



## Avaliação *in vitro* da citotoxicidade e caracterização química de cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio

**Palavras-Chave:** Cimentos. Silicato de Cálcio. Endodontia. Citotoxicidade.

**Autores(as):**

**Gabriela Fernanda Malosá, UNICAMP – FOP**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina Angélica Marciano da Silva, UNICAMP- FOP**

**Ana Cristina Padilha Janini, UNICAMP- FOP**

**Victor Augusto Benedicto dos Santos, UNICAMP- FOP**

---

### INTRODUÇÃO:

O objetivo da obturação do sistema de canais radiculares é a vedação de todos os espaços para evitar a sobrevivência de microrganismos e promover o reparo dos tecidos perirradiculares (Schilder, 2006). É esperado que os cimentos endodônticos obturadores tenham um contato mínimo com os tecidos perirradiculares ao selar o ápice. No entanto, quando extruído para essa região, os materiais nem sempre são reabsorvidos pelo organismo e podem causar diferentes reações teciduais dependendo de suas composições (Rodriguez-Lozano et al., 2017). Como resultado, estudos citotóxicos *in vitro* dos cimentos endodônticos obturadores são o primeiro passo para avaliação de sua aplicabilidade clínica (Peters, 2013). Diversos trabalhos são encontrados na literatura avaliando o potencial citotóxico destes materiais sobre fibroblastos (Silva et al., 2020; Zordan-Bronzel et al., 2021; Mann et al., 2022).

Os cimentos endodônticos obturadores à base de silicato de cálcio são reconhecidos como materiais bioativos através de sua capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado, definindo uma nova abordagem de tratamento para remineralização dentinária, terapia da polpa vital e regeneração óssea (Damas et al., 2011; Prati & Gandolfi, 2015). Existem duas vantagens principais associadas ao uso destes materiais: sua alta biocompatibilidade, reduzindo a reação inflamatória mesmo em caso de extrusão apical do cimento; e devido à presença de fosfato de cálcio que resulta em uma estrutura cristalina semelhante à hidroxiapatita dentária e óssea (Ginebra et al., 1997).

Atualmente, os cimentos endodônticos obturadores são apresentados comercialmente em fórmulas prontas para o uso, propostos como uma nova alternativa para facilitar a inserção clínica frente aos cimentos pó/líquido. Enquanto os cimentos pré manipulados, considerados de terceira geração, dependem da umidade do meio presente na dentina dos canais radiculares para iniciarem sua reação de presa, nos cimentos pó/líquido, a água já está presente na sua própria formulação (Camilleri, 2020; Camilleri et al., 2022). Assim, com novos materiais à base de silicato de cálcio sendo introduzidos no mercado, com apresentações diferentes, há a necessidade de se testar suas propriedades biológicas,

como a citotoxicidade, e caracterização de seus elementos químicos presentes, sendo um estudo inédito na literatura.

## METODOLOGIA:

Foram analisados cinco cimentos endodônticos obturadores:

- **à base de silicato de cálcio prontos para uso:**

1. o material recém-lançado no mercado mundial ainda não comercializado no país *AH Plus Bioceramic Sealer* (Dentsply, Konstanz, Alemanha);
2. *EndoSequence BC Sealer* (Brasseler, Savannah, EUA);

- **à base de silicato de cálcio pó/líquido:**

1. o material recém-lançado no mercado mundial ainda não comercializado no país *MTApex Bioceramic Root Canal Sealer* (Ultradent, South Jordan, EUA);
2. *BioRoot* (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, França);

- **à base de resina epóxica pasta/pasta:**

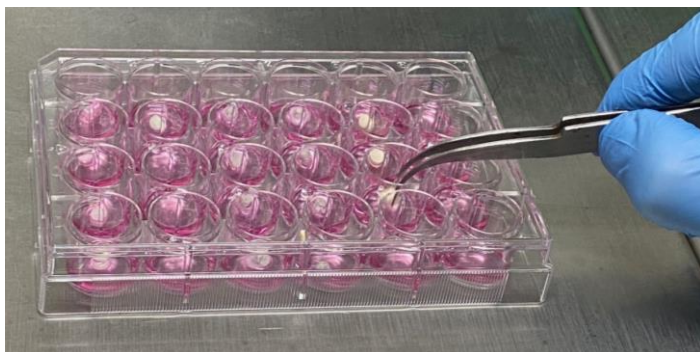
1. *AH Plus Jet* (Dentsply, Konstanz, Alemanha).



**Figura 1** – Materiais endodônticos obturadores estudados. **Fonte:** Autoria própria.

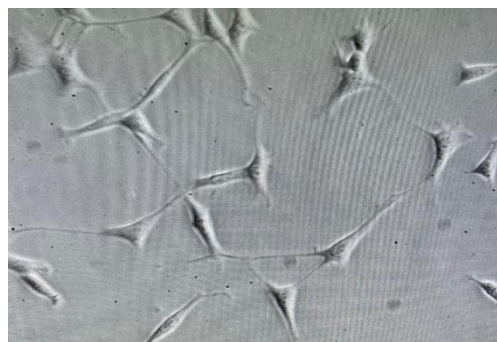
Realizamos o cálculo amostral a partir do tamanho da amostra para os cimentos endodônticos obturadores foi justificado através do cálculo amostral baseado em estudos anteriores (Silva et al., 2020 e Zordan-Bronzel et al., 2021). O tamanho da amostra foi calculado utilizando o programa G \* Power 3.1 para Mac (Heinrich Heine, University Dusseldorf) e o teste de comparação entre mais de 2 métodos com grupos independentes (ANOVA). Para um total de 3 grupos, foi realizada uma estimativa do desvio padrão de 1,8 e uma mínima diferença a ser detectada no valor de 10; poder de teste de 0,80 ( $\beta$ ) e alfa ( $\alpha$ ) de 0,05, obtendo um total de 6 amostras para cada grupo (**n = 6**). Todos os ensaios foram repetidos 2 vezes (duplicatas independentes) para garantir a reprodutibilidade biológica.

Para preparação dos cimentos, eles foram inseridos em anéis de teflon (Centerflon Ind Com Ltda, São Paulo, Brasil), medindo 5mm de diâmetro interno e 2mm de altura, segundo preconizado pela norma ISO 10993-5. Após a inserção dos cimentos nos anéis, os mesmos foram mantidos por 24h em estufa a 37°C para a presa inicial dos materiais. Após 24h, os anéis de teflon foram removidos de cada molde e acomodados em placas de 24 poços. Então, foram inseridos 1,5mL de meio DMEM suplementado em cada poço a fim de produzir um extrato de cimento endodôntico. Esses extratos foram mantidos em estufa a 37°C por 24h. Após o período de incubação, o extrato de cada grupo foi removido para o contato com a cultura celular.



**Figura 2** – Materiais endodônticos obturadores sendo inseridos no meio DMEM. **Fonte:** Autoria própria.

A cultura celular de fibroblastos (NIH/3T3 – CRL/1658) foram obtidos através da ATCC (American Type Culture Collection) e cultivados em Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement/Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS/Gibco, Grand Island, NY, EUA) e 1% de estreptomicina/penicilina. As células foram mantidas em incubadora a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e, ao atingirem a confluência de aproximadamente 80%, foram “descoladas” com solução de 0,25% de tripsina e 0,05% de ácido etilenodiamino tetra-acético (Gibco, Grand Island, NY, EUA) por 5 minutos. Após esse período, a tripsina foi inativada com soro fetal bovino e, posteriormente, replaqueadas.



**Figuras 3 e 4** – Cultura celular de Fibroblastos (NIH/3T3) sendo ativada. **Fonte:** Autoria própria.

As células foram plaqueadas em uma concentração de  $5 \times 10^3$  células por poço, em placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Trasadingen, Suíça), e após o plaqueamento, as células passaram por adaptação por 12 horas na incubadora a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

O ensaio de citotoxicidade utilizado foi o colorimétrico MTT e se baseou na norma ISO 10993-5. O ensaio teve um grupo **controle negativo**, contendo apenas o meio de cultura com soro fetal bovino. A viabilidade das células foi avaliada após 24 h do início do tratamento, e após esse tempo, o sobrenadante foi removido, os poços lavados com PBS e 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 concentração de 0,5 mg/mL. As amostras foram mantidas durante 4 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 dimetilsulfóxido puro. As placas foram agitadas por 5 minutos e incubadas por 5 minutos para estabilização da cor. A absorbância foi mensurada em um espectrofotômetro automático (EPOCH; Biosystems, Curitiba, PR, Brasil), com comprimento de onda de 540 nm para obtenção dos valores de absorbância e posterior cálculo da viabilidade celular. Ela foi expressa em porcentagem, com a obtenção de uma média dos 6 poços dos experimentos, em duplicatas independentes para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

As análises estruturais e químicas serão realizadas em MEV/EDS nos diferentes cimentos endodônticos obturadores à base de silicato de cálcio. As amostras serão revestidas separadamente com carbono e visualizadas no microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6610LV, Tóquio, Japão) em três ampliações (50x, 500x e 1000x) no modo de elétrons retroespalhado secundário. Serão caracterizados e quantificados também os elementos químicos através da análise Dispersiva de Energia de Raios-X (EDS).

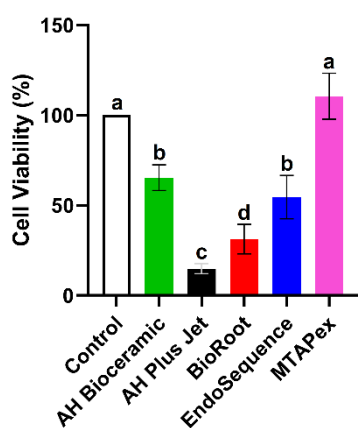
## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A análise estatística será realizada no *software* JASP (Universidade de Amsterdã, Amsterdã, Holanda), versão 0.9.2. (2020): ANOVA. O tamanho da amostra será determinado para expressar um poder de teste de pelo menos 80%. Os pressupostos deste método, distribuição normal e homogeneidade das variâncias serão validados através dos testes: Shapiro-Wilk e Levene. Para verificar as diferenças entre os grupos, será realizada análise *post hoc* com correção de Tukey, adotando nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1** - Viabilidade celular em porcentagem:

AH				
Bioceramic	AH Plus Jet	BioRoot	EndoSequence	MTAPex
63,7229	12,8664	36,0107	58,3936	101,256
65,3978	15,6833	42,1013	53,5973	118,919
54,6631	14,8458	23,0681	62,4286	115,493
62,8093	11,1915	20,3274	70,4987	89,2273
75,8279	15,3026	33,8789	44,9182	116,026
69,4328	19,3376	32,0518	37,5333	122,726

**Gráfico 1 – Média e desvio padrão da viabilidade celular em porcentagem dos materiais:**



## CONCLUSÕES:

Dentre os cimentos à base de silicato de cálcio, o AH Plus Bioceramic, EndoSequence BC Sealer e BioRoot demonstraram maior efeito citotóxico analisado de acordo com o padrão ISO, resultando em menor viabilidade celular do que o MTApex ( $p < 0,05$ ). O cimento AH Plus Jet, à base de resina epóxica, demonstrou maior citotoxicidade entre os materiais analisados. O teste que simulou o canal radicular não mostrou diferença estatística entre os materiais, sugerindo que o volume de cimento em contato com o meio influencia na citotoxicidade celular, assim como seus respectivos radiopacificadores.

## BIBLIOGRAFIA

Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2007;40:462-70.

Camilleri J, Atmeh A, Li X, Meschi N. Present status and future directions: Hydraulic materials for endodontic use. *Int Endod J.* 2022 Feb 15.

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.

Ginebra MP, Fernández E, De Maeyer EA, Verbeeck RM, Boltong MG, Ginebra J, Driessens FC, Planell JA. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *J Dent Res.* 1997 Apr;76(4):905-12.

International Organization for Standardization. ISO 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in vitro Cytotoxicity. Geneva, Switzerland: International Standards Organization; 2005.

Mann A, Zeng Y, Kirkpatrick T, van der Hoeven R, Silva R, Letra A, Chaves de Souza L. Evaluation of the Physicochemical and Biological Properties of EndoSequence BC Sealer HiFlow. *J Endod.* 2022 Jan;48(1):123-131.

Peters OA. Research that matters - biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int Endod J.* 2013 Mar;46(3):195-7.

Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.* 2015 Apr;31(4):351-70.

Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Forner L, Moraleda JM. Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *Int Endod J.* 2017 Jan;50(1):67-76.

Schilder H. Filling root canals in three dimensions: 1967. *J Endod.* 2006; 32(4):281-90.

Silva EJ, Hecksher F, Vieira VT, Vivan RR, Duarte MA, Brasil SC, Antunes HS. Cytotoxicity, antibacterial and physicochemical properties of a new epoxy resin-based endodontic sealer containing calcium hydroxide. *J Clin Exp Dent.* 2020 Jun 1;12(6):e533-e539.

Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM, Rodrigues EM, Guerreiro-Tanomaru JM. Physicochemical Properties, Cytocompatibility and Antibiofilm Activity of a New Calcium Silicate Sealer. *Braz Dent J.* 2021 Jul-Aug;32(4):8-18.