

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

UNIGRANRIO

Érica Mascarenhas Soffritti

MTA de alta plasticidade: Avaliação citotóxica

Duque de Caxias

2017

Érica Mascarenhas Soffritti

MTA de alta plasticidade: Avaliação citotóxica

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

Área de concentração: Endodontia

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. Thais Accorsi Mendonça

Prof. Dr. Emmanuel J. Nogueira Leal Da Silva

**Duque de Caxias
2017**

CATALOGAÇÃO NA FONTE/BIBLIOTECA - UNIGRANRIO

S681m Soffritti, Érica Mascarenhas.
MTA de alta plasticidade: avaliação citotóxica / Érica Mascarenhas Soffritti.
- Duque de Caxias, 2017.
34 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. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva”.
Bibliografia: 29-34.

1. Odontologia. 2. Endodontia. 3. Citotoxicidade. 4. Materiais dentários.
5. MTA - Reparo dentário. I. Mendonça, Thais Accorsi. II. Silva, Emmanuel João Nogueira Leal da. III. Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”. IV. Título.

CDD – 617.6

Érica Mascarenhas Soffritti

MTA DE ALTA PLASTICIDADE: AVALIAÇÃO CITOTÓXICA

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



Prof. Dr. Plínio Mendes Senna
UNIGRANRIO – Universidade do Grande Rio



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

AGRADECIMENTOS

À Deus e a minha família que sempre acreditou e apoiou a minha trajetória profissional, em especial à minha mãe que me estendeu a mão nos momentos mais difíceis.

A oportunidade de cursar o Mestrado Profissional em Endodontia na UNIGRANRIO, fruto da parceria com a Secretaria Municipal de Saúde da Cidade do Rio de Janeiro, instituição da qual faço parte. Agradeço por mais uma oportunidade de qualificação profissional, para que eu possa contribuir com um melhor serviço prestado à população carioca.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Thaís Accorsi Mendonça e Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva, e à equipe de professores, de Endodontia e áreas conexas, pela seriedade na produção e ensino do conhecimento científico.

Aos funcionários da UNIGRANRIO, especialmente ao Laboratório Multidisciplinar em Pesquisa (LAMP) na pessoa de Ana Beatriz Machado Lima e a secretária de Pós-Graduação Andreia Fagundes, pela ajuda necessária e tratamento gentil durante as atividades do curso.

Ao Laboratório de Biotecnologia do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

Aos meus colegas do curso de mestrado pela amizade e companheirismo durante esse tempo.

“A ciência moderna ainda não produziu um medicamento tranquilizador tão eficaz como o são umas poucas palavras boas.”

Sigmund Freud

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade do cimento reparador MTA Repair HP. O cimento reparador MTA Branco foi utilizado como material de referência para comparação. Para isso, osteoblastos humanos imortalizados da linhagem Saos-2 foram incubados com eluções dos materiais testados por um período de 24 horas. No grupo controle, células não foram expostas ao meio convencional de cultura celular. A citotoxicidade dos materiais foi determinada pela contagem de células viáveis utilizando-se o ensaio colorimétrico de MTT. Os dados foram testados com relação a sua distribuição normal através do teste de Kolmogorov-Smirnov e submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidas do teste de Bonferroni ($P < 0,05$). Os resultados do ensaio de citotoxicidade mostraram ausência de diferenças estatisticamente significantes entre o MTA Branco e o MTA Repair HP ($P > 0,05$). Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os materiais testados e o grupo controle ($P > 0,05$). De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que não houve diferença entre a citotoxicidade do MTA Branco quando comparado ao MTA Repair HP.

Palavras- chave: Citotoxicidade; Materiais endodônticos; MTA; MTA Repair HP.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the cytotoxicity of the MTA Repair HP cement. MTA White cement was used as a reference material for comparison. Immature human osteoblasts of the Saos-2 lineage were incubated with elutions of the tested materials for a period of 24 hours. In the control group, cells were not exposed to the conventional cell culture medium. The cytotoxicity of the materials was determined by counting viable cells using the MTT colorimetric assay. The data were tested for their normal distribution using the Kolmogorov-Smirnov test and subjected to ANOVA followed by the Bonferroni test ($P < 0.05$). The results of the cytotoxicity assay showed no statistically significant differences between MTA White and MTA Repair HP ($P > 0.05$). In addition, no statistically significant differences were observed between the tested materials and the control group ($P > 0.05$). According to the results, it can be concluded that there was no difference between MTA White cytotoxicity when compared to MTA Repair HP.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.	Apresentação comercial dos materiais MTA Branco e MTA Repair HP.	21
Figura 2.	Citotoxicidade dos cimentos experimentais (ensaio de MTT).	25
Tabela 1.	Composição química dos cimentos MTA Branco e MTA Repair HP.	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	American Dental Association
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
FDA	Foods and Drugs Administration
ISO	Internacional Standards Organization
MTA	Trióxido de Mineral Agregado
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	13
3- PROPOSIÇÃO	21
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	22
5- RESULTADOS	25
Figura 2 - Citotoxicidade dos cimentos experimentais (ensaio MTT).....	25
6- DISCUSSÃO	26
7- CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1- INTRODUÇÃO

O Trióxido de Mineral Agregado (MTA) foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda (Torabinejad & White, 1995), e desde então uma série de trabalhos vêm demonstrando resultados excelentes quando comparados a materiais anteriormente utilizados em Endodontia em relação às propriedades biológicas, físico-químicas e mecânicas (Torabinejad & Parirokh, 2010; Parirokh *et al.*, 2010). Este material é constituído principalmente de silicato tricálcico, óxido tricálcico, silicato dicálcico, óxido de silicato, aluminato tricálcico, além de pequenas quantidades de outros minerais que também são responsáveis pelas propriedades físico-químicas, como por exemplo, o óxido de bismuto adicionado para aumentar a radiopacidade do material (Parirokh *et al.*, 2005; Torabinejad & Parirokh, 2010; Parirokh *et al.*, 2010). Apesar de não conter hidróxido de cálcio em sua formulação, após sua presa, forma-se o óxido de cálcio que ao reagir com os fluidos teciduais ou água pode produzir hidróxido de cálcio. A presença de hidróxido de cálcio faz com que o cimento atinja um pH altamente alcalino (aproximadamente 10.2 a 12.5), favorecendo as propriedades antimicrobianas desse material (Torabinejad & Parirokh, 2010).

Apesar de o MTA ser considerado um excelente material para tais procedimentos clínicos, o biomaterial apresenta inconvenientes como a dificuldade de manipulação e inserção no local de reparo, consistência granulosa e longo tempo de presa (Pitt Ford *et al.*, 2007; Ber *et al.*, 2007; Bogen & Kuttler, 2009). Ainda, a utilização do óxido de bismuto como agente radiopacificador pode promover alteração de cor nos elementos dentários (Marciano *et al.*, 2014) e afetar propriedades físico-químicas (Marciano *et al.*, 2016).

Na busca pelo aprimoramento das características desfavoráveis do MTA, uma nova formulação do MTA Angelus (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) denominada de MTA Repair HP (MTA “High Plasticity”), foi recém-lançada no mercado com objetivo de manter as propriedades químicas e biológicas do MTA e melhorar as propriedades físicas de manipulação. De acordo com o fabricante, as principais modificações quando comparado ao seu predecessor são a adição de um agente plastificante orgânico à água destilada, que atua como agente de união entre os óxidos. Este agente orgânico traria ao produto uma alta plasticidade. Estudos têm mostrado que a utilização de agentes plastificantes melhoram propriedades físico-químicas e facilitam

a manipulação do MTA (Guimarães *et al.*, 2015). Além disso, a substituição do óxido de bismuto pelo tungstato de cálcio, como agente radiopacificador, objetiva evitar a alteração cromática de elementos dentários pelo biomaterial (Marciano *et al.*, 2014), bem como diminuir as interferências do radiopacificador nas propriedades físico, químicas e mecânicas do MTA (Marciano *et al.*, 2015; Bosso-Martelo *et al.*, 2015; Bosso-Martelo *et al.*, 2016). Um recente estudo demonstrou que essa nova formulação apresentou maior resistência ao deslocamento quando comparado ao seu predecessor (Silva *et al.*, 2016). No entanto, a literatura carece de estudos que demonstrem as propriedades biológicas dessa nova formulação. Destarte, esta dissertação apresentou o escopo de uma avaliação *in vitro* dos possíveis efeitos citotóxicos dos biomateriais MTA Branco (White MTA) e MTA REPAIR HP em osteoblastos humanos imortalizados.

2- REVISÃO DE LITERATURA

A avaliação da compatibilidade biológica de biomateriais segue primeiramente ensaios *in vitro*; e no caso de materiais endodônticos o teste pode ser realizado de inúmeras formas, existindo inclusive normativas sugerindo metodologias para a realização desses ensaios (ISO 10993-5 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). Uma das formas de ensaio mais utilizadas é a da realização de uma eluição do material, seguida de exposição deste eluto as células. Estes ensaios envolvem a pré- incubação do biomaterial em meio de extração, quase sempre aquoso, e que tem o objetivo de simular a liberação de substâncias com possível efeito tóxico nos fluidos biológicos aos quais o material estará exposto durante seu uso. Diversas substâncias são elegíveis a comporem este meio de extração, porém o mais comumente usado é o próprio meio de cultura. Após um período de extração (no geral 24 horas), este meio é coletado (agora sem o material) e adicionado as células já cultivadas e em monocamadas e mantidas por mais 24 horas. Ao fim do tempo de exposição devem ser realizados testes de viabilidade celular, os quais permitem estimar a proporção de células vivas após a exposição. Os testes de MTT se baseiam na medição da atividade mitocondrial. O reagente MTT (brometo de difeniltetrazólio), amarelo, solubilizado em água, é metabolicamente reduzido nas células viáveis para um azul-violeta de formazano insolúvel. Em seguida, o formazano é solubilizado em álcool. Há uma correlação direta entre o número de células viáveis e a intensidade de cor determinada pela leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540nm (Granjeiro & Soares, 2011).

A validação da metodologia de cultura celular para o estudo do biomaterial MTA foi revisada por Perinpanayagam *et al.*, em 2009. Os autores destacam que a metodologia de cultura celular oferece um ambiente controlado, nos quais diferentes linhagens celulares podem ser analisadas. São comuns para este biomaterial ensaios com fibroblastos e osteoblastos, mimetizando a morfologia tecidual de fibroblastos originários do ligamento periodontal e osteoblastos do osso alveolar, os quais pertencem a tecidos que desempenham um papel fundamental no processo de reparo perirradicular.

Previamente em 2006, Al-Rabeah *et al.*, confirmaram a excelente biocompatibilidade do MTA (Pro Root MTA, Dentsply Tulsa Dental, Tuls, OK, EUA)

em osteoblastos através de ensaios de citotoxicidade. Como metodologia complementar, a microscopia eletrônica de varredura evidenciou que as células osteoblásticas se espalharam dentro de 24 horas, com inúmeras projeções celulares se ligando à superfície do MTA durante o período de 2 semanas no qual o experimento foi realizado.

Sharifian *et al.*, em 2007, avaliaram a citotoxicidade frente a fibroblastos humanos gengivais de diferentes marcas de MTA e do cimento de Portland (Simane Tehran Co., Tehran, Ira). As marcas de MTA desse estudo foram GI) ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Tuls, OK, EUA) e GII) Root MTA (Salamifar, Tehran, Irã). Os resultados indicaram que não havia diferença estatisticamente significante entre os três materiais testados ($p > 0.05$). A comparação do biomaterial MTA com cimento de Portland aconteceu inicialmente em 1999 por meio da análise através da técnica de difração de raios-X e biocompatibilidade através de osteoblastos (Wucherpfennig & Green, 1999 Abstract PR 40; 308). No ano seguinte, Estrela *et al.*, publicaram o primeiro artigo no qual o MTA foi diretamente comparado com o cimento de Portland, no qual foi constatada a sua semelhança química, exceto pelo óxido de bismuto (radiopacificador) presente no MTA, bem como resultados semelhantes para pH e atividade antibacteriana.

Em 2008, Koulaouzidou *et al.*, se propuseram a comparar o efeito citotóxico de duas marcas comerciais de MTA GI) ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Tuls, OK, EUA) e GII) MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) com; GIII) cimento de óxido de zinco e eugenol modificado (SuperEBA, Bosworth Company, Keystone Industries, Gibbstown, EUA) e GIV) Cimento de ionômero de vidro (Vitrebond, 3M, Minnesota, EUA). A citotoxicidade foi observada em células pulpare de rato (linhagem RPC-C2A) e fibroblastos humanos imortalizados de origem pulmonar (linhagem MRC-5). Utilizou-se o reagente XTT (hidróxido de tetrazólio) e compararam os resultados ao grupo controle do experimento em dois períodos experimentais: 24 e 72 horas. Os resultados apresentaram uma baixa ou quase nula citotoxicidade para ambas as marcas de MTA, com escala crescente de citotoxicidade para os materiais SuperEBA e Vitrebond. O biomaterial MTA, independente da marca, já apresentava-se como o padrão ouro na escolha de um material para casos de cirurgias parodontológicas como retro-obturações, devido a sua superior propriedade biológica de não ser tóxico as células do tecido perirradicular.

Apesar de o MTA ser considerado um excelente material, este apresenta inconvenientes como a dificuldade de manipulação e inserção no local de reparo, consistência granulosa e longo tempo de presa (Pitt Ford *et al.*, 2007; Ber *et al.*, 2007; Bogen & Kuttler, 2009). Na busca pelo aprimoramento das características desfavoráveis do MTA, outros cimentos reparadores têm surgido no mercado e devem ser testados quanto as suas características, dentre elas a citotoxicidade. Damas *et al.*, em 2011, estudaram a citotoxicidade de dois novos cimentos biocerâmicos GI) Endosequence Root Repair Material e GII) Endosequence Root Repair Puffy (Brasseler, Savannah, GA, EUA), quando comparados ao GIII) MTA (ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, EUA) e GIV) MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil). O ensaio foi realizado utilizando-se fibroblastos humanos advindos da pele. Todos os materiais estudados apresentaram uma viabilidade igual ou acima de 91,8%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dados dos grupos MTA ProRoot, MTA Angelus e Endosequence Root Repair. O biomaterial Endosequence Root Repair Puffy apresentou-se associado a menor viabilidade celular. Os autores apresentaram a diferença na composição desse material e maior viscosidade como agente causal da menor viabilidade celular.

A fim de associar as propriedades favoráveis do cimento reparador MTA a cimentos obturadores endodônticos, surgiram no mercado cimentos para a obturação dos canais radiculares à base de MTA. Em 2013, Youshino *et al.*, compararam a citotoxicidade sob fibroblastos primários originários do ligamento periodontal quando expostos ao recém lançado cimento obturador GI) MTA Fillapex (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) em relação ao GII) MTA branco (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) e GIII) cimento tipo Portland (Cia. de Cimento Portland Itaú, Itaú de Minas, MG, Brasil). Para tal estudo, a norma ISO 10993-5 foi utilizada e com o intuito de verificar se a concentração apresentava-se como um fator na viabilidade celular, este extrato foi diluído de forma seriada; e para a variável tempo exposição, o ensaio contou com períodos experimentais de 24, 48 e 72 horas. Após tais condições, procedeu-se o ensaio de viabilidade celular MTT. Os resultados apresentados apresentaram um pequeno efeito citotóxico do MTA branco (GII) para extratos não diluídos e nos períodos experimentais de 24 e 72 horas, enquanto que o cimento tipo Portland (GIII), neste estudo, não induziu alterações na viabilidade de fibroblastos. O cimento obturador MTA Fillapex (GI), o qual apresenta dentre os seus componentes o MTA, apresentou maiores índices de citotoxicidade, mesmo em diluições seriadas. Os

autores concluíram que o MTA Fillapex, mesmo apresentando MTA na sua composição, apresentou-se como um cimento obturador com características citotóxicas. Outros trabalhos como o de Silva *et al.* (2013) evidenciaram citotoxicidade estatisticamente significante maior do cimento obturador MTA Fillapex quando comparado ao cimento resinoso AH Plus. Este artigo ainda inferiu sobre a radiopacidade e viscosidade destes cimentos a partir de ensaios padronizados nas normas ISO.

Mundialmente, outras marcas comerciais de MTA começaram a surgir no mercado, além do MTA ProRoot e Angelus, bem como novas formulações enriquecidas com diferentes nanopartículas. Jaberiansari *et al.*, em 2014, avaliaram a citotoxicidade de três diferentes marcas de MTA GI) Pro Root MTA (Dentsply, Tulsa Dental, Tulsa, OK, EUA); GII) MTA Angelus (Londrina, Paraná, Brasil) e GIII) MTA Root (Lotfi research group, Tabriz, Irã), além de GIV) MTA enriquecido com três diferentes nanopartículas, comparados com um GV) cimento enriquecido de cálcio (BioniqueDent, Tehran, Irã). Este estudo comparou este efeito citotóxico em células tronco pulparem com diferentes intervalos de tempo. Todos os três MTA já comercializados (grupos I, II e III) e cimento enriquecido com cálcio (GV) apresentaram biocompatibilidade similares. O MTA acrescido de nanopartículas (GIV) apresentou efeitos citotóxicos em todos os intervalos de tempo. Ressalta-se que neste artigo, as nanopartículas acrescentadas não foram discriminadas.

O campo de nanopartículas também gerou outro cimento reparador: O Bioaggregate (Innovative Bioceramix, Vancouver, BC, Canada), o qual apresenta - se como um pó semelhante a cimento hidráulico branco puro, constituído de nanopartículas cerâmicas biocompatíveis. De acordo com o fabricante, o cimento possui características hidrofílicas, é capaz de estimular a cementogênese e produzir um selamento de alta qualidade. Suas indicações são similares as do MTA, visto a sua constituição química ser comparável ao MTA branco (Park *et al.*, 2010).

Outros biomateriais surgiram agregando ao MTA aditivos rotineiramente usados na construção civil, com o intuito de melhorar suas propriedades físico-químicas. O aditivo cloreto de cálcio apresenta-se inserido no material Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, França). O Biodentine é um cimento de silicato indicado como substituto dentinário. Em Endodontia, suas indicações são as mesmas do MTA. A parte pó do Biodentine é basicamente composta por silicato tricálcico,

carbonato de cálcio e óxido de zircônio (radiopacificador). A parte líquida consistiu-se do cloreto de cálcio, com a função de acelerar a presa do cimento e um polímero hidrossolúvel, sendo agente controlador de umidade (Goldberg *et al.*, 2009). De acordo com o fabricante, o Biodentine apresenta excelente biocompatibilidade e bioatividade, bem como propriedades físico-químicas melhoradas em relação ao MTA, como menor tempo de presa, resistência mecânica e melhor manipulação.

Em 2014, Jang *et al.*, avaliaram a citotoxicidade e propriedades físicas (tempo de presa e ensaio de força compressiva, de acordo com as normas ISO) em diferentes cimentos endodônticos a base de silicato tricálcico: GI) Biodentine e GII) Bioaggregate, quando comparado ao MTA. Os resultados evidenciaram que o Biodentine apresentou maior citotoxicidade quando comparado ao MTA, contudo as propriedades físicas foram superadas. Já o biomaterial Bioaggregate apresentou similaridade na citotoxicidade quando comparado ao MTA, mas inferioridade nas propriedades físicas. O estudo de Escobar-Garcia, em 2016, complementou a análise comparativa entre o MTA e Biodentine através de ensaios de citotoxicidade e adesão celular. Os resultados apresentados por estes autores foram que os materiais apresentaram citotoxicidade similares, o que difere dos resultados apresentados por Jang *et al.* (2014), nos quais o material Biodentine se apresentou mais citotóxico. Para os resultados de adesão celular, houve um aumento da adesão celular através da expressão de contatos focais para o Biodentine, embora sem diferença estatisticamente significativa.

A busca por um material com características mais próximas das ideais permeou muitos estudos, como o do Poggio *et al.*, em 2014, que 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.

Outro MTA comercializado é o MTA Plus (Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, USA). Em 2016, Rodrigues *et al.*, investigaram a citotoxicidade, atividade osteogênica e expressão de RNAm para marcadores osteogênicos (proteínas morfogenética óssea BMP-2, osteocalcina e fosfatase alcalina) induzidos através de extratos dos materiais GI) MTA Plus comparado ao GII) MTA (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) em células tronco humanas pulpare. Os resultados apresentados foram que ambos os materiais foram: Não citotóxicos, aumentaram o processo de mineralização *in vitro* e induziram a expressão de marcadores osteogênicos.

E na constante busca pelo aprimoramento das características desfavoráveis do MTA, foi desenvolvida a nova formulação do MTA Angelus (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) denominada de MTA Repair HP (MTA “High Plasticity”), recém-lançada no mercado com objetivo de manter as propriedades químicas e biológicas do MTA e melhorar as propriedades físicas de manipulação. De acordo com o fabricante, a modificação apresenta-se no radiopacificador e na adição de um agente plastificante orgânico à água destilada, que atua como agente de união entre os óxidos. Estudos têm mostrado que a utilização de agentes plastificantes melhoram propriedades físico-químicas e facilitam a manipulação do MTA (Guimarães *et al.*, 2015).

3- PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade do cimento reparador MTA Repair HP em osteoblastos humanos imortalizados da linhagem Saos-2. O cimento reparador MTA foi utilizado como material de referência para comparação.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Formulação e manipulação dos materiais testados

Os materiais comerciais MTA e MTA Repair HP (**Figura 1**) foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes. A **Tabela 1** descreve composição dos materiais avaliados.

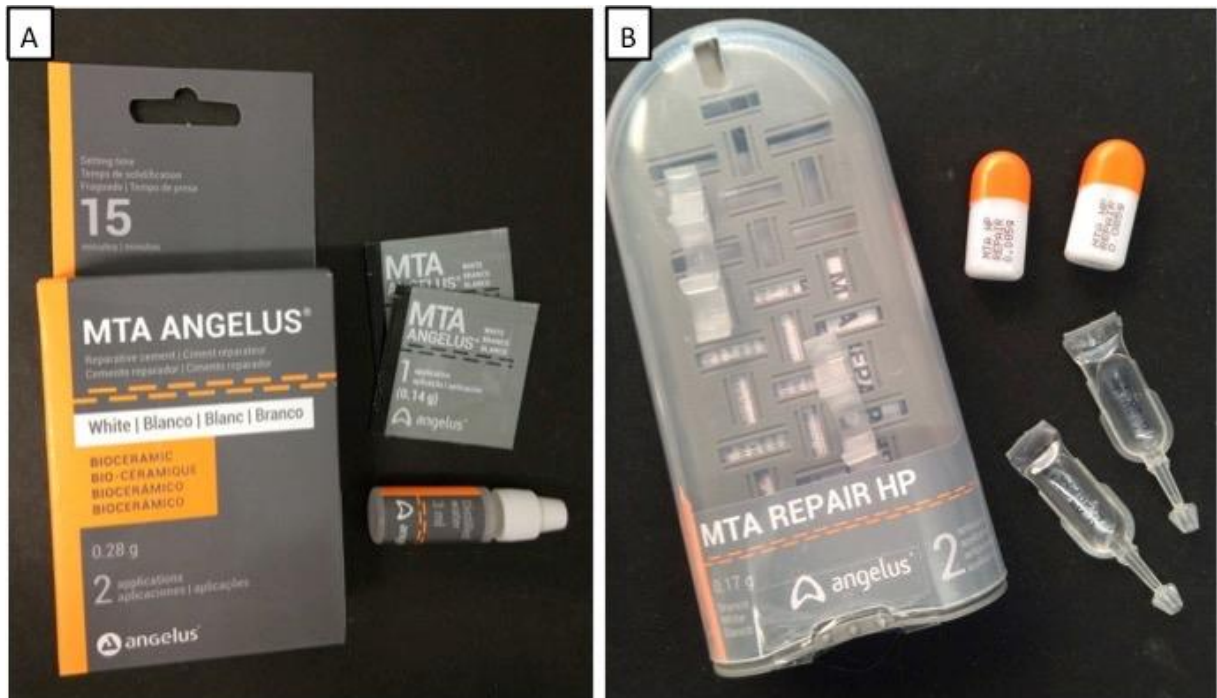


Figura 01: Apresentação comercial do A) MTA e B) MTA HP Repair (Angelus).

Tabela 1. Composição dos materiais endodônticos utilizados no presente estudo.

Material	Composição
<p>MTA (Angelus, Londrina, Brasil)</p>	<p>Pó: Silicato tricálcico, Silicato dicálcico, Aluminato tricálcico, Óxido de cálcio, Óxido de bismuto. Líquido: Água destilada.</p>
<p>MTA HP (Angelus, Londrina, Brasil)</p>	<p>Pó: Silicato tricálcico (3CaO.SiO₂), Silicato dicálcico (2CaO.SiO₂), Aluminato tricálcico (3CaO.Al₂O₃), Óxido de Cálcio (CaO), Tungstato de Cálcio (CaWO₄). Líquido: Água destilada e agente plastificante.</p>

4.2- Cultura celular

Células osteoblásticas humanas (linhagem Saos-2) foram obtidos 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 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 5×10^4 células por poço em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) para atingir a confluência desejada 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 materiais reparadores testados como descrito abaixo. O grupo controle não foi exposto ao extrato, sendo utilizado o meio DMEM convencional suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 mg/mL de penicilina.

4.3- Ensaio de citotoxicidade

Sob condições assépticas e dentro do fluxo laminar os materiais testados foram preparados de acordo com as instruções do fabricante 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 materiais nos anéis, os mesmos foram mantidos por 24 horas em estufa a 37°C para a presa dos materiais. Após 24 horas, os anéis de teflon foram removidos e cada espécime de material foi acomodado em poços de placas de 48 poços na qual foram inseridos 1,5 mL de meio DMEM suplementado em cada poço a fim de produzir um extrato do cimento. O extrato foi obtido 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 por no máximo 7 dias.

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 no escuro 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 540 nm. Os valores da viabilidade celular foram expressos em porcentagem total, sendo o grupo controle em separado.

4.4- Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e todos os ensaios foram repetidos 3 vezes a fim de garantir a confiabilidade do estudo. 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, 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 na **Figura 2**. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os materiais testados ($P>0.05$) e nem entre os materiais e o grupo controle ($P>0.05$).

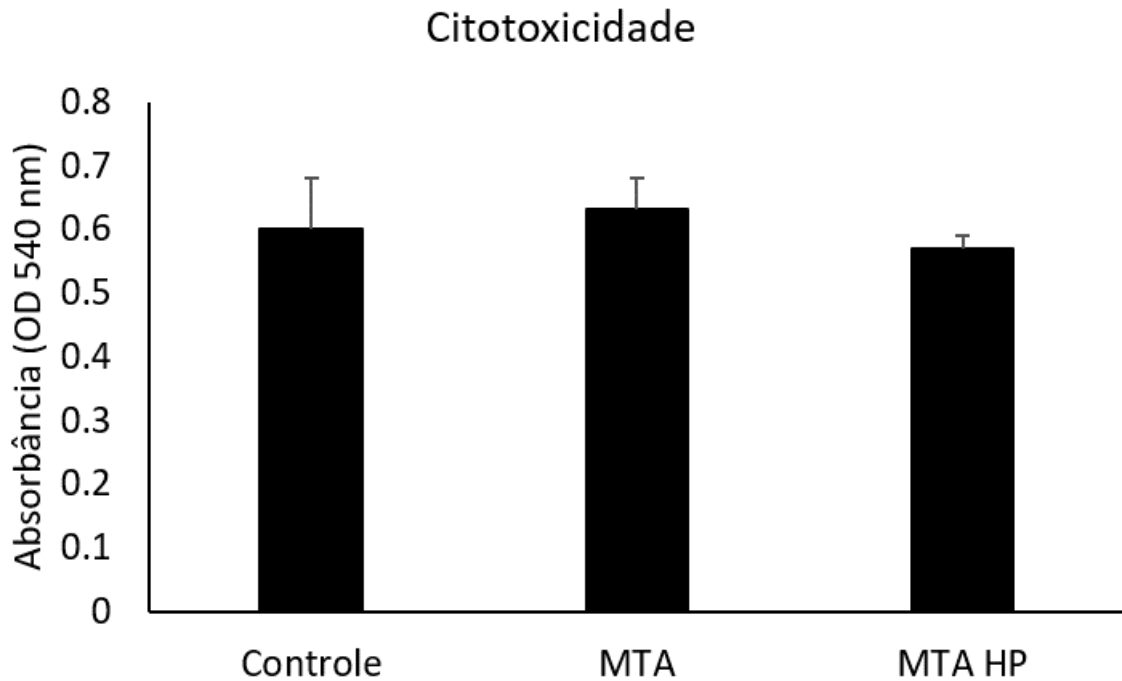


Figura 2 - Citotoxicidade dos cimentos experimentais (ensaio MTT).

6- DISCUSSÃO

O recém-lançado MTA Repair HP apresenta-se como uma proposta de melhorias do MTA convencional com a modificação do agente radiopacificador e adição de um agente plastificante orgânico à água destilada, que atua como agente de união entre os óxidos. Este agente orgânico traria ao produto uma alta plasticidade. Estudos têm mostrado que a utilização de agentes plastificantes melhoram propriedades físico-químicas e facilitam a manipulação do MTA (Guimarães *et al.*, 2015). E que o agente radiopacificador incluído na formulação dos cimentos não interfere na citotoxicidade (Huck *et al.*, 2017).

Camilleri, em 2014, avaliaram que o radiopacificador afeta a capacidade de liberação de cálcio e a bioatividade de cimentos de silicato tricálcico, fato que pode proporcionar uma alta alcalinidade do meio e conseqüentemente citotoxicidade. Contudo, não há estudos de citotoxicidade específica para o radiopacificador tungstato de cálcio presente no MTA Repair HP.

O ensaio de citotoxicidade se justifica como um passo inicial no processo de avaliação da compatibilidade biológica, inicialmente realizada *in vitro* (Granjeiro & Soares, 2011). A escolha do tipo celular, osteoblastos, foi realizada no intuito de mimetizar células presentes no tecido perirradicular, ou seja, osso alveolar. Estudos prévios utilizando outras linhas celulares como células endoteliais, fibroblastos L929 e osteossarcoma humano não revelaram diferenças significativas entre os materiais testados (Parirokh and Torabinejad, 2010).

Em nossos resultados de citotoxicidade, a partir de osteoblastos humanos imortalizados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os materiais MTA e MTA Repair HP ($P > 0.05$) e nem entre os materiais e o grupo controle ($P > 0.05$). A citotoxicidade muito baixa ou quase nula do MTA corrobora com outros autores (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).

Com a técnica empregada, as células imortalizadas podem ser isoladas e se multiplicar continuamente mantendo as suas características, o que garante a confiabilidade do estudo. Entretanto, sabe-se que esse ambiente *in vitro* é bastante limitado, visto a impossibilidade de se reproduzir a diversidade de células, substâncias e reações metabólicas do tecido vivo.

7- CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que não houve diferença entre a citotoxicidade do MTA quando comparado ao MTA Repair HP.

8- REFERÊNCIAS

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.

Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Basso Bernardi MI, Tanomaru-Filho M. Calcium Silicate-Based Cements Associated with Micro- and Nanoparticle Radiopacifiers: Physicochemical Properties and Bioactivity. *Int Sch Res Notices.* 2015 Feb; 23.

Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig.* 2016 Jan; 20(1): 83-90.

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

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, Felipe 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.

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.

Granjeiro JM & Soares GDA. *Biomateriais em Odontologia: princípios, métodos investigativos e aplicações.* 1a Edição. VM Cultural Editora Ltda, 2011 207 p.

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.

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. *Iranian Endodontic Journal*. 2014; 9(4): 271-276.

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.

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): 1235-1240.

Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. *Clin Oral Investig*. 2015 Dec;19(9): 2201-9

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.

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. *JCDA* 2009 Jun; 75(5): 369-372.

Pitt Ford T, 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.

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, Carvalho NK, Zanon M, Senna PM, De-Deus G, Zuolo ML, Zaia AA. Push-out bond strength of MTA HP, a new high-plasticity calcium silicate-based cement. *Braz Oral Res.* 2016 Jun 14;30(1). pii: S1806-83242016000100269.
- 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, Higa RK, McKendry DJ, Pitt Ford TR. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. *J Endod.* 1994 Apr;20(4):159-63.
- 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. *Brazilian Dental Journal.* 2013; 24(2): 111-116.

