Estellita

CITOTOXICIDADE DE DOIS CIMENTOS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO

Dissertação apresentada à Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy" UNIGRANRIO para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração:
Endodontia

Aprovada em 08 de março de 2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva
UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio

Prof. Dr. Marcelo Mangelli Decnop Batista
UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Victor Talarico Leal Vieira
UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio

Agradecimentos

A Deus, pelo dom da vida, estando em cada passo, me fortalecendo, ajudando a enfrentar cada obstáculo e por ter dado a oportunidade de mais uma etapa da minha história, que foi tão sonhada.

Aos meus pais, Mauricio Sacchetti (in memoriam) e Joilza Deccache Sacchetti (in memoriam) cada gesto de amor, dedicação, incentivo e trabalho na minha formação.

Aos meus filhos, Luiz Otávio Sacchetti Estellita e Iasmim Sacchetti Estellita (in memoriam), por mesmo sem querer terem me ensinado o que é o amor.

Ao meu irmão, Rafael de Oliveira Santos, por toda admiração, amizade e companheirismo, sua esposa, Danielle Cruz e meu sobrinho, Theo Cruz de Oliveira, que nos trouxe somente alegrias nos últimos 2 anos.

Ao meu marido, Laury Barreto Estellita, pela ajuda prestada ao longo destes 20 anos de união.

Aos amigos e familiares, em especial à minha prima, Janaina Azevedo Martins, que sempre esteve comigo na caminhada da vida e aos que, direta ou indiretamente, me apoiaram e estiveram torcendo pela minha vida e vitória.

Aos amigos do curso de mestrado, com os quais construímos laços verdadeiros de amizade, que fizeram toda diferença e que levarei para sempre em minha memória.

À prefeitura da cidade do Rio de Janeiro, coordenação de saúde bucal, o diretor do meu posto, Alexander Loures Esperança da Rocha, minha chefe, Hélida de Carvalho Parrini Frazão e aos demais da equipe do posto Oswaldo Cruz, que sempre incentivaram e me apoiaram ao longo destes dois anos.

Aos meus orientadores, Prof. Dr Edson Jorge Lima Moreira e Prof^a Dr^a Thais Accorsi Mendonça, com grande admiração por serem profissionais dedicados, sendo exemplos a serem seguidos. Obrigada por toda ajuda durante a elaboração deste trabalho.

Ao professor, amigo e dedicado Prof. Dr Emmanuel João Nogueira Leal da Silva, que sempre me ajudou com paciência, carinho e atenção em vários momentos do curso, não fazendo distinção de dia de semana e horário, sempre disposto a me responder com gentileza e que passei a admirar e confiar. Ele está guardado na minha memória, no meu coração e sou eternamente grata por sua participação calorosa na minha transformação em mestre.

Ao Prof. Dr. Victor Talarico Leal Vieira, que sempre foi muito educado, gentil, paciente, amigo e presente na nossa turma, sendo um verdadeiro companheiro.

À equipe de Endodontia da UNIGRANRIO, Prof. Oswaldo Henrique Souza Fonseca, Prof. Ricardo Guimarães de Carvalho, Prof. Dr Henrique dos Santos Antunes, por transmitirem suas experiências e conhecimentos, nos incentivando e demonstrando todo o seu amor pela especialidade.

Ao grande mestre inspirador e responsável pelo meu ingresso no mestrado, Prof. Dr. Gustavo André de-Deus Carneiro Vianna, que depositou confiança na minha capacidade quando me selecionou para o curso.

Ao meu amado e admirado, Prof. Dr Henrique Eduardo Oliveira, que me serviu de inspiração em autenticidade, amizade e que foi o responsável pelo meu amor pela Endodontia.

À professora de didática, Prof Dr^a Andrea Velloso da Silveira Praça , Prof. Dr Plínio Senna e a Prof. Dr^a Cláudia Pereira, que nos deram aula durante o mestrado e a todos os outros que também contribuíram com seus conhecimentos durante o curso.

Ao Prof. Dr. Marcelo Mangelli Decnop Batista, pela gentileza de participar da minha banca, dipondo seu tempo para enriquecer meu trabalho.

Aos funcionários da Universidade Unigranrio, em especial nossa secretária Andréia Fagundes, aos da clínica de mestrado, e todos em geral por tanta dedicação.

Aos funcionários do LAMP, em especial Ana Beatriz Machado e ao professor Leonardo Boldrin, do Labio/ Inmetro pela ajuda técnica científica.

As minhas auxiliares do consultório, Francisca Tatiana Martins e Márcia Cristina Fonseca Coelho, pelo suporte, amizade e carinho e a minha funcionária em casa, Andrea Lopes de Oliveira, que sempre me ajudou nos cuidados com meu filho e com a casa, possibilitando a realização deste curso.

Aos meus pacientes, pela paciência e confiança depositada em mim, entendendo meu afastamento e por nos dar a chance de aprendermos através da vivência clínica.

A Universidade do Grande Rio, instituição que proporcionou o nosso aprimoramento acadêmico e me diferenciou como profissional.

Muito obrigada!

“Quando se navega sem destino, nenhum vento é favorável”

Sêneca

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de exposição de dois cimentos à base de silicato de cálcio (MTA/Angelus e TheraCal LC/Bisco) sobre osteoblastos humanos imortalizados (linhagem Saos-2), quando comparado ao grupo controle, onde as células não foram expostas a nenhum extrato, somente ao meio convencional de cultura celular. A citotoxicidade dos cimentos foi determinada pela contagem de células viáveis utilizando-se o ensaio colorimétrico MTT. Utilizou-se o extrato dos cimentos de forma não diluída e um tempo experimental de contato com as células por 24 horas. Os resultados foram analisados estatisticamente através do software SPSS (versão 15.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) e testados para uma distribuição normal através do teste de Kolmogorov–Smirnov, e para as comparações entre grupos utilizou-se o ensaio ANOVA seguido de Bonferroni post-test. O cimento MTA não apresentou citotoxicidade quando comparado ao grupo controle ($P > 0.05$), já o cimento TheraCal foi citotóxico, demonstrando diferença estatisticamente significativa quando comparado ao MTA e ao grupo controle ($P < 0.05$). Conclui-se que, dentro das limitações do estudo, que o MTA branco apresentou menor citotoxicidade quando comparado ao TheraCal LC.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Materiais Endodônticos; MTA.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate MTA White and TheraCal LC cytotoxicity. Control group used was treated with conventional cellular medium. The cytotoxicity was determined by counting viable cells using the MTT colorimetric assay. The extract of the materials was used undiluted and an experimental contact time for 24 hours. Data from the MTT assay was performed using SPSS version 15.0 statistical software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Data were tested for normal distribution by the Kolmogorov–Smirnov test, and group comparisons were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-test. The results showed statistically significant differences between the materials tested ($P > 0.05$) and between the materials and the control group ($P > 0.05$). It is concluded that, within the limitations of the study, there is difference between a MTA cytotoxicity when compared to the TheraCal LC.

Key-words: Cytotoxicity; Endodontic Materials; MTA.

LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 01 | Apresentação comercial do A) MTA Branco (Angelus) e B) TheraCal LC (Bisco) | 22 |
| Tabela 01 | Composição química dos cimentos MTA Branco e TheraCal LC | 23 |
| Gráfico 01 | Citotoxicidade do Grupo Controle e Cimentos MTA Branco e TheraCal LM, através do ensaio colorimétrico MTT. | 26 |

LISTA DE NOTAÇÕES E ABREVIATURAS

| | |
|--------|---------------------------------------|
| ADA | American Dental Association |
| ANSI | American National Standards Institute |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| BisGMA | Metacrilato de bisfenol A-glicidilo |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| FDA | Foods and drugs administration |
| HEMA | HidroxietilMetacrilato |
| ISO | Internacional Standards Organization |
| PEGDMA | Polietileno glicol-dimetacrilato |
| TEDMA | Dimetacrilato de Trietileno Glicol |
| UDMA | Uretano-Dimetacrilato |

SUMÁRIO

| | | |
|----|--------------------------------------|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 3. | OBJETIVOS | 21 |
| 4. | MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| | 4.1. Materiais | 22 |
| | 4.2. Cultura celular | 23 |
| | 4.3. Preparo das amostras e extratos | 24 |
| | 4.4. Ensaio de citotoxicidade | 24 |
| | 4.5. Análise Estatística | 25 |
| 5. | RESULTADOS | 26 |
| 6. | DISCUSSÃO | 27 |
| 7. | CONCLUSÕES | 29 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 30 |

1. INTRODUÇÃO

O MTA foi desenvolvido em 1993, na Universidade de Loma Linda, sendo recomendado inicialmente como um cimento retrobturador e, posteriormente, utilizado para outras indicações clínicas como o revestimento de polpa em capamento direto e indireto, pulpotomia, apicificação, formação de barreira apical em dentes com ápices abertos, reparação de perfurações radiculares ou reabsorções radiculares (Parirokh & Torabinejad, 2010, Siew *et al.*, 2015, Al Haddad *et al.*, 2016).

O MineralTrióxido Agregado (MTA) é um pó que contém trióxidos e partículas hidrófilas, que se fixam na presença de umidade, altamente biocompatível, com ausência de resposta inflamatória e a formação da ponte dentinária (Bosso-Martelo *et al.*, 2016). São compostos, semelhantes ao cimento tipo Portland (Estrela *et al.*, 2000) são anidros que em contato com água geram compostos anidros menos ou mais solúveis. O composto solúvel formado mais representativo é a hidróxido de cálcio, sendo esta solubilidade a causa principal da degradação do cimento endurecido (Petrucci, 1998: WHD, 2017). O hidróxido de cálcio formado é responsável pela característica de pH altamente alcalino (aproximadamente 10.2 a 12.5), o que proporciona liberação de íons cálcio, indução indireta no processo de mineralização e atividade antimicrobiana (Gomes-Filho *et al.*, 2009; Torabinejad & Parirokh, 2010). Apresentam baixa resistência à compressão, boa radiopacidade e propriedades antibacterianas (Poggio *et al.*, 2014).

Suas desvantagens são alterações de cor dos tecidos dentários em contato com compostos de bismuto, o seu radiopacificador, (Marciano *et al.*, 2014) e dificuldade de manipulação, por ser um material arenoso e seco, (Marciano *et al.*, 2016). A desvantagem do longo tempo de presa (inicialmente mensurado em 2 horas e 30 minutos) foi alterada para o produto MTA Branco (Angelus) para 15 minutos. A razão para tal extrema diminuição no tempo de presa pode estar vinculada à adição de cloreto de cálcio ou à ausência ou pouca quantidade de sulfato de cálcio, que é um retardador de presa (Bortoluzzi *et al.*, 2006).

Na busca pelo melhoramento das características desfavoráveis do MTA, foram lançados novos biomateriais, como o cimento biocerâmico TheraCal LC (Bisco, Chicago, IL, EUA). TheraCal LC, abreviação para *Light Cure*, é cimento com silicato de cálcio modificado por resina fotopolimerizável, sendo apresentado pelo fabricante como um cimento com 45% de cimento tipo Portland (silicato tricálcico) imerso em

Um material à base de silicato de tricálcio, curável à luz, permite a imediata sobreposição com compósitos de resina, no entanto, Manojlovic *et al.*, 201 afirmaram que monómeros residuais e outras substâncias à base de resina podem reduzir a biocompatibilidade através do contato direto com tecidos orais. Desta forma, o objetivo desta dissertação foi avaliar *in vitro* os possíveis efeitos citotóxicos dos biomateriais MTA Branco e TheraCal LC, em contato direto e por 24 horas com osteoblastos humanos imortalizados (linhagem Saos-2).

2. REVISÃO DE LITERATURA

TheraCal LC (Light Cure)

Buscando novos materiais, com amplitude de indicações clínicas e de boas características físicas, químicas e biológicas, o TheraCal (Bisco Inc, Chicago, IL, EUA) consiste em um pasta simples contendo óxido de cálcio, partículas de silicato de cálcio (cimento de Portland tipo III), vidro, sílica, Sulfato de bário, zirconato de bário como radiopacificador e monômeros resinosos contendo Bis-GMA and PEGDMA (Suh *et al.*, 2008). De acordo com o fabricante, possui fácil manipulação, grande liberação de íons cálcio, pouco solúvel e com alta radiopacidade. Suas indicações clínicas incluem o revestimento direto e indireto da polpa, funcionando como uma barreira protetora do complexo dentina-polpa e como revestimento protetor sob compósitos, amálgamas, cimentos e outros materiais de base.

2.1 Propriedades mecânicas e físico-químicas

Gandolfi *et al.*, em 2012, avaliaram as propriedades físico-químicas do TheraCal LC (Bisco, Chicago, IL, EUA) quando comparado ao MTA Pro Root (Dentsply, Tulsa, EUA) e Dycal (Dentsply, Tulsa, EUA). Os grupos controles foram delineados com MTA pois o TheraCal LC apresenta em sua composição grande proporção de cimento tipo Portland (45%- silicato tricálcico) imersos em monômeros hidrofílicos; e o cimento de revestimento Dycal que apresenta-se como padrão clínico para revestimentos direto ou indireto da polpa. Os resultados observados indicaram que o material TheraCal liberou significativamente mais íons cálcio quando comparado aos outros materiais, com alcalinização do fluido circundante inicialmente até aproximadamente pH 10-11 (3h-3 dias) e subsequentemente a pH 8-8,5 (7- 28 dias). A solubilidade do TheraCal foi significativamente menor do que Dycal e ProRoot MTA. Após a fotopolimerização de 20 segundos, o TheraCal apresentou aproximadamente 1,7 mm de espessura de material com presa, bem como sua radiopacidade apresentou-se abaixo da 6876. Theracal provou ser um material de lixiviação iônica liberando íons cálcio e hidroxila durante o período experimental de 28 dias. Os resultados deste estudo sugerem que o biomaterial TheraCal é capaz de promover e sustentar a liberação de íons cálcio em seu sítio clínico mesmo na

presença de umidade. Os resultados do ensaio de absorção de água mostraram que a resina hidrofílica na formulação TheraCal permite absorção de água, a qual é a provável responsável pelo início da reação de hidratação das partículas de cimento Portland, com subsequente formação de hidróxido de cálcio. Os autores especularam sobre a capacidade antimicrobiana do TheraCal visto a constante dissociação iônica do hidróxido de cálcio (subproduto formado). Contudo ensaios microbianos não foram realizados neste estudo para tal inferência.

Camilleri *et al.*, 2014, realizaram um estudo para avaliar a hidratação de Biodentine® (BD, Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, França), Theracal LC® (Bisco Inc, Schaumburg, IL) e um protótipo de material à base de silicato tricálcico (Mineral Research ProMeyzieu, França) com 20% de óxido de zircônio (ZrO₂;Sigma-Aldrich, Buchs, Alemanha). O biomaterial Biodentine é composto de cimento de silicato tricálcico, óxido de zircônio e carbonato de cálcio, que, quando misturados com água, devido ao cloreto de cálcio ser um polímero solúvel em água, toma presa em 12 minutos, formando hidróxido de cálcio como um subproduto da hidratação. Apresenta-se como um cimento bioativo, aumentando a proliferação celular e biomineralização. Além disso, induz a liberação de fator de crescimento TGF-Beta1 de células de polpa humana e mineralização de polpa dentária precoce, exibindo uma ponte dentinária completa e ausência de resposta inflamatória da polpa. Theracal LC é um material à base de cimento Portland modificado com resina fotopolimerizável. Estes monómeros de resina podem causar reações adversas da polpa. Além disso, Theracal LC não tem água na sua formulação, dependendo da água retirada do ambiente e sua difusão dentro do material. O estudo foi realizado em seis espécimes cilíndricos de 10 mm de diâmetro e 2 mm de altura e os cimentos foram deixados para tomar presa: 1 hora para o material do protótipo, 12 minutos para Biodentine, e imediatamente para Theracal porque tomou presa através da luz (fotopolimerizável). Após preparos, a extensão de hidratação foi avaliada por espectroscopia dispersiva de energia (EDS) com a hidratação em solução salina Hank's equilibrada durante 14 dias. A extensão da hidratação foi comparada com a hidratação do material quando utilizada como capeamento direto de polpa direta usando uma cultura de dente modelo. A atividade material também foi avaliada por análise de difração de Raio-X para investigar a deposição de hidróxido de cálcio pelos materiais. A lixiviação de íons cálcio em solução de sal equilibrada de Hank foi avaliada por cromatografia de íons. O Theracal LC exibiu subproduto de ação em

torno das partículas de cimento não hidratado, mas menor que a Biodentine e o cimento protótipo. A microestrutura de Theracal LC após o tampamento da polpa foi diferente do material armazenado em contato com a solução fisiológica. A reação nas bordas no material em contato com a solução foram mais extensas, mostrando mais reação material *in vitro*. Na maior parte do material, houve pouco ou nenhum subproduto de reação. Em contato com a dentina, o material havia, principalmente, partículas de radiopacificador em uma matriz de resina. Houve reação mínima em contacto com a câmara de polpa. Na difração de Raios-X, o Theracal LC não apresentou picos de hidróxido de cálcio. Todos os materiais apresentaram picos para silicato tricálcico e o Theracal LC apresentou picos para zirconato de estrôncio e de bário. Biodentine exibiu a maior liberação de íons cálcio em solução quando comparado com os outros materiais e o Theracal LC apresentou a menor. Como Theracal LC é modificado com resina, não utiliza água no fluido de mistura, a sua hidratação depende da captação de fluido através da matriz de resina do ambiente. A liberação elevada de íons cálcio foi demonstrada *in vitro*, onde é armazenada em uma solução onde a captação de fluido pode ocorrer. Dentro condições de cobertura de polpa, não há suficiente umidade para permitir hidratação do silicato tricálcico. Mesmo quando em contato com vários mililitros de solução, o Theracal LC apresentou menor concentração de lixiviação de íons de cálcio, quando comparado com Biodentine, além dos íons cálcio lixiviados não estarem na forma de hidróxido de cálcio, o que foi mostrado na análise de difração de raios-X. A capacidade de libertação de cálcio de Theracal LC mostrou-se limitada.

Camilleri, em 2014, evidenciou que cimentos à base de sílica tricálcica curável à luz são indicados para uso como revestimento sob restaurações compostas para obter uma ligação entre as camadas de materiais, reduzindo assim a microinfiltração. O MTA misturado com água cria uma interface entre o material e compósitos restauradores pois materiais à base de silicato de cálcio têm sido afetados negativamente pelo ataque ácido. A corrosão ácida afetou a resistência à compressão e a microdureza superficial destes tipos de cimento, sendo indicado adiar os procedimentos restauradores durante pelo menos 96 horas após misturar MTA. O material à base de silicato de tricálcio, curável à luz, permite a imediata sobreposição com compósitos de resina. O autor relata neste trabalho que os sistemas de fotopolimerização propostos têm exibido pH alcalino, libertação de íons cálcio, formação de apatita e grupos funcionais capazes de quelar os íons cálcio. A adição

de resinas epoxi ao MTA aumenta o fluxo de material e melhora as características de manuseio. Os materiais à base de silicato tricálcico incluem radiopacificadores a serem detectados radiograficamente. O MTA tem óxido de bismuto. O objetivo desta pesquisa foi investigar a hidratação e caracterizar o silicato tricálcico puro ao qual se adicionou radiopacificadores e veículos líquidos. Os materiais utilizados neste estudo incluíram cimento silicato de tricálcio puro (Mineral Research Processing, Meyzieu, França) com 20% óxido de zircônio (ZrO₂, Sigma-Aldrich, Buchs, Alemanha); TCS-Zr e Cimento de silicato tricálcico com 20% de zirconato de bário (TCS-BaZr; Mineral Research Processing) foram ambos desenvolvidos na Universidade de Malta. Os cimentos foram misturados com água, resina epoxi, ou uma resina à base de Bis-GMA curada à luz. Após a imersão em solução salina equilibrada de Hank (HBSS) durante 28 dias foram investigados por microscopia de espécimes polidos e análise de difração de Raios-X. A bioatividade e a microestrutura superficial de cimentos imersos em HBSS ou água também foram técnicas semelhantes, juntamente com a lixiviação em solução investigada por plasma indutivamente acoplado por espectroscopia de emissão. Nos veículos de resina foi observado redução da hidratação do cimento porque não haviam bordos de reação visíveis em torno das partículas de cimento e não foi detectado hidróxido de cálcio. Embora não houvesse evidência de hidratação, os veículos com resinas curáveis por luz, o hidróxido de cálcio foi lixiviado em solução. O tipo e a composição da resina e do radiopacificador afetam capacidade de liberação de cálcio e bioatividade de cimentos de silicato tricálcico. As resinas à base de Bis-GMA curadas à luz estimularam a lixiviação de íons de cálcio em solução e promoveu a deposição superficial de fosfato de cálcio.

Cantekin, em 2015, avaliou diferentes materiais com indicação para capeamento pulpar e a sua associação com diferentes materiais restauradores em relação a resistência adesiva. Os materiais restauradores foram em compósitos à base de metacrilato, compósitos à base de silorano e cimento de ionômero de vidro e os materiais capeadores em TheraCal LC (Bisco, Chicago, EUA) em comparação com o MTA. Blocos de acrílico foram utilizados e após o preparo com a subdivisão das amostras, cada bloco foi fixado a uma máquina de ensaio universal para verificar a resistência ao cisalhamento, bem como as superfícies fraturadas foram observadas em lupa estereoscópica em magnificação de 25 vezes. Os resultados evidenciaram

que o TheraCal apresenta-se como um material capeador com melhores resultados frente ao MTA, quando utilizando como capeador.

Em 2016, Gong & França, avaliaram características químicas de quatro biomateriais utilizados na situação clínica de um capeamento direto, ou seja, quando há uma exposição pulpar, ou seja, uma relação direta entre o material e as células do tecido conjuntivo pulpar. Os grupos foram divididos entre G1) Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-fossés Cedex, França), G2) ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa, York, PA, EUA), G3) Dycal (Dentsply Tulsa, York, PA, EUA) e G4) TheraCal (Bisco, Chicago, IL, EUA). O grupo G3) Dycal foi considerado como controle, visto que o hidróxido de cálcio apresenta-se como um material amplamente utilizado e com maior número de pesquisas. Com um número amostral de 5 (cinco) elementos para cada grupo, todos os biomateriais foram preparados de acordo com o fabricante. Os métodos de análise química incluíram: A) espectroscopia fotoelétrica de raios-X (XPS), B) espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e C) espectroscopia de Raios-X por dispersão em energia. Os resultados apresentados pelos autores demonstraram que para todos os materiais estudados, a concentração de cálcio na superfície e em seu interior apresentou diferença estatisticamente significativa. Foram encontrados nos biomateriais traços dos seguintes elementos (<1%): Biodentine (Titânio-Ti/ metais de transição, Enxofre-S/ não metais, Zircônio-Zr/ metais de transição); MTA ProRoot e TheraCal (Bismuto-Bi/ outros metais) e Dycal (Sódio-Na/ metais alcalinos, Fósforo-P/ não metais, Zinco-Zn/ metais de transição e Nitrogênio-N/ não metais). Os resultados da espectroscopia fotoelétrica de raios-X evidenciou que a presença de cálcio na camada superficial pode variar de 0 a 18%, dependendo do material. Foram encontrados carbonos alifáticos, ou seja, que não contém anéis aromáticos, a partir das reações de polimerização, para mascarar os outros componentes, especialmente em Dycal e TheraCal. Ainda os autores exploram o significado clínico desta análise química de biomateriais que terão contato direto com o tecido pulpar, visto que a interação célula-biomaterial determina uma resposta pulpar. O principal efeito desejado é a liberação de cálcio e materiais com alta concentração de cálcio, podem proporcionar melhores resultados clínicos. Apesar das limitações existentes neste estudo, os autores apresentam, em ordem crescente, a quantidade de cálcio presente na superfície: Biodentine, MTA ProRoot, Dycal e TheraCal.

O desenvolvimento de materiais capeadores a base de silicato de cálcio a fim de associar as propriedades benéficas do MTA, produziu diferentes materiais como o cimento reparador endodôntico TheraCal LC fotopolimerizável e o Biodentine (Septodont, Saint-maur-des-Fosses, França) no qual foi adicionado o aditivo cloreto de cálcio. Nielsen et al., em 2016, estudaram as propriedades mecânicas como força de compressão, resistência à flexão e módulo de flexão de diferentes materiais capeadores como o TheraCal LC e Biodentine, em comparação aos materiais padrão: MTA e hidróxido de cálcio. Os espécimes foram testados, utilizando-se uma máquina de ensaio universal após 15 minutos, 3 e 24 horas. TheraCal LC teve maior resistência inicial para potencialmente resistir à fratura durante a colocação imediata de um material restaurador final. A Biodentine apresentou maior rigidez após 3 horas para potencialmente proporcionar um melhor suporte de uma restauração sobreposta em função ao longo do tempo.

Deepa *et al.*, 2016, ressaltam que o uso de forros bioativos sob resina composta é clinicamente vantajoso, uma vez que são biologicamente bem tolerados pelo tecido pulpar e têm capacidade de remineralização comparativamente maior. O sucesso de restaurações dependem não apenas da resistência adesiva do revestimento, como também sobre a qualidade do vínculo entre o forro e a resina composta restauradora. TheraCal LC é um agregado de trióxido mineral curado à luz, composto de cimento de silicato de cálcio modificado com resina. Segundo os autores, ele mostra adesão físico-química à dentina e é bem tolerado por células odontoblastas imortalizadas. O estudo foi realizado com trinta dentes extraídos por motivos periodontais foram divididas aleatoriamente em três grupos: Grupo A – TheracalLC (Bisco Inc, Schamburg, IL, EUA), Grupo B -Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fossés, Creteil, França) e Grupo C-Fuji II LC, GC Corporation, Tóquio, Japão), Nestes foram feitas cavidades oclusais (6 mm de diâmetro e 2 mm de altura) foram montados em blocos acrílicos e divididos em três grupos de 10 amostras cada, com base no revestimento utilizado como Grupo A , Grupo B e Grupo C. O pino composto de 3 mm de diâmetro e 3 mm de altura foi então ligado a cada amostra utilizando adesivo universal. A análise de resistência à ligação por cisalhamento (SBS) foi realizada a uma velocidade de cruzamento de 1 mm / min. TLC / BD libera íons de cálcio e de silício para a dentina subjacente e a sílica é um indutor mais forte para a remineralização da matriz. Neste estudo, Theracal conseguiram força de ligação adequada para suportar forças da resina composta sobreposta devido à

presença de uma matriz de resina. Além disso, a restauração composta pode ser colocada imediatamente sobre o TheraCal completando o procedimento em sessão única.

2.2. Propriedades biológicas

Hebling *et al.*, em 2009, iniciaram os estudos de citotoxicidade para novos materiais indicados como capeadores pulpares, os quais apresentam-se como inovadores por possuírem em sua composição silicato de cálcio na tentativa de agrupar as adequadas características do MTA. Foram estudados os seguintes materiais: TheraCal LC, Vitrebond e Ultrabond Plus. O ensaio de citotoxicidade colorimétrico MTT foi utilizado, e a metodologia complementada com microscopia eletrônica de varredura para a análise da morfologia celular. A cultura celular utilizada foi a cultura primária advinda da polpa dentária humana. Os períodos experimentais de contato com a elução do cimento reparador com as células foi de 24 e 7 dias. Em ambos períodos, houve morte celular e com diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle, no qual as células foram imersas somente em meio e cultura convencional. Para o novo material TheraCal LC, a citotoxicidade cresceu ao longo do tempo experimental (31,5% para 24 horas e 45,9% para 07 dias), contudo sem alterações celulares para as células viáveis restantes. Os autores discutiram que a grande e constante liberação de cálcio, bem como a citotoxicidade dos adesivos presentes na composição do TheraCal LC podem ser fatores que expliquem a morte celular crescente ao longo do tempo.

Em 2014, Poggio *et al.*, em 2014, os quais avaliaram a citotoxicidade e atividade antimicrobiana de seis diferentes materiais indicados para capeamento pulpar: Dycal (Dentsply, York, Pensilvânia, EUA), Calcicur (Voco, Guxhaven, Alemanha), Calcimol LC (Voco, Guxhaven, Alemanha), TheraCal LC (Bisco, Chicago, IL, EUA), MTA Angelus (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil), and Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, França). O ensaio de citotoxicidade foi realizado com odontoblastos de ratos imortalizados (linhagem MDPC-23) através do ensaio colorimétrico MTT (brometo de difeniltetrazólio) e de apoptose em diferentes tempos experimentais. Na avaliação da atividade antimicrobiana, os materiais foram expostos *in vitro* a

Streptococcus mutans, *Streptococcus salivarius*, e *Streptococcus sanguis* no teste de difusão de ágar. Tanto os halos de inibição bacteriana como os resultados da citotoxicidade foram significativamente diferentes entre os materiais de acordo com a diversidade na composição. Produtos a base de MTA evidenciaram menores valores de citotoxicidade e atividade antimicrobiana, enquanto que os materiais a base de hidróxido de cálcio apresentaram alta atividade antimicrobiana, mas também alto poder citotóxico.

Em 2015, Bortoluzzi *et al.*, analisaram a viabilidade e diferenciação osteogênica, de células tronco de polpa humana (hDPSCs), frente a novos biomateriais com silicato de cálcio introduzidos no mercado quando comparados ao MTA (Angelus, Paraná, Brasil). Foram escolhidos os cimentos Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-fossés Cedex, França) e TheraCal (Bisco, Chicago, IL, EUA). O potencial osteogênico das células hDPSCs, expostas aos diferentes grupos experimentais, foi analisado frente a expressão de genes osteogênicos, através do ensaio de qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real-quantitativo) e análise da atividade de fosfatase alcalina, coloração de *Alizarin Red S* e microscopia eletrônica de transmissão para depósitos de cálcio extracelulares. Os resultados demonstraram que a porcentagem de células não-apoptóticas saudáveis foram baixas, ou seja, todos os cimentos foram citotóxicos. Contudo, MTA e Biodentine apresentaram melhores resultados. Os resultados ainda demonstram efeitos citotóxicos tempo e concentração dependentes para Biodentine e TheraCal. Os autores ressaltam ainda que mesmo com as vantagens do TheraCal, como fácil manipulação e maior liberação de íons cálcio, os materiais MTA e Biodentine apresentaram-se menos citotóxicos, sendo esta toxicidade dependente da concentração. A citotoxicidade inicial pode ser atribuída aos altos valores de pH dos cimentos de silicato de cálcio. Para a diferenciação osteogênica, obteve-se valores aumentados após a exposição celular ao Biodentine, sendo este efeito menor observado em relação ao TheraCal, embora ambos os cimentos apresentaram melhor mineralização extracelular. Os resultados enzimáticos e de mineralização extracelular sugerem que a taxa de formação de tecido mineralizado pode ser dificultada quando o TheraCal é utilizado.

Manojlovic *et al.*, em 2017, avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade de um novo monômero baseado em uretano FIT-852 e fotoiniciador de óxido de monoacilfosfina (Lucirin TPO) com monômeros convencionais como bisfenol A-

glicidilmetacrilato (BisGMA) e dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) e sistema fotoiniciador de canforquinona (CQ)/amina, respectivamente. Os monômeros foram avaliados de forma individual e combinado. A citotoxicidade foi realizada através do ensaio colorimétrico MTT utilizando-se fibroblastos de origem pulmonar (linhagem MRC-5). As substâncias individuais apresentaram efeitos citotóxicos decrescentes na seguinte ordem: BisGMA> TPO> FIT> CQ> TEGDMA. Inversamente o fotoiniciador TPO (fotoiniciador de óxido de monoacilfosfina) foi significativamente mais citotóxico e genotóxico. O biomaterial TheraCal LC apresenta como monômero a combinação de Bis-GMA e PEGDMA (Suh et al. 2008).

3. OBJETIVOS

Avaliar a citotoxicidade, em osteoblastos humanos imortalizados/ linhagem Saos-2, dos cimentos MTA Angelus e TheraCal LC através do ensaio colorimétrico MTT.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Para este estudo, foram escolhidos dois cimentos reparadores à base de silicato de cálcio: MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) e TheraCal LC (Bisco, Chicago, IL, EUA). De acordo com o fabricante, o MTA (Figura 01A) é um cimento reparador composto de óxidos minerais hidrofílicos e com água destilada como agente de união (Tabela 01). O TheraCal LC (Figura 01B) apresenta-se como um material fotopolimerizável, no formato de bisnaga, composta de partículas de silicato tricálcico imersas em monômero hidrofílico (Tabela 01).

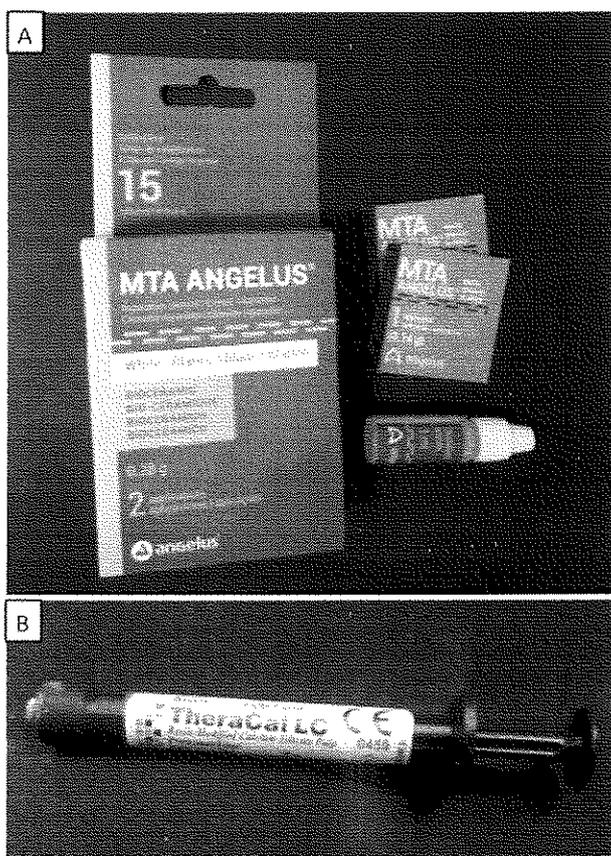


Figura 01: Apresentação comercial do A) MTA Branco (Angelus) e B) TheraCal LC (Bisco)

Tabela 01: Composição química dos cimentos MTA Branco e TheraCal LC

| Cimentos | Composição |
|---|--|
| MTA | <i>Pó: Silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, óxido de bismuto (radiopacificador).</i> <i>Líquido: Água destilada</i> |
| TheraCal LC (Light Cure) Fotopolimerizável | <i>Bisnaga contendo partículas de silicato tricálcio tricálcico imersas em um monômero hidrofílico. A resina apresenta-se em um componente hidrofóbico: uretano-dimetacrilato (UDMA), metacrilato de bisfenol A-glicidilo(BisGMA) e dimetacrilato de trietileno glicol (TEGDMA) e um componente hidrofílico: hidroxietilMetacrilato (HEMA) e polietilenoglicol dimetacrilato (PEGDMA).</i> |

4.2. Cultura Celular

Células osteoblásticas humanas (linhagem Saos-2) foram obtidas através da ATCC (American Type Culture Collection) e cultivados em meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle medium/ Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS/ Gibco, Grand Island, NY, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 mg/mL de penicilina. As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. As células confluentes foram tripsinizadas com 0,25% de tripsina e 0,05% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Gibco, Grand Island, NY, USA) por 5 minutos e posteriormente as alíquotas foram replaqueadas. Para o ensaio experimental, as células foram plaqueadas em uma concentração de 5x 10⁴ células por poço em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) para atingir a confluência de aproximadamente 80%. Após o cultivo celular por 24 horas, ou seja, com as células aderidas, as mesmas foram expostas diretamente por 24 horas ao extrato não

diluído, feito com os cimentos experimentais, como descrito abaixo no tópico preparo das amostras. O grupo controle não foi exposto ao extrato, sendo utilizado o meio DMEM convencional

4.3 Preparo das amostras

Foram escolhidos dois cimentos endodônticos reparadores: MTA Angellus (Angellus Londrina, Paraná, Brasil) e TheraCal LC (Bisco, Chicago, IL, EUA). Sob condições assépticas, dentro do fluxo laminar, os cimentos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. O MTA foi manipulado em placa de vidro e o TheraCal foi fotopolimerizado por 20 segundos com fotopolimerizador (Gnatus, Brasil) e inseridos em anéis de teflon medindo 5 mm de diâmetro e 2mm de altura, segundo preconizado pela norma ISO 10993-5. Após a inserção dos cimentos nos anéis, os mesmos foram mantidos por 24 horas em estufa a 37°C para o tempo de presa. Após 24 horas e com o cimento já com presa inicial, os anéis de teflon foram removidos e cada molde de cimento foi acomodado em poços de placas de 48 poços e inserido 1,5 mL de meio DMEM suplementado em cada poço a fim de produzir um extrato do cimento. Esses extratos foram mantidos em estufa a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, o extrato de cada grupo foi removido e armazenado em temperatura de -20°C.

4.4 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade utilizado foi o colorimétrico quantitativo MTT. Os osteoblastos Saos-2 foram expostos aos extratos dos cimentos não diluídos por 24 horas. Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e em cada poço celular foi adicionado 0,1 mL da solução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide/ Sigma, St Louis, MO, EUA) preparada com a concentração de 0,5 mg/mL, e mantidos durante 2 horas a 37°C. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e os cristais de formazan resultantes da redução do MTT foram dissolvidos em 0,1 mL de DMSO puro. As placas foram agitadas por 05 minutos e incubadas por 5 minutos para estabilização da cor. a absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro automático (EPOCH; Biosystems, Curitiba, PR, Brazil) a um comprimento de onda de 540nm

4.5. Análise Estatística

Os dados advindos do ensaio de MTT foram analisados utilizando-se o software para estatística SPSS versão 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA). Os dados foram testados em uma distribuição normal pelo teste de Kolmogorov–Smirnov test, e as comparações entre grupos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. Todos os valores foram apresentados como média e desvio padrão. O valor de P considerado significativo foi de <0.05 .

5. RESULTADOS

Os resultados do ensaio MTT estão representados no Gráfico 01. O cimento MTA não apresentou citotoxicidade quando comparado ao grupo controle ($P > 0.05$), já o cimento TheraCal foi citotóxico, demonstrando diferença estatisticamente significativa quando comparado ao MTA e ao grupo controle ($P < 0.05$).

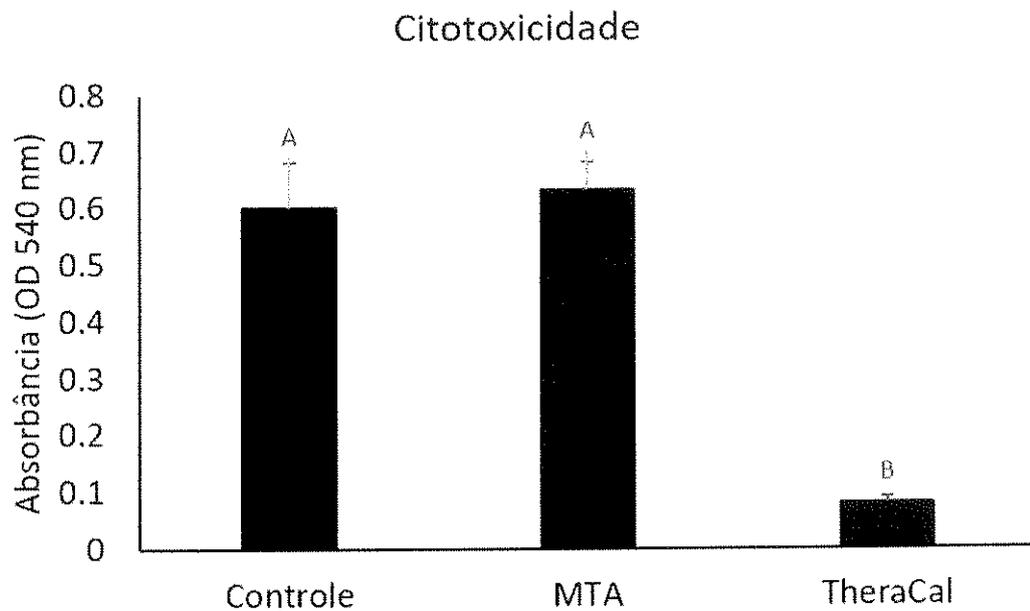


Gráfico 01: Representação dos resultados de citotoxicidade dos cimentos experimentais (ensaio MTT).

6. DISCUSSÃO

A escolha da metodologia de citotoxicidade, baseada na eluição de cimentos e ensaios colorimétrico MTT recai sobre a indicativa que novos materiais, como o caso do TheraCal LC (patenteado por Shu *et al.*, 2008) devem passar por uma avaliação da compatibilidade biológica, recaindo sobre ensaios *in vitro*- Fase 01 (Granjeiro & Soares, 2011). Para tal, podem ser utilizados diferentes tipos celulares. Em nosso estudo, a escolha de osteoblastos recai sobre a hipótese de mimetização do ambiente perirradicular com a presença do osso alveolar (Perinpanayagam *et al.*, 2009).

Em nossos resultados de citotoxicidade, a partir de osteoblastos humanos imortalizados, o cimento MTA não apresentou citotoxicidade quando comparado ao grupo controle ($P > 0.05$), o que corrobora com outros pesquisadores (Al-Rabeah *et al.*, 2006; Shariifian *et al.*, 2007; Koulaouzidou *et al.*, 2008; Damas *et al.*, 2011; Youshino *et al.*, 2013; Jaberiansari *et al.*, 2014; Jang *et al.*, 2014; Poggio *et al.*, 2014; Escobar-Garcia *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2016) o que permite ao biomaterial MTA ser indicado para diferentes situações clínicas em Endodontia.

O cimento TheraCal LC foi citotóxico, demonstrando diferença estatisticamente significativa quando comparado ao MTA e ao grupo controle ($P < 0.05$). A maior citotoxicidade do TheraCal, frente ao MTA, também pode ser explicada devido a alta liberação de íons cálcio, fato confirmado por Poggio *et al.* (2014) e Bortoluzzi *et al.* (2015). Em sua formulação, a inserção de monômeros hidrofílicos apresenta-se como uma estratégia para a absorção de água, o que inicia o processo da formação do hidróxido de cálcio como subproduto do cimento de Portland. Gandolfi *et al.*, 2012 ressaltaram a grande e contínua dissociação iônica do hidróxido de cálcio em íons cálcio e hidroxila deste material. A constante e longa (28 dias) alcalinização do meio, devido aos íons hidroxila, também pode explicar nossos resultados de maior citotoxicidade.

Outra possibilidade para explicar a citotoxicidade elevada do cimento TheraCal LC recai sobre monômeros presentes em sua composição. Shu *et al.*, em 2008, apresentam o TheraCal como uma pasta simples contendo óxido de cálcio, partículas

de silicato de cálcio (cimento de Portland tipo III), vidro, sílica, Sulfato de bário, zirconato de bário como radiopacificador e monômeros resinosos contendo Bis- GMA and PEGDMA (Suh *et al.*, 2008). Contudo Manojlovic *et al.*, em 2017, avaliaram a citotoxicidade e genotoxicidade de diferentes monômeros, apresentando efeitos citotóxicos decrescentes na seguinte ordem: BisGMA> TPO> FIT> CQ> TEGDMA.

Camilleri, em 2014, avaliaram que o tipo de resina e a composição do radiopacificador afetam a capacidade de liberação de cálcio e a bioatividade de cimentos de silicato tricálcico. O zirconato de bário, presente no TheraCal LC, aumentou a formação de hidróxido de cálcio como indicado por microscopia eletrônica de varredura e difração de Raios-X, fato que pode corroborar com a alta alcalinidade do meio e conseqüentemente citotoxicidade.

7. CONCLUSÕES

Conclui-se que o TheraCal LC é mais citotóxico quando comparado ao MTA Branco.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Rabeah E, Perinpanayagam H, MacFarland D. Human alveolar bone cells interact with ProRoot and tooth-colored MTA. *J Endod.* 2006 Sep;32(9):872-5.

Annamalai S, Mungara J. Efficacy of mineral trioxide aggregate as an apical plug in non-vital young permanent teeth: preliminary results. *J Clin Pediatr Dent.* 2010 Winter;35(2):149-55.

Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod.* 2007 Oct; 33(10): 1231-4.

Bogen G, Kuttler S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. *J Endod.* 2009 Jun; 35(6): 777-90.

Bortoluzzi EA, NiuLN, 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.

Camilleri J, Laurent P, About I. Hydration of Biodentine, Theracal LC, and a prototype tricalcium silicate-based dentin replacement material after pulp capping in entire tooth cultures. *J Endod.* 2014 Nov;40(11):1846-54.

Camilleri J. Tricalcium silicate cements with resins and alternative radiopacifiers. *J Endod.* 2014 Dec;40(12):2030-5.

Cantekin K. Bond strength of different restorative materials to light-curable mineral trioxide aggregate. *J Clin Pediatr Dent.* 2015 Winter;39(2):143-8.

Damas BA, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity Comparison of Mineral Trioxide Aggregates and EndoSequence Bioceramic Root Repair Materials. *J Endod.* 2011 Mar; 37(3): 372-5.

- Dominguez MS, Witherspoon DE, Gutmann JL, Opperman LA. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. *J Endod*. 2003 May;29(5):324-33.
- Escobar-García DM, Aguirre-López E, Méndez-González V, Pozos-Guillén A. Cytotoxicity and Initial Biocompatibility of Endodontic Biomaterials (MTA and Biodentine™) Used as Root-End Filling Materials. *Biomed Res Int*. 2016;2016:7926961.
- Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J*. 2000;11(1):3-9.
- Felippe WT, Felippe MC, Rocha MJ. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod J*. 2006 Jan;39(1):2-9.
- Ford T P, Mannocci F, Woolford M. Survey on the teaching and use of mineral trioxide aggregate in UK dental schools. *Eur J Dent Educ*. 2007 Aug;11(3):155-9.
- Fregnami E, Hizatugu R. *Endodontia: uma visão contemporânea*. 1ª Edição. Livraria Editora Santos Ltda, 2012. 750pg. Cap 36: O O Impacto da Introdução do MTA em Endodontia. De-Deus GACV, Húngaro MA, Bortoluzzi E, Reis C, Felippe MCS, Felippe WT Pag 455.
- Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Chemical–physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *Int Endod J*. 2012 Jun;45(6):571-9.
- Giuliani V, Baccetti T, Pace R, Pagavino G. The use of MTA in teeth with necrotic pulps and open apices. *Dent Traumatol*. 2002 Aug;18(4):217-21.
- Goldberg M, Pradelle-Plasse N, Tran XV, Colon P, Laurent P, Aubut I, Boukpepsi T, Septier D. Biocompatibility or cytotoxic effects of dental composites. Oxford, UK: Coxmoor Publishing, c2009; Chapter 4, Emerging trends in (bio)material research; p181-203.

Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PF, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod.* 2009 Feb; 35(2): 256-60.

Guimarães BM, Tartari T, Marciano MA, Vivan RR, Mondeli RFL, Camilleri J, Duarte MAH. Color stability, radiopacity, and chemical characteristics of white Mineral Trioxide Aggregate associated with 2 different vehicles in contact with blood. *J Endod.* 2015 Jun; 41(6): 947-952.

Hebling J, Lessa FC, Nogueira I, Carvalho RM, Costa CA. Cytotoxicity of resin-based light-cured liners. *Am J Dent.* 2009 Jun;22(3):137-42.

Heward S, Sedgley CM. Effects of intracanal mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide during four weeks on pH changes in simulated root surface resorption defects: an *in vitro* study using matched pairs of human teeth. *J Endod.* 2011 Jan;37(1):40-4.

International Organization for Standardization ISO 10993 Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for *In Vitro* Cytotoxicity. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 2009.

Jaberiansari Z, Naderi S, Tabatabaei FS. Cytotoxic effects of various mineral trioxide aggregate formulations, calcium-enriched mixture and a new cement on human pulp stem cells. *Iran Endod J.* 2014 Fall;9(4):271-6.

Jang YE, Lee BN, Koh JT., Park YJ, Joo NE, Chang HS, Hwang IN, Oh WM, Hwang YC. Cytotoxicity and physical properties of tricalcium silicate-based endodontic materials. *Restorative Dentistry e Endodontics.* 2014; 89-94.

Johnson BR. Considerations in the selection of a root-end filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999 Apr;87(4):398-404.

Koulaouzidou EA, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA Angelus. *J Oral Sci.* 2008 Dec; 50(4): 397-402.

Li Z, Cao L, Fan M, Xu Q. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: A meta-analysis. *J Endod.* 2015 Sep; 41(9): 1412-7.

Manojlovic D, Dramićanin MD, Miletic V, Mitić-Ćulafić D, Jovanović B, Nikolić B. Cytotoxicity and genotoxicity of a low-shrinkage monomer and monoacylphosphine oxide photoinitiator: Comparative analyses of individual toxicity and combination effects in mixtures. *Dent Mater*. 2017 Feb 28. pii: S0109-5641(17)30152-5.

Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RFL, Guimarães BM, Duarte MAH. Assessment of color stability of White Mineral Trioxide Aggregate Angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod*. 2014 Aug; 40(8): 1235-40.

Marciano MA, Guimarães BM, Silva PA, Camilleri J, Duarte MAH. Physical and Chemical Properties and Subcutaneous Implantation of Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Propylene Glycol. *J Endod*. 2016 Mar; 42(3): 474-479.

Marques JLL, Malheiros CF, Amorim CVG. A Endodontia e o MTA: Uma Abordagem Clínica. *Revista do 23 ° Ciosp, São Paulo, 2003* Capítulo 1, p. 03-34

Moretti AB, Sakai VT, Oliveira TM, Fornetti AP, Santos CF, Machado MA, Abdo RC. The effectiveness of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide and formocresol for pulpotomies in primary teeth. *Int Endod J*. 2008 Jul;41(7):547-55.

Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ, Stowe S, Eslami B, Eskandarizade a, shabahang S. A comparative study of white and grey mineral trioxide aggregate as pulp capping agents in dog's teeth. *Dent Traumatol*. 2005 Jun;21(3):150-4.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review - Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. *J Endod*. 2010 Jan; 36(1): 16-27.

Park JB, Lee JH. Use of mineral trioxide aggregate in the non-surgical repair of perforating invasive cervical resorption. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Oct 1;13(10):E678-80.

Park JW, Hong SH, Kim JH, Lee SJ, Shin SJ. X-Ray diffraction analysis of white ProRoot MTA and Diadent BioAggregate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Jan;109(1):155-8.

- Perinpanayagam, H. Cellular response to mineral trioxide aggregate root-end filling materials. *J Can Dent Assoc.* 2009 Jun;75(5):369-72.
- Poggio C, Arciola CR, Beltrami R, Monaco A, Dagna A, Lombardini M, Visai L. Cytocompatibility and antibacterial properties of capping materials. *The Scientific World Journal.* 2014:181945.
- Poggio C, Arciola CR, Beltrami R, Monaco A, Dagna A, Lombardini M, Visai L. Cytocompatibility and antibacterial properties of capping materials. *The Scientific World Journal.* 2014 May.
- Rodrigues EM, Cornelio 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.* 2016 Aug; 13.
- Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2005 Feb;31(2):97-100.
- Sharifian MR, Ghobadi M, Shokouhinejad N, Assadian H. Cytotoxicity Evaluation of Proroot MTA, Root MTA and Portland Cement on Human Gingival Fibroblasts. *Iran Endod J.* 2007; 2(3): 91-4.
- Siew K, Lee AH, Cheung GS. Treatment Outcome of Repaired Root Perforation: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Endod.* 2015 Nov; 41(11): 1795-804.
- Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod.* 2013 Feb;39(2):274-7.
- Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod J.* 2007 Mar;40(3):186-97.
- Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod.* 1995 Dec; 21(12): 603-8.

Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. J Endod. 2010 Feb; 36(2): 190-202.

Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. J Endod. 1993 Dec;19(12):591-5.

Torabinejad M, White DJ (1995) Tooth Filling Material and Use. US Patent Number 5,769,638.

Wucherpfennig AL, Green DB. Mineral trioxide vs Portland cement: two compatible filling materials. J Endod 1999; 25(4); Abstract PR 40; 308.

Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KCS, Santos CF, Sipert CR. *In Vitro* Cytotoxicity of White MTA, MTA Fillapex® and Portland Cement on Human Periodontal Ligament Fibroblasts. Braz Dent J 2013; 24(2): 111-6.