



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TAMARA DE ABREU SOUZA

**POTENCIAL DE BIOMINERALIZAÇÃO E BIOCOMPATIBILIDADE DE
DOIS CIMENTOS REPARADORES ENDODÔNTICOS - ESTUDO EM
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS.**

SOBRAL – CE

2018

TAMARA DE ABREU SOUZA

POTENCIAL DE BIOMINERALIZAÇÃO E BIOCAMPATIBILIDADE DE DOIS CIMENTOS ENDODÔNTICOS REPARADORES - ESTUDO EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará - *Campus* Sobral, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Inflamação e dor

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hellíada Vasconcelos Chaves

Co-orientador: Prof Dr. Bruno Carvalho Vasconcelos

SOBRAL-CE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S1p SOUZA, TAMARA DE ABREU.
POTENCIAL DE BIOMINERALIZAÇÃO E BIOCAMPATIBILIDADE DE DOIS CIMENTOS
ENDODÔNTICOS REPARADORES - ESTUDO EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS. / TAMARA
DE ABREU SOUZA. – 2018.
50 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, Sobral, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Helliada Vasconcelos Chaves.
Coorientação: Prof. Dr. Bruno Carvalho de Vasconcelos.
1. MTA (Agregado Trióxido Mineral). 2. Biodentine. 3. Biocompatibilidade. I. Título.

CDD 610

Gratidão por tudo!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a **DEUS**, por ter me conduzido até aqui, fortalecendo a minha fé. Por ter colocado em minha jornada pessoas de coração bom e honesto. Por guiar meus passos, por jamais ter me deixado só, por iluminar meu caminho e por provar, a cada dia, das mais variadas formas, que Seu amor é infinito, que, portanto, vale a pena sonha...Vale a pena acreditar.

Aos meus pais, **MARIA DAS GRAÇAS DE ABREU** e **ITAMAR SOUZA PINTO**, pelos ensinamentos e princípios durante a minha formação. A coragem e a determinação são grandes heranças. Apesar de não estarem sempre presentes fisicamente, foram essenciais pelo apoio emocional, isso me fortalece.

Aos meus irmãos, **TAYNARA DE ABREU SOUZA** e **ITALO DE ABREU SOUZA**, pelo amor de sempre, pelas palavras de coragem e admiração.

Ao meu esposo **VICTOR RODRIGUES DE SOUZA**, pelo incentivo desde o começo desse desafio. Pelo companheirismo e pelas palavras de conforto diárias, que me faziam acreditar que sempre daria certo.

A minha querida orientadora **HELLÍADA VASCONCELOS CHAVES**, pelos ensinamentos, pelo conhecimento compartilhado, pela compreensão e paciência. Pela confiança em acreditar na minha capacidade para conduzir esse trabalho, e, principalmente por aceitar entrar no mundo da Endodontia.

Ao meu querido co- orientador **BRUNO CARVALHO DE VASCONCELOS** que acompanho desde a graduação, participou na formação da minha especialização e hoje compartilha de mais um momento da minha vida acadêmica. Sou muito grata pela oportunidade e pelo conhecimento compartilhado.

Aos amigos, **PAULO GOBERLÂNIO DA SILVA BARROS** e **LUCIANA ARCANJO**, pela paciência e ajuda desde o começo. Vocês foram peças fundamentais durante a realização desse trabalho, tanto no aspecto pessoal quanto intelectual.

Aos amigos do laboratório que me auxiliaram durante esse trajeto, de todas as formas inimagináveis, em especial **NAYARA ALVES**, **ANDERSON WEINE**, **JORDÂNIA**

OLIVEIRA, ALANA NOGUEIRA, JACKSON COSTA, JANICE BARCELOS, LANA ALICE e RAYSSA ARRUDA por abdicarem algumas vezes de finais de semana, feriados ou folgas. Apesar de toda ansiedade que acompanharam cada fase da pesquisa, tivemos momentos de alegria e, sobretudo de companheirismo.

Aos colegas de trabalho pela compreensão e apoio, **ALINE ALVES e EMERSON LÉLIO COUTINHO.**

Aos colegas da turma do mestrado, pelas vitórias e ansiedades compartilhadas ao longo do percurso.

A **UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**, pela formação humana e profissional concedida.

RESUMO

Materiais com biocompatibilidade e capacidade de biomineralização para o sistema de canais radiculares e tecidos periapicais são essenciais para um bom resultado do tratamento endodôntico. O objetivo do estudo foi comparar a reação tecidual e o potencial de biomineralização de dois cimentos à base de silicato tricálcico: Biodentine (BD) MTA branco Angelus, em tecido subcutâneo de ratos. Foram utilizados 30 ratos machos Wistar, divididos em 4 grupos. Os materiais foram implantados no tecido subcutâneo do dorso desses animais, dentro de tubos de polietileno. Os grupos constituíram-se dos períodos experimentais correspondentes a 15, 30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico, quando foram eutanasiados. A cada período os tecidos foram levados à análise histopatológica, e, a fim de quantificar a resposta inflamatória e avaliar possível formação de estruturas de mineralização por meio do teste de Von Kossa, foram utilizados os tempos 30 e 60 dias. A quantificação das citocinas IL-1 β e IL- 8 por ELISA e qPCR para proteínas morfogenética óssea (BMP-2 e BMP-4) e osteocalcina (OC) foram realizadas nos períodos de 30 e 60 dias. O grupo sham mostrou discreta variação no perfil e na intensidade do infiltrado inflamatório. O grupo controle apresentou no dia 15 escore inflamatório significativamente superior ao grupo Sham. Observou-se que BD mostrou resposta inflamatória similar ao grupo sham, sem variação significativa ao longo dos períodos experimentais. O grupo MTA apresentou aumento significativo de um perfil inflamatório crônico no dia 30 com redução significativa deste para o dia 60 quando comparado ao Sham. O tecido de granulação no grupo Sham não mostrou variação significativa em todos os períodos experimentais. Os grupos controle e BD foram significativamente superior nos dias 15 e 30 quando comparados ao Sham com redução significativa no dia 60 quando comparado ao dia 15 . O grupo MTA não apresentou variação significativa em todos os tempos. Os grupos não apresentaram necrose ou material endocitado. BD e MTA apresentaram áreas de von kossa positiva significativas. BD e MTA apresentaram aumento significativo para IL-1 β quando comparado com grupo controle, e BD aumento significativo para IL- 8, em ambos períodos. Na qPCR, a expressão dos genes para BMP- 2 foi significativa apenas para BD em ambos os períodos , BMP- 4 e OC apresentaram significância apenas para MTA, em ambos os períodos. Conclui-se que BD e MTA são biocompatíveis, estimulam mineralização, estimulando expressão de genes osteogênicos.

Palavras-chave: MTA, Biodentine, biocompatibilidade, biomineralização.

ABSTRACT

Materials with biocompatibility and biomineralization capacity for the root canal system and periapical tissues are essential for a good outcome of endodontic treatment. The objective of the study was to compare the tissue reaction and the biomineralization potential of a calcium silicate cement: Biodentine (BD) and the White Mineral Trioxide Aggregate (MTA) in rat subcutaneous tissue. Thirty male Wistar rats were divided into four groups. The materials were implanted in the subcutaneous tissue of the back of these animals, inside polyethylene tubes. The groups consisted of the experimental periods corresponding to 15, 30 and 60 days after the surgical procedure, when they were euthanized. Tissues of 15, 30 and 60 days were taken to the histopathological analysis and, in order to quantify the inflammatory response and to evaluate possible formation of mineralization structures through the Von Kossa test, times 30 and 60 days were used. Quantification of IL-1 β and IL-8 cytokines by ELISA and qPCR for bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-4) and osteocalcin were performed at periods of 30 and 60 days. The sham group showed a slight variation in the profile and intensity of the inflammatory infiltrate. The control group had significantly higher inflammatory scores on day 15 than the Sham group. It was observed that BD showed similar inflammatory response to the sham group, without significant variation throughout the experimental periods. The MTA group presented a significant increase of a chronic inflammatory profile at day 30 with a significant reduction of this to day 60 when compared to Sham. The granulation tissue in the Sham group showed no significant variation in all experimental periods. The control and BD groups were significantly higher on days 15 and 30 when compared to Sham with significant reduction on day 60 when compared to day 15. The MTA group did not show significant variation at all times. The groups did not present necrosis or endocytosed material. BD and MTA showed significant positive kossa areas. BD and MTA showed significant increase for IL-1 β when compared to control group, and BD increased significantly for IL-8, in both periods. In qPCR, gene expression for BMP-2 was significant only for BD in both periods, BMP-4 and OC were significant only for MTA, in both periods. It is concluded that BD and MTA are biocompatible, stimulate mineralization, stimulating expression of osteogenic genes.

Key words: MTA, Biodentine, biocompatibility, biomineralization.

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Cortes histológicos de tecido subcutâneo nos períodos de 15, 30 e 60 dias (x40)...29
- Figura 2. Cortes histológicos de tecido subcutâneo nos períodos de 30 e 60 dias pela técnica de coloração Von Kossa.(40x). Setas amarelas evidenciam estruturas de calcificação nos grupos que apresentavam os materiais de estudo.....29
- Figura.3. Níveis de citocinas IL -1 β e IL-8 nos grupos Sham, controle, Biodentine e MTA, nos períodos de 30 e 60 dias.....30
- Figura 4. Níveis da expressão relativa de RNAm para BMP-2, BMP-4 e OC nos períodos de 30 e 60 dias, nos grupos controle, BD e MTA.....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pares de iniciadores utilizados em números de acesso de PCR e NCBI em tempo real.....	27
Tabela 2. Medianas dos escores do perfil inflamatório, intensidade da inflamação, tecido de granulação e fibrose dos grupos nos três períodos experimentais.	28
Tabela 3. Porcentagem da presença de calcificação distrófica nos três períodos experimentais; comparação entre os grupos em cada período e comparação de cada material em relação ao tempo.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SCR	Sistema de Canais Radiculares
MTA	Agregado Trióxido Mineral
BD	Biodentine
PCR	Reação de cadeia de polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
IRM	Material Restaurador Provisório
OZE	Óxido de Zinco e Eugenol
HE	Hematoxilina e Eosina
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
OC	Osteocalcina
TGF β -1	Fator de crescimento epitelial beta -1
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
C _t	Cycle threshold
RNA	Ácido Ribonucléico
DNA	Ácido Desorribonucleico
cDNA	DNA complementar
IL	Interleucina
CHX	Clorexidina
ISO	Organização Internacional para Padronização

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1. Agregado Trióxido Mineral.....	7
2.2. Biodentine	10
2.3. Biomineralização: Proteína Morfogenética Óssea e Osteocalcina	11
2.4. Biocompatibilidade e resposta inflamatória.....	13
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo Geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. JUSTIFICATIVA.....	16
5. CAPÍTULO	
5.1. Capítulo 1.....	17
6. CONCLUSÃO.....	39
7. REFERÊNCIAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

O dente é um órgão rico em tecido mineralizado, tendo como principal mineral a hidroxiapatita. Sua estrutura é composta por polpa (tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado e innervado), dentina e esmalte (tecidos duros e avasculares). Está envolto por tecidos perirradiculares (periodonto) e encontra-se implantado no osso alveolar. Além disso, estruturas de comunicação e túbulos dentinários fazem-se presentes permitindo que haja fluxo de fluidos entre a dentina e a polpa.

As principais alterações patológicas que acometem a polpa e tecidos perirradiculares podem ter etiologia inflamatória ou infecciosa. Quando essas alterações possuem origem inflamatória, uma resposta será desencadeada, e sua intensidade irá variar de acordo com o tipo de agressão. Uma vez que a injúria rompe a integridade tecidual, mecanismos de ação serão iniciados na tentativa de promover o reparo da área. Quando essas alterações possuem origem infecciosa, bactérias podem promover danos aos tecidos periapicais gerando uma resposta inflamatória que pode provocar alterações patológicas, podendo as bactérias serem oriundas do ligamento periodontal, da via sanguínea ou dos túbulos dentinários. Embora bactérias possam alcançar a polpa de várias maneiras, ainda assim a cárie dental é a via mais comumente observada na prática clínica. Portanto, a partir do momento em que a cárie se encontra em estágio avançado, comprometendo o tecido pulpar, a difusão dos produtos bacterianos através dos túbulos dentinários desencadeará um processo inflamatório que, se não interrompido, poderá levar à necrose do tecido pulpar, sendo necessário, portanto, realizar o tratamento endodôntico (DUDEJA, 2015).

O tratamento endodôntico tem por um dos principais objetivos promover limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares (SCR). Essas etapas visam remover todo o tecido pulpar remanescente, fonte de proliferação de microorganismos e subprodutos, bem como proporcionar um formato cônico ao SCR, o que favorecerá sua obturação tridimensional (SCHILDER, 2006).

Na etapa final de obturação, faz-se necessário o preenchimento hermético do SCR, de modo que o espaço do canal radicular esteja isolado de todas as vias de comunicação entre o canal e o periodonto. Deste modo, os materiais obturadores devem promover vedamento de toda a estrutura, prevenindo a entrada de microorganismos ou fluidos teciduais para o interior do canal (NETO *et al.*, 2007). Os cones de guta-percha são o material sólido de escolha, principalmente por não causarem danos aos tecidos apicais e periapicais. Somente estes materiais, porém, não são capazes de selar adequadamente o SCR, sendo necessário,

portanto, associá-los a algum tipo de cimento endodôntico, os quais têm a função de preencher os espaços existentes entre os cones de guta-percha e a parede do canal radicular (WEIS *et al.*, 2004, RAHIMI *et al.*, 2009).

Os cimentos endodônticos podem ser classificados de acordo com a sua composição, e, por se apresentarem em estado semi- sólido, eles poderão ter contato direto com o forame apical ou com o tecido periapical circundante. Mesmo que seja uma área de contato relativamente pequena, é importante que o material apresente boas características biológicas, pois efeitos adversos locais são possíveis, e a incompatibilidade biológica poderá interferir ou impedir o processo de reparo da área, resultando no insucesso do tratamento (GEURTSSEN, 2001).

Nesse sentido, testes que avaliem a biocompatibilidade de materiais têm sido cada vez mais realizados, pois, além de não gerar danos aos tecidos hospedeiros, esses materiais devem estimular uma resposta celular e tecidual que induza a restituição estrutural e funcional dos tecidos ou a sua reparação, sendo, portanto, considerado um dos requisitos básicos na avaliação de um material obturador (PERARD *et al.*, 2013).

Dentre a variedade de cimentos, tem-se destacado os materiais biocerâmicos, estes que se apresentam principalmente como cimentos reparadores (DAMAS *et al.*, 2011) e como cimento obturador (HESS *et al.*, 2011). Dos cimentos reparadores destacam-se aqueles à base de silicato de cálcio, que têm sido considerados de escolha tanto para o selamento de comunicações entre a cavidade pulpar e a superfície externa do dente quanto para retrobturação em cirurgias parendodônticas (LEE *et al.*, 2004). Como exemplos desse grupo de materiais podem ser incluídos o MTA (Agregado Trióxido Mineral) e o Biodentine (BD).

O MTA foi desenvolvido na década de 90 e atualmente é amplamente indicado por apresentar bom selamento marginal e biocompatibilidade (HOLLAND *et al.*, 2001) quando comparado a outros materiais existentes no mercado. Apresenta-se em duas opções, cinza e branco, que se diferenciam pela ausência de ferro e menores quantidades de alumínio e magnésio no MTA branco. É composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, aluminoferrite de tetracálcico, sulfato de cálcio, óxido de bismuto, óxido de cálcio, óxido de silício e óxido de alumínio.

Quanto a sua aplicabilidade clínica é considerado o produto de escolha em casos de reabsorção dentinária, perfurações, dentes com rizogênese incompleta e capeamento pulpar (TANOMARU-FILHO *et al.*, 2009). Apesar de o MTA apresentar propriedades ideais de um material reparador, a presença de metais pesados em sua composição vem sendo vista como problema. Alguns estudos confirmaram que os níveis de arsênio são maiores que o limite

seguro especificado pela norma ISO 9917-1 de 2007 (SCHEMBRI *et al.*, 2010). Além disso, há evidências de que o óxido de bismuto compromete a estética por promover escurecimento na estrutura dentária, bem como interfere no mecanismo de hidratação, promovendo falhas na microestrutura (CAMILLERI, 2007). Como consequência, há um aumento na porosidade, resultando na diminuição da resistência do material (COOSMARAWAMY *et al.*, 2007).

O Biodentine é um cimento bioativo à base de silicato de cálcio que apresenta propriedades mecânicas semelhantes à dentina e pode ser utilizado tanto na coroa quanto na raiz, por não causar escurecimento. Apresenta em sua composição o silicato tricálcico em substituição ao cimento Portland, fator que permite um melhor controle sobre as impurezas. Suas indicações são semelhantes às do MTA, e, por apresentar essa similaridade, foi lançado comercialmente como uma opção a seu emprego. Quanto a sua composição, seu pó é constituído fundamentalmente de silicato de tricálcico, silicato dicálcico, carbonato de cálcio, óxido de zircônio e óxido de ferro, de cor branca e hidrofílico. O líquido é composto por cloreto de cálcio e polímero hidrossolúvel (FORMOSA *et al.*, 2012).

Apesar de ser um material promissor, são necessários mais estudos avaliando as suas características e, quanto a sua biocompatibilidade, há poucos relatos sugerindo essa propriedade. Ainda não se sabe, porém, os possíveis eventos celulares e moleculares que modulam o reparo tecidual proporcionado para este material (LAURENT *et al.*, 2012; ZANINI *et al.*, 2012).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MTA (Agregado de Trióxido Mineral)

O MTA tornou-se um dos materiais de referência para o tratamento de perfurações, capeamento pulpar e obturação retrógrada em função de sua capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado.

Apresenta como principais características boa radiopacidade, baixa solubilidade, pH elevado e capacidade de expansão durante a presa. O MTA também é biocompatível e possui atividade antimicrobiana. Além disso, aumenta a expressão do colágeno tipo I, osteocalcina em osteoblastos, estimula a produção de proteína morfogenética tipo- 2 (BMP-2) e a expressão de fosfatase alcalina (MORI *et al.*, 2014).

Torabinejad *et al.*, em 1995, compararam a reação tecidual dos cimentos MTA e Super EBA (Ácido Etoxi Benzóico) por meio de implantes subcutâneos. Foram confeccionadas lojas ósseas nas mandíbulas de sete animais. Os dois materiais testados foram colocados em tubos de teflon e implantados nas lojas de seis animais. No sétimo animal, as

lojas intraósseas foram mantidas vazias, servindo como controle negativo. Passados dois meses, os tecidos foram coletados e levados para análise. Os resultados obtidos mostraram que o MTA proporcionou uma resposta inflamatória mais discreta que o Super EBA. As amostras do MTA mostraram a presença de tecido ósseo adjacente à área do implante. Tanto o MTA quanto o Super EBA, entretanto, foram considerados biocompatíveis.

Koh *et al.* (1988) compararam a resposta celular frente ao MTA e IRM (Material Restaurador Provisório) em uma cultura de osteoblastos da linhagem celular MG63, estudando a citomorfologia, bem como a produção de citocinas que, de acordo com os autores, está relacionada com fases de formação óssea. Além disso, esse estudo tentou esclarecer o mecanismo pelo qual o MTA parece induzir o processo de cementogênese. O teste ELISA mostrou níveis elevados de interleucinas, independente do período de tempo, quando na presença do MTA. Entretanto, quando as células cresciam sozinhas ou na presença do IRM, os níveis dessas interleucinas não foram detectados. Desse modo, concluiu-se que o MTA funciona como substrato biológico para células ósseas.

Em 2001, Holland *et al.* realizaram estudo com tubos de dentina preenchidos com MTA, Cimento Portland ou hidróxido de cálcio, implantados no tecido subcutâneo dos ratos. Após 7 e 30 dias os animais foram sacrificados, e os espécimes levados para análise em microscópio de luz polarizada e técnica de Von Kossa, que identifica mineralização tecidual. Os resultados foram semelhantes para os três materiais testados. Aos 7 dias, os implantes resultaram em uma reação inflamatória leve a moderada, se comparada aos 30 dias que foi considerada discreta. Diante disso, pode-se concluir que o mecanismo de ação desses três materiais parecem ser semelhantes.

Foi realizado também um estudo investigando os efeitos do MTA em relação ao crescimento de cementoblastos e a produção de osteocalcina, por meio de uma cultura de células. Para isso, Thompson *et al.* (2003), realizaram marcações de proteínas específicas para mineralização, que foram: colágeno tipo I, fosfatase alcalina, osteocalcina e sialoproteína óssea. Após manipulação e incubação por 24h, o MTA foi colocado em contato com os cementoblastos, e feita nova incubação por 7 e 12 dias. Os resultados mostraram que houve formação de osteocalcina e que, dessa forma, o MTA possui capacidade na produção de matriz mineralizada por cementoblastos.

Motta *et al.*, em 2003, avaliaram a resposta tecidual subcutânea de ratos por meio da implantação de tubos de polietileno preenchidos com MTA e pasta Calen, pasta radiopaca à base de hidróxido de Cálcio, e, como controle, foram utilizados tubos vazios. Após 7, 14 e 30 dias, os animais foram sacrificados, e os tecidos removidos para análise. As amostras

foram coradas para HE (Hematoxilina e Eosina) e Von Kossa. Foi observada no grupo da pasta Calen presença de reação inflamatória severa ao 7 e aos 14 dias, enquanto que aos 30 dias houve redução, sendo classificada como leve. Além disso, foram observadas áreas Von Kossa positivas. Já no grupo MTA, aos 7 dias, notou-se infiltrado inflamatório moderado e, aos 14 dias, menor extensão de reação inflamatória foi observada, mas ainda considerada moderada. Aos 30 dias a reação inflamatória foi classificada como leve. Com bases nesses resultados, ambos os materiais apresentaram pequena reação inflamatória. Somente a pasta Calen apresentou áreas basofílicas calcificadas.

Morais *et al.* (2006) avaliaram a biocompatibilidade do MTA (ProRoot) e do cimento de Portland acrescido de iodofórmio por meio de implantes de tubos de polietileno preenchido com os materiais em tecido subcutâneo. Utilizaram-se dezoito ratos Wistar e, após o procedimento de implantação, os tecidos foram analisados por 7, 30 e 60 dias. Posteriormente, os animais foram sacrificados, e seus tecidos coletados para análise. Aos 7 dias o grupo do cimento de Portland acrescido de iodofórmio foi o que apresentou menor reação inflamatória. Após os 30 dias, as amostras de MTA apresentaram áreas sugestivas de calcificação distrófica. Já no período de 60 dias, observou-se reparo na área de tecido conjuntivo no grupo controle, nos espécimes de MTA e cimento de Portland, e verificou-se reação inflamatória moderada, porém a cápsula do grupo de Cimento de Portland se apresentou mais organizada. De acordo com o estudo, pode-se concluir que os três materiais não tiveram diferenças significativas.

A fim de avaliar a resposta inflamatória e capacidade de neoformação óssea em alvéolo de ratos, Cintra *et al.*, em 2006, implantaram tubos de polietileno, preenchidos com MTA e MBPc (cimento endodôntico experimental à base de hidróxido de cálcio - USP), e alguns tubos vazios como controle. Foram extraídos os incisivos centrais superiores e implantados os tubos nos alvéolos. Aos 7, 15 e 30 dias após a realização do procedimento, os animais foram sacrificados, e os tecidos levados para análise microscópica. No período experimental de 7 dias, o MTA apresentou áreas necróticas, e, aos 15 e 30 dias, áreas de mineralização foram observadas. Similarmente, o MBPc, nos períodos de 7 e 15 dias, apresentou leve infiltrado inflamatório. Aos 30 dias foi observada neoformação óssea, porém o reparo alveolar não foi completo. Os resultados obtidos demonstraram que os dois materiais apresentaram comportamento biológico semelhante.

2.2. Biodentine

Atualmente disponível no mercado, o Biodentine é comercializado como um 'substituto de dentina 'bioativo'. Trata-se de um cimento à base de silicato tricálcico sintético (PAWAR *et al.*, 2013). A tecnologia com que é produzida resulta em silicato tricálcico, um composto livre de impureza metálica (SEPTODONT, 2014).

É composto por uma cápsula (pó) e uma pipeta (líquido). O pó é constituído por silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de ferro (corante), óxido de zircónio (radiopacificador) e dois materiais de enchimento, carbonato de cálcio e óxido de cálcio.

Dos estudos realizados com BD, ainda existem poucos em subcutâneo de ratos, e esses em sua maioria avaliam apenas a reação inflamatória, tornando-se necessário maior investigação sobre os mediadores químicos que podem estar relacionados a fim de promover melhor reparo tecidual.

Em 2014, foi realizado um estudo a fim de avaliar a biocompatibilidade de três cimentos endodônticos, MTA, Óxido de zinco e eugenol (OZE) e Biodentine em tecido subcutâneo de ratos. Para isso, Mori *et al.* (2014) utilizaram 15 ratos machos Wistar, nos quais foram realizadas incisões na região dorsal, e tubos de polietileno contendo os respectivos cimentos foram inseridos separadamente no tecido subcutâneo, além de um tubo vazio (grupo controle). Após 7, 14 e 30 dias os animais foram sacrificados, e as amostras levadas para análise histopatológica. Observou-se que, aos 7 dias, o processo inflamatório foi moderado quando em contato com o BD, no entanto, aos 14 e 30 dias o processo inflamatório se mostrou leve ou não significativo. Nas amostras de MTA foram observadas poucas células inflamatórias durante os períodos analisados. Já nos espécimes de OZE, aos 7 dias, células inflamatórias estavam ausentes, enquanto que, aos 14 e 30 dias o processo inflamatório foi classificado como grave ou moderado. Desse modo, concluiu-se que o BD foi biocompatível.

Laurent *et al.*, em 2012, realizaram um estudo na tentativa de avaliar a capacidade do Biodentine induzir a síntese de dentina reparadora e investigar a sua capacidade de modular a secreção de fator de Crescimento Transformador-beta (TGF- β 1) por células da polpa. Para isso, o BD foi aplicado diretamente sobre a polpa dentária em um modelo de cultura de dente humano. Após os períodos de cultura, foi analisada a interação do material com a polpa dentária em secções de tecido. O efeito de aumentar a área de superfície do material sobre a secreção de TGF- β 1 foi investigado em culturas de células em membrana de celulose e comparada com a de MTA, hidróxido de cálcio e resina adesiva Xeno®III. Após a realização de lesões artificiais em culturas de células de celulose, os materiais foram

adicionados durante 24 h e, em seguida, a secreção de TGF- β 1 (Fator de Crescimento Transformador-beta) foi quantificada por ELISA. Como resultados, os autores concluíram que o BD induziu a formação de focos mineralizados logo após sua aplicação. A mineralização apareceu sob a forma de osteodentina e expressou marcadores de odontoblastos. Além disso, a secreção de TGF- β 1 a partir de células de celulose aumentou significativamente.

Em um estudo realizado por Guneser *et al.*, em 2013, avaliaram a resistência de união push-out dos seguintes materiais: Biodentine, ProRoot MTA, amálgama, Dyract AP (tipo de cimento de iômero de vidro) e IRM. Para isso, confeccionaram discos de dentina com 1 mm de espessura, os quais eram imersos em diferentes soluções irrigadoras (Hipoclorito de sódio a 3,5%, Gluconato de clorexidina a 2% (CHX), ou solução salina por 30 minutos. Nenhuma irrigação foi realizada nos controles, e uma bolinha de algodão úmida foi colocada por cima de cada material teste. Após incubação durante 48 horas, a resistência ao desalojamento das amostras foi medido usando uma máquina de ensaio universal. As amostras foram examinadas sob um microscópio para determinar a natureza das falhas de adesão. O Biodentine apresentou maior resistência de união push-out do que o MTA. A resistência de união push-out de Dyract AP, amálgama, IRM, e Biodentine não foi significativamente diferente quando imerso em hipoclorito de sódio, CHX e soluções salinas, enquanto MTA perdeu força quando expostos a CHX. Portanto, Biodentine apresentou desempenho considerável como um material de reparo em caso de perfurações mesmo depois de exposto a vários irrigantes, sendo que o MTA apresentou a menor resistência de união push-out a dentina radicular.

KIM *et al.*, 2016, realizaram um estudo com 18 ratos, em que cavidades dentárias foram preparadas, e a polpa coberta por ProRoot MTA, Biodentine e BioAggregate. Os espécimes foram analisados através de tomografia (micro CT) e imunohistoquímica para detectar sialoproteína de dentina. Como resultados, obteve-se que o ProRoot MTA e o Biodentine apresentaram significativa formação de tecido duro, além de este último formar um tecido mais duro, espesso e homogêneo. Chegou-se à conclusão que tanto o BD quanto o BioAggregate podem ser considerados como alternativa ao ProRoot MTA, que tem a desvantagem de manchamento dental.

2.3. Biomineralização: Proteína Morfogenética Óssea (BMP) e Osteocalcina (OC).

Apesar de haver muitos estudos laboratoriais acerca dos materiais à base de silicato de cálcio, ainda são necessários mais estudos sobre a sua bioatividade e biomineralização.

Estudos já foram realizados com implantes em subcutâneo. Um deles utilizou MTA em modelos animais e detectou a formação de uma área Von Kossa positiva, indicativa da mineralização (HOLLAND *et al.*, 1999; GOMES-FILHO *et al.*, 2008), apoiando a visão de que os materiais à base de silicato de cálcio promovem biomineralização quando em contato com o tecido conjuntivo.

Estudo recente realizado por Hinata *et al.* (2017) avaliou as habilidades de três materiais à base de silicato de cálcio para produzir precipitados de apatita, após serem implantados em tecido subcutâneo de ratos. Eles perceberam que os precipitados foram provavelmente produzidos pela interação dos íons cálcio liberados dos materiais com íons fosfato presente nos fluidos corporais, contribuindo para a formação de fosfato de cálcio nas superfícies interfaciais dos materiais. Nesse estudo, uma área rica em Ca^{++} e PO_4^{--} foi detectada ao longo da interface material-tecido, sendo indicativo de biomineralização em todas as amostras. Esses achados sugerem que todos os materiais foram bioativos e causaram biomineralização *in vivo*, embora o grau dessas atividades tenha parecido diferir entre os materiais.

Na tentativa de melhor identificar a formação de áreas com presença de mineralização, buscou-se associar possíveis proteínas que possam estar envolvidas nesse processo. Dentre os vários marcadores ósseos, destacam-se as BMPs (Proteínas Morfogenéticas Ósseas). Já foram identificadas mais de 20 proteínas pertencentes a esta família desde a sua descoberta na década de 1960 até os dias atuais. Estas, por sua vez, são fatores de crescimento multifuncionais que se incluem na superfamília TGF- β envolvidos na regulação da proliferação celular, diferenciação e apoptose. Além disso, podem exercer diferentes funções conforme sejam as circunstâncias espaciais e temporais (KIM *et al.*, 2011).

As pesquisas biomoleculares começaram a buscar inicialmente a capacidade que essas proteínas possuem de induzir a formação de novo osso e cartilagem heterotópicos e ortotópicos, ou seja, o potencial de criar tecidos em locais nos quais normalmente estes não existem. Desta forma, foi verificada a possível formação de novo osso e cartilagem ectópicos, após a sua implantação subcutânea (CHENARD *et al.*, 2012).

Rodrigues *et al.* (2017) avaliaram o efeito do MTA e do Biodentine na viabilidade, diferenciação osteogênica e expressão de BMP-2 em cultura de células osteogênicas. Constataram que os materiais destacaram-se pela capacidade de induzir BMP-2. Em estudo anterior foi visto que o MTA poderia induzir a expressão do gene BMP-2 e calcificação em células de ligamento periodontal humano (MAEDA *et al.*, 2010). A avaliação da expressão de RNAm de BMP-2 em células expostas ao Biodentine, porém, ainda não havia

sido relatada na literatura. Com isso, concluíram que tanto o MTA quanto o Biodentine mostraram biocompatibilidade e bioatividade sobre a expressão de BMP-2. Embora, o Biodentine tenha apresentado um efeito significativamente maior na mineralização do que o MTA.

Atualmente, a implantação de BMP-2 no organismo pode ser realizada por meio de uma matriz que promove uma taxa de liberação previsível e contínua desta proteína morfogenética. Para isso, utilizaram como matriz uma esponja de colágeno absorvível com concentrações apropriadas da BMP (especificamente da BMP-2 humana sintetizada por meio de tecnologia recombinante, ou rhBMP-2) que, posteriormente, foi implantada no organismo hospedeiro, onde este seria capaz de induzir a formação de tecido ósseo no sítio de implantação. Ao avaliar radiograficamente esse osso, biomecanicamente e histologicamente, confirmou-se que se comporta como osso nativo (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Herford em 2011, realizou um estudo realizado em pacientes com grandes defeitos mandibulares que necessitavam de reconstruções ósseas e reabilitação protética. Avaliaram a utilização de rhBPM-2 (proteína morfogenética óssea recombinante tipo 2). Nas intervenções, utilizaram métodos de estabilização e manutenção de espaço do defeito, apesar de não utilizarem qualquer tipo de material de enxerto ósseo adicional. Em todos os pacientes, obteve-se resolução do defeito de continuidade, clinicamente e radiograficamente, e, após 6 meses, todas as lesões foram substituídas por osso mineralizado em 68% do volume (HERFORD *et al.*, 2011).

Outra proteína importante relacionada à formação óssea é a Osteocalcina (OC). OWEN *et al.*, 1990 afirmaram que o aparecimento e o aumento de produção da proteína são coincidentes com o início do processo de mineralização. A OC é uma proteína secretada pelos osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos. Uma de suas funções está relacionada à ligação do cálcio à matriz óssea, por isso, pode ser utilizada como um marcador bioquímico da formação óssea. O papel exato desta proteína na remodelação óssea ainda necessita de mais estudos, no entanto, mostrou-se como uma via importante da ativação da formação óssea através do seu efeito sobre os osteoblastos (HAN *et al.*, 2008).

2.4. Biocompatibilidade e resposta inflamatória

A biocompatibilidade é definida como a capacidade de um material funcionar em uma aplicação específica na presença de uma resposta apropriada do hospedeiro (WILLIAMS, 1987). É de fundamental importância que os materiais odontológicos

apresentem biocompatibilidade para que reações inflamatórias significativas sejam evitadas a fim de permitir o reparo.

Na endodontia os materiais podem ser utilizados desde a proteção da polpa até o selamento dos canais radiculares. Assim, a compatibilidade biológica é uma das propriedades mais importantes dos cimentos endodônticos, visto que os componentes tóxicos podem entrar em contato com tecidos adjacentes e induzir irritação (SOUZA *et al.*, 2006).

Foi verificado que materiais em íntimo contato com tecidos vivos são irritantes, porém, segundo Shahi *et al.* (2006), mais importante do que o potencial irritante dos materiais é a duração deste efeito sobre os tecidos aos quais são aplicados. Assim, um material que permite uma redução na resposta inflamatória ao longo do tempo pode ser considerado biocompatível, como, por exemplo, o hidróxido de cálcio, que é rotineiramente usado durante tratamento endodôntico, promovendo uma resposta inflamatória inicial quando em contato com os tecidos, e, após alguns dias, o processo inflamatório torna-se não significativo e há reparação da área tratada (HAUMAN & LOVE, 2003).

Yaltirik *et al.* (2004) relataram a ocorrência de um processo inflamatório crônico promovido pelo MTA 60 dias após a implantação subcutânea do material. Entretanto, a biocompatibilidade do MTA pode ser atribuída à formação de precipitados superficiais contendo fosfato de cálcio amorfo e/ou carbonato de apatita quando em contato com soluções contendo fosfato (HINATA *et al.*, 2017). Estas reações envolvem a interação de íons Ca^{++} do MTA com os fosfatos.

Ao comparar a biocompatibilidade de dois cimentos, Endobider e MTA, foi verificado que, 30 dias após a implantação subcutânea, todos os cimentos testados apresentaram, no máximo, uma reação inflamatória discreta. Além disso, o infiltrado de células polimorfas e mononucleares apresentou redução significativa em comparação com o período inicial de análise (GARCIA *et al.*, 2014).

Em uma análise *in vivo*, foi relatado que o Biodentine apresentou maior número de células inflamatórias e células imunomarcadas com interleucina-6 (IL-6) em comparação com MTA aos 7 e 15 dias, no entanto, esta reação revelou uma redução gradual e significativa da imunexpressão de IL-6, nas cápsulas adjacentes ao Biodentine de 7 a 60 dias, confirmando o conceito de biocompatibilidade do Biodentine (FONSECA *et al.*, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a resposta tecidual os mecanismos inflamatórios envolvidos no processo de reparo, bem como analisar as características de biocompatibilidade e o potencial de biomineralização apresentadas pelo MTA branco (Angelus) e pelo Biodentine (Septodont) no tecido subcutâneo dos ratos.

3.2. Objetivos específicos

- a. Avaliar a resposta inflamatória tecidual através de análises histopatológicas do tecido adjacente à cápsula contendo os materiais implantados no tecido subcutâneo, nos períodos de 15, 30 e 60 dias;
- b. Detectar pela técnica de Von Kossa estruturas de mineralização onde possa ter uma possível precipitação de fosfato de cálcio no tecido adjacente ao material implantado, nos períodos 30 e 60 dias;
- c. Quantificar por ELISA os níveis de citocinas IL-1 β e IL-8 nos tecidos adjacentes aos materiais implantados após o período de 30 e 60 dias;
- d. Quantificar por meio de PCR a expressão dos genes para as proteínas BMP-2, BMP-4 e osteocalcina envolvidas no processo de formação óssea após um período de 30 e 60 dias.

4. HIPÓTESE

Tendo em vista que o BD é um cimento desenvolvido recentemente, e até então tem apresentado características que superam as do MTA, principalmente quanto à pureza dos seus compostos, torna-se importante realizar um estudo para a comprovação da efetividade das suas propriedades biológicas, visto que o BD apresenta potencial de promover um processo de mineralização e estimular a proliferação celular e diferenciação (ZANINI *et al.*, 2012; LAURENT *et al.*, 2012; TRAN *et al.*, 2012). Faz-se necessário, portanto, compreender os fatores fisiológicos envolvidos na sua relação com o perfil inflamatório, citocinas e expressão genética para proteínas participantes do processo de mineralização.

5. CAPÍTULO 1

Dissertação baseada no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Ceará que regulamenta o formato alternativo para trabalhos de conclusão de Mestrado (Dissertações) e permite a inserção de artigo científico de autoria ou coautoria do candidato. Desta forma, a presente Dissertação é composta por um artigo científico redigido de acordo com as normas estabelecidas pela revista científica escolhida.

5.1. Capítulo 1 “Potencial de biomineralização e biocompatibilidade de dois cimentos endodônticos - estudo em tecido subcutâneo de ratos.” com título sugerido em Inglês “Potential of biomineralization and biocompatibility of two endodontic cements - study in subcutaneous tissue of rats”. Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico- *International Endodontic Journal* (ISSN 1365-2591).

Página de título

Potencial de biomineralização e biocompatibilidade de dois cimentos reparadores endodônticos.

Tamara de Abreu Souza^a, Bruno Carvalho Vasconcelos^b, Paulo Goberlânio de Barros Silva^c, José Jackson do Nascimento Costa^d, Mirna Marques Bezerra^e, Rayssa de Fátima Lopes Arruda Carneiro^b, Janice Oliveira Fontenele Barcelos^e, Hellíada Vasconcelos Chaves^b.

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

^bFaculdade de Odontologia de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, Sobral, CE, Brasil.

^cPrograma de Pós Graduação de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

^d Rede de Biotecnologia do Nordeste, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^e Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, Sobral, CE, Brasil.

Palavras Chaves: MTA, Biodentine, Biocompatibilidade, Biomineralização.

Autor de correspondência:

Hellíada Vasconcelos Chaves

Sobral Dental School, Federal University of Ceará, Campus Sobral

CEP: 62010-590, Sobral, CE, Brazil

Email: helliadachaves@yahoo.com.br

Agradecimentos

Os autores negam quaisquer conflitos de interesse relacionados a este estudo.

RESUMO

Introdução: Avaliou-se a reação tecidual ocasionada pela implantação subcutânea de ratos, dos cimentos Biodentine (BD) e Agregado Trióxido Mineral branco (MTA) quanto ao perfil e intensidade inflamatória, tecido de granulação, fibrose e calcificação distrófica. Identificar pela técnica de von kossa estruturas mineralizadas. Quantificou-se por ELISA as citocinas IL-1 β e IL- 8, por qPCR o RNAm para proteínas morfogenética óssea (BMP- 2, BMP- 4) e Osteocalcina (OC). **Materiais e métodos:** Foram utilizados 30 ratos machos Wistar. Os materiais foram implantados em tubos de polietileno no tecido subcutâneo desses animais nos períodos experimentais de 15, 30 e 60 dias, e posteriormente os animais foram eutanasiados. **Resultados:** O grupo sham mostrou apenas discreta variação no perfil e na intensidade do infiltrado inflamatório. O grupo controle apresentou no dia 15 escore inflamatório significativamente superior ao grupo sham. Observou-se que BD mostrou resposta inflamatória similar ao grupo sham, sem variação significativa ao longo dos períodos experimentais. O grupo MTA apresentou aumento significativo de um perfil inflamatório crônico no dia 30 com redução significante deste para o dia 60 quando comparado ao Sham. O tecido de granulação no grupo sham não mostrou variação significativa em todos os períodos experimentais. Os grupos controle e BD foram significativamente superior nos dias 15 e 30 quando comparados ao sham com redução significante no dia 60 quando comparado ao dia 15 . O grupo MTA não apresentou variação significativa em todos os tempos. Nenhum grupo apresentou necrose ou material endocitado. BD e MTA apresentaram áreas de von kossa positiva. BD e MTA apresentaram aumento significativo para IL-1 β quando comparado com grupo controle, e BD aumento significativo para IL- 8, em ambos períodos. Na qPCR, a expressão dos genes para BMP- 2 foi significativa apenas para BD em ambos os períodos , BMP- 4 e OC apresentaram significância apenas para MTA, em ambos os períodos. **Conclusão:** BD e MTA são biocompatíveis, estimulam mineralização, estimulando expressão de genes osteogênicos.

Palavras-chave: MTA, Biodentine, biocompatibilidade, biomineralização.

ABSTRACT

Introduction: A tissue reaction caused by the subcutaneous implantation of rats, Biodentine(BD) and White Mineral Trioxide Aggregate (MTA) over time and inflammatory intensity, granulation tissue, fibrosis and dystrophic calcification were marry. To identify mineralized structures in the von kossa technique. It was quantified by ELISA as IL-1 β and IL-8 cytokines, by qPCR or mRNA for bone morphogenetic proteins (BMP-2, BMP-4) and Osteocalcin (OC). **Materials and methods:** Thirty male Wistar rats were used. The materials were implanted in polyethylene tubes in the subcutaneous animal in the experiments of 15, 30 and 60 days, and later in animals were euthanized. **Results:**The sham group only showed slight variation in the profile and intensity of the infiltrate infiltrate. The control group had a day 15 that was significantly higher than the sham group. It was observed that BD presented similar response to the sham group, without significant variation throughout the experimental periods. The MTA group presented a significant increase in a chronic risk profile at day 30 with a significant reduction at day 60 when compared to sham. The granulation tissue in the sham group was not evaluated in all experimental aspects. The control and BD groups were significantly higher on days 15 and 30 when compared with the control group. The MTA group was not presented with significance at all times. No group presented necrosis or endocytosis. BD and MTA - areas of positive kossa law. BD and MTAs are a significant increase for IL-1 β as compared to the control, and BD increases significantly for IL-8 in both areas. In qPCR, an expression of the genes for BMP-2 was significant only for BD in both periods, BMP-4 and OC meant only for MTA in both periods. **Conclusion:** BD and MTA are biocompatible, stimulating the mineralization, stimulating the expression of osteogenic genes.

Key words: MTA, Biodentine, biocompatibility, biomineralization.

Introdução

Os cimentos endodônticos podem ser classificados de acordo com a sua composição, e, por se apresentarem em estado semi-sólido, eles poderão ter contato direto com o forame apical ou com o tecido periapical circundante. Mesmo que seja uma área de contato relativamente pequena, é importante que o material apresente boas características biológicas, pois efeitos adversos locais são possíveis, e a incompatibilidade biológica poderá interferir ou impedir o processo de reparo da área, resultando no insucesso do tratamento (GEURTSSEN, 2001).

Nesse sentido, testes que avaliem a biocompatibilidade de materiais têm sido cada vez mais realizados, pois além de não gerar danos aos tecidos hospedeiros, esses materiais devem estimular uma resposta celular e tecidual que induza a restituição estrutural e funcional dos tecidos ou a sua reparação, sendo, portanto, considerado um dos requisitos básicos na avaliação de um material obturador (PERARD *et al.*, 2013). Na tentativa de melhor identificar a formação de áreas com presença de mineralização, buscou-se associar possíveis proteínas que possam estar envolvidas nesse processo. Dentre os vários marcadores ósseos, podemos destacar as BMPs (Proteínas Morfogenéticas Ósseas).

Dentre a variedade de cimentos, tem-se destacado os materiais biocerâmicos, que se apresentam principalmente como cimentos reparadores (DAMAS *et al.*, 2011) e como cimento obturador (HESS *et al.*, 2011). Dos cimentos reparadores destacam-se aqueles à base de silicato de cálcio, que têm sido considerados de escolha tanto para o selamento de comunicações entre a cavidade pulpar e a superfície externa do dente quanto para retobturação em cirurgias pararendodônticas (LEE *et al.*, 2004). Como exemplos desse grupo de materiais podem ser incluídos o MTA (Agregado Trióxido Mineral) e o Biodentine (BD).

O MTA foi desenvolvido na década de 90 e atualmente é amplamente indicado por apresentar bom selamento marginal e biocompatibilidade (HOLLAND *et al.*, 2001) quando comparado a outros materiais existentes no mercado. Apresenta-se em duas opções, cinza e branco, que se diferenciam pela ausência de ferro e menores quantidades de alumínio e magnésio no MTA branco. É composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, aluminoferrite de tetracálcico, sulfato de cálcio, óxido de bismuto, óxido de cálcio, óxido de silício e óxido de alumínio. Quanto a sua aplicabilidade clínica é considerado o produto de escolha em casos de reabsorção dentinária, perfurações, dentes com rizogênese incompleta e capeamento pulpar (TANOMARU-FILHO *et al.*, 2009).

O Biodentine (Septodont, Saint Maur dês Fosse's, Cedex, França) é um cimento bioativo à base de silicato de cálcio que apresenta propriedades mecânicas semelhantes à

dentina e pode ser utilizado tanto na coroa quanto na raiz, por não causar escurecimento. Apresenta em sua composição o silicato tricálcico em substituição ao cimento Portland, fator que permite um melhor controle sobre as impurezas. Suas indicações são semelhantes às do MTA, e, por apresentar essa similaridade, foi lançado comercialmente como uma opção a seu emprego. Quanto a sua composição, o seu pó é constituído fundamentalmente de silicato de tricálcio, silicato dicálcico, carbonato de cálcio, óxido de zircônio e óxido de ferro, de cor branca e hidrofílico. O líquido é composto por cloreto de cálcio e polímero hidrossolúvel (FORMOSA *et al.*, 2012).

Apesar de ser um material promissor, são necessário mais estudos avaliando as suas características e, quanto a sua biocompatibilidade, há poucos relatos em tecido subcutâneo de ratos sugerindo essa propriedade.

Em função do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a resposta tecidual e compreender quais mediadores químicos podem estar envolvidos no processo de reparo apresentadas pelo MTA branco (Angelus, Londrina, PR, Brasil) e pelo Biodentine quando implantados em tecido subcutâneo dos ratos. Além disso, na tentativa de melhor identificar a formação de áreas com presença de mineralização, buscou-se associar possíveis RNAm de proteínas que possam estar envolvidas nesse processo, tais como as BMPs (Proteínas Morfogenéticas Ósseas) e a Osteocalcina (OC).

Materiais e métodos

Animais

Após parecer favorável ao Comitê de Ética 30 ratos albinos, Wistar, machos de 3-4 meses de idade, com peso 180 - 250 g foram incluído no estudo, os mesmos foram divididos em 03 grupos correspondendo aos tempos experimentais 15, 30 ou 60 dias. Os animais foram alojados em salas com temperatura controlada e supridos com água e comida *ad libitum*.

Os cimentos endodônticos avaliados foram o MTA Angelus branco e o Biodentine (Septodont), os quais foram armazenados no interior de tubos de polietileno, previamente esterilizados. Apresentando 1,0 mm (milímetros) de diâmetro interno, 1,6 mm de diâmetro externo e 10,0 mm de comprimento.

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram, inicialmente, pesados, e em seguida anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de Xilazina (24 mg/ kg) e Quetamina (225 mg/ kg). Os locais cirúrgicos na pele dorsal foram tricotomizados, a antisepsia dessa região foi realizada com clorexidina à 0,12%. Os cimentos MTA e BD foram preparados seguindo a recomendação do fabricante e inseridos nos tubos, previamente

esterilizados, com o auxílio de um calcador. Em seguida, quatro seções iguais em equidistância entre si foram identificadas, e realizadas incisões de 2 mm com lâmina de bisturi 15. Com o auxílio de uma tesoura cirúrgica romba, foram criados bolsos, por meio da divisão dos tecidos (Aesculap, Tuttlingen, Alemanha), a fim de alocar os tubos.

Os tubos implantados em cada animal apresentavam a seguinte distribuição: uma incisão sem tubo, utilizada para simular o efeito do trauma cirúrgico (Grupo Sham). Um tubo vazio (grupo controle), um tubo com MTA e um tubo com BD. Inseridos os tubos de polietileno, ou mesmo na ausência do mesmo, as bordas de todas as incisões foram suturadas com fio de seda 4.0. Os animais foram supervisionados até recuperação da anestesia, além de observação diária, a fim de evitar ocorrências que pudessem comprometer o experimento.

Após os períodos determinados acima, os animais foram novamente anestesiados e tricotomizados na região dorsal. A seguir, eutanasiado por decaptação cervical. Inicialmente, os tubos implantados foram localizados por palpação, posteriormente essa área foi dissecada, de modo que tecido normal circundante fosse incluído. Os tecidos contendo os tubos foram divididos, parte para coloração por hematoxilina e eosina (H&E), das quais foram os tecidos de 15, 30 e 60 dias, outra parte para coloração por Von Kossa, ambos foram fixados em solução de formol a 10 % por 24h, em cassetes unitários com a identificação do animal, grupo e período experimental. Outra parte das amostras foi direcionada tanto para análise de dosagem de citocinas, quanto para quantificação por PCR, armazenadas em freezer -80°C após a remoção até o processamento, correspondente ao período de 30 e 60 dias.

Análise histopatológica

Após o período de fixação por 48 h, todo o tecido em excesso das amostras foram removidos. Os tubos foram removidos com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15 e as amostras foram levadas para o processamento histotécnico. Os espécimes foram processados e cortados em série para secções com 5 µm, em sequência serão corados pela técnica hematoxilina-eosina (HE).

Os cortes semi-seriados dos implantes corados foram utilizados para a descrição morfológica da reação provocada pelos materiais no tecido subcutâneo. Os eventos histopatológicos avaliados foram analisados através de medianas obtidas a partir dos escores 0: infiltrado inflamatório ausente; 1: polimorfonuclear e 2: células mononucleares. Intensidade de inflamação foram analisados através de medianas obtidas a partir dos escores 0: nenhuma ou poucas células inflamatórias, sem reação inflamatória; 1: <25 células, com discreta reação inflamatória; 2: 25 a 125 células, com moderada reação inflamatória; 3: ≥125

células, com severa reação inflamatória. O tecido de granulação e a fibrose foram classificados como 0: ausente; 1: delgado e 2: espesso. A calcificação distrófica foi quantificada por percentual.

Identificação de estruturas de calcificação por meio da técnica de Von Kossa

Cortes dos implantes com a cápsula de tecido conjuntivo foram submetidos à técnica de Von Kossa, a fim de detectar uma possível precipitação de fosfato de cálcio no tecido adjacente ao material (BEHMER et al., 1976; JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 1983). Após desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos na solução de nitrato de prata à 5 %, por 1 hora, sob a ação de uma lâmpada incandescente (100 Watts). As lâminas foram lavadas em água deionizada por 3 min e, em seguida, imersas em solução de hipossulfito de sódio à 5 % por 5 min.

Quantificação das citocinas IL-1 β e IL-8 nos tecidos

Amostras de tecido subcutâneo correspondente ao período de 30 e 60 dias do experimento foram armazenadas em freezer -80°C. O material foi homogeneizadas em solução RIPA (Santaz Cruz Biotechnology, EUA) e adicionado ao inibidor de protease (Sigma). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10.000 RPM/ 10 min / 4°C), e o sobrenadante utilizado para avaliar a expressão dos mediadores pró-inflamatórios IL-1 β e IL-8. A detecção das citocinas IL-1 β e IL-8 foi realizada por ELISA, usando o Kit DuoSet (R&D Systems). Brevemente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 14 horas a 4°C com 100 μ L por poço de anticorpo de captura para IL-1 β e IL-8. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e bloqueadas com 100 μ L por poço com reagente diluente (R&D Systems). Após bloqueio das placas por 1 hora, 50 μ L das amostras e da curva padrão foram adicionadas em duplicata a cada poço em várias diluições e incubadas por 2 horas à 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com 300 μ l de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1 β e IL-8. Após o período de incubação à 4°C por 2 horas, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos com 100 μ L de estreptavidina diluída 1:200. As placas foram lavadas novamente por três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e 100 μ L da solução substrato para revelação (Kit DuoSet, R&D Systems) foi adicionado. As placas foram incubadas durante 20 minutos, no escuro à temperatura ambiente. A reação enzimática foi

parada com a solução de parada (H₂SO₄), e a absorvância medida à 450nm. Expressou-se os resultados obtidos em pg/mL.

Quantificação por PCR da expressão dos genes para as proteínas BMP-2, BMP- 4 e OC

O RNA total foi extraído de tecidos subcutâneo usando o reagente TRIzol (Invitrogen, São Paulo). A concentração de RNA foi estimada pela leitura da absorvância a 260 nm e foi verificada a pureza a 280 nm num espectrofotômetro (Amersham, Biosciences, Cambridge, Inglaterra). Para cada amostra, as concentrações de RNA utilizadas para sintetizar o cDNA foram ajustados para 1.000 ng/μL. Antes da reação de transcrição reversa, as amostras de RNA foram incubadas durante 5 min a 70°C e depois resfriadas em gelo. A transcrição reversa foi realizada em um volume total de 20 μL composto por 10 μL de amostra de RNA, 4 μL de tampão da enzima transcriptase reversa (Invitrogen, São Paulo), 8 unidades de RNAsin (Invitrogen, São Paulo), 150 unidades da enzima transcriptase reversa Superscript III (Invitrogen, São Paulo), 0,036U de primers randômicos (Invitrogen, São Paulo), 10 mM DTT e 0,5 mM de dNTP (Invitrogen, São Paulo). A mistura foi incubada a 42° C durante 1 h, em seguida a 80°C por 5 min e finalmente armazenada a -20°C.

A reação PCR em tempo real (qRT-PCR) foi realizada em triplicata para determinar os níveis do RNAm para *OSTEOCALCINA*, *BMP-2* e *BMP-4*. Cada reação continha 10 μL de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido), 7,3 μL de água ultra pura, 1 μL de cDNA e 0,5 μM de cada primer e foi realizado no termociclador StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). Os ciclos de qRT-PCR consistiam em uma desnaturação inicial e a ativação da enzima polimerase durante 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos à 95° C, 30 segundos à 58°C e 30 segundos à 72°C. A extensão final foi de 10 minutos a 72° C. Os primers foram desenhados utilizando a ferramenta PrimerQuest® <https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>. A sequência dos primers utilizados neste estudo são mostrados na Tabela 1. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizada como controle endógeno para a normalização da expressão de RNAm. A especificidade de cada par de primers foi confirmada pela análise da curva de melting dos produtos da qRT-PCR. As quantificações relativas do RNAm foram realizadas utilizando os valores de Ct (Cycle threshold). O método delta-delta-Ct foi usado para transformar os valores de Ct em níveis de expressão relativa normalizados (Livak e Schmittgen, 2001).

Tabela 1. Pares de iniciadores utilizados em números de acesso de PCR e NCBI em tempo real.

Gene alvo	Sequência do primer (5' → 3')	Sense (S), anti-sense (As)	Nº acesso GeneBank
<i>GAPDH</i>	GGACCAGGTTGTCTCCTGTG CATTGAGAGCAATGCCAGCC	S As	NM_017008.4
<i>OSTEOCALCIN</i>	GAATAGACTCCGGCGCTACC GGACCCTCGGCAGTTCATAG	S As	M25490.1
<i>BMP-2</i>	CCCCCTATATGCTCGACCTG TCCTCGATGGCTTCTTCGTG	S As	NM_017178.1
<i>BMP-4</i>	GACCCTGGTCAACTCCGTTA ACCTTGTCGTA CTGTC CAGA	S As	NM_012827.2

Análise estatística

Para os resultados de quantificação de dosagem de citocinas, foi utilizado ANOVA e teste t de student. Nas comparações de reações teciduais, foi utilizado teste de Kruskal-Wallis/Dunn ($P < 0,05$). Para as porcentagens de presença de calcificação distrófica dentro do mesmo grupo, utilizou-se teste qui-quadrado ou exato de Fisher.

Os níveis de mRNA para *OSTEOCALCIN*, *BMP-2* e *BMP-4* foram analisados usando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Os dados foram expressos como média \pm SEM. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Resultados

Análise descritiva histopatológica

Ao longo do protocolo experimental, o grupo Sham mostrou discreta variação no perfil e na intensidade do infiltrado inflamatório, apresentando score mediano 0 nos dias 15, 30 e 60 ($p=0,409$) (Figura 1, Tabela 2). O tecido de granulação ($p=0,409$) e a fibrose ($p=0,449$) não mostraram variação significativa, com score mediano 0 ao longo do curso temporal ($P < 0,001$).

O grupo controle mostrou também discreto infiltrado inflamatório ao longo do curso temporal (Figura 1, Tabela 2). No dia 15 a mediana para o perfil e intensidade inflamatória foi 1, que diminuiu nos dias 30 e 60 para 0, porém não houve variação

significante do perfil ($p=0,143$) e intensidade ($p=0,067$) do infiltrado inflamatório nesses períodos. Referente ao tecido de granulação, os resultados foram significativamente superior nos dias 15 e 30 (mediana = 1), quando comparados ao sham ($p<0,001$), com redução significativa para o escore mediano 0 no dia 60 ($p=0,003$). Quanto à fibrose ao redor do tubo de enxertia do material, observou-se discreto aumento nos escores para o dia 30, quando comparado ao sham ($p<0,001$) porém, não houve diferença estatística ao longo do curso temporal, quando comparado dentro do mesmo período experimental ($p=0,165$).

O grupo BD mostrou comportamento similar ao grupo Sham, sem variação significativa ao longo do curso temporal e apresentando mediana 0 tanto para perfil ($p=0,822$) quanto para a intensidade do infiltrado inflamatório nos dias 15, 30 e 60 ($p=0,456$). Referente ao tecido de granulação, os resultados foram significativamente superior nos dias 15 e 30 (mediana = 1) ($p=0,001$, quando comparado ao grupo sham), correspondente à delgado tecido de granulação com redução significativa para o escore mediano 0 no dia 60 ($p=0,001$, quando comparado ao tempo 15 dias) Esse grupo apresentou discreto aumento nos escores de fibrose ao redor do tubo de enxertia do material no dia 30, quando comparado ao grupo sham ($p=0,001$), porém, não houve diferença significativa intra- grupo em relação aos tempos experimentais ($p=0,470$)(Figura 1.Tabela 2).

O grupo MTA mostrou aumento significativo de um perfil inflamatório crônico (escore mediano = 2) no dia 30 ($p=0,007$), quando comparado ao grupo sham, com redução significativa deste para o dia 60 em que todos os animais já não apresentaram infiltrado inflamatório ($p=0,044$), quando comparado ao dia 15. Apesar disso, a intensidade deste infiltrado não mostrou variação significativa ao longo do curso temporal ($p=0,086$) quando comparado intra- grupo), porém houve resultado significativo no dia 30 quando comparado ao grupo sham ($p=0,005$). Quanto ao tecido de granulação, encontrou-se a mediana de escore 1 ao longo do curso temporal sem variação significativa ($p=0,470$) quando comparado intra-grupo). Porém apresentou variação significativa nos dias 15 e 30 quando comparado ao sham ($0,001$). Em relação à fibrose ao redor do tubo, a mediana foi 1 sem variação estatística ao longo do curso temporal ($p=0,394$) (Fig. 1.Tabela 2).

Nenhumas das amostras dos grupos ao longo do curso temporal apresentaram necrose ou material endocitado. Os grupos BD e MTA apresentaram maior frequência de calcificação distrófica nas proximidades do material enxertado nos dias 15 ($p<0,001$), 30 ($p<0,001$) e 60 ($p=0,002$) comparado aos grupos Sham ou controle (Fig.1. Tabela 3). Os resultados encontrados na técnica de von Kossa foram categorizados pela ausência ou presença de áreas positivas para a coloração (áreas escuras) (Fig. 2).

Tabela 2. Medianas dos escores do perfil inflamatório, intensidade da inflamação, tecido de granulação e fibrose dos grupos nos três períodos experimentais. *Comparação entre os grupos em cada período e †comparação de cada material em relação ao tempo.

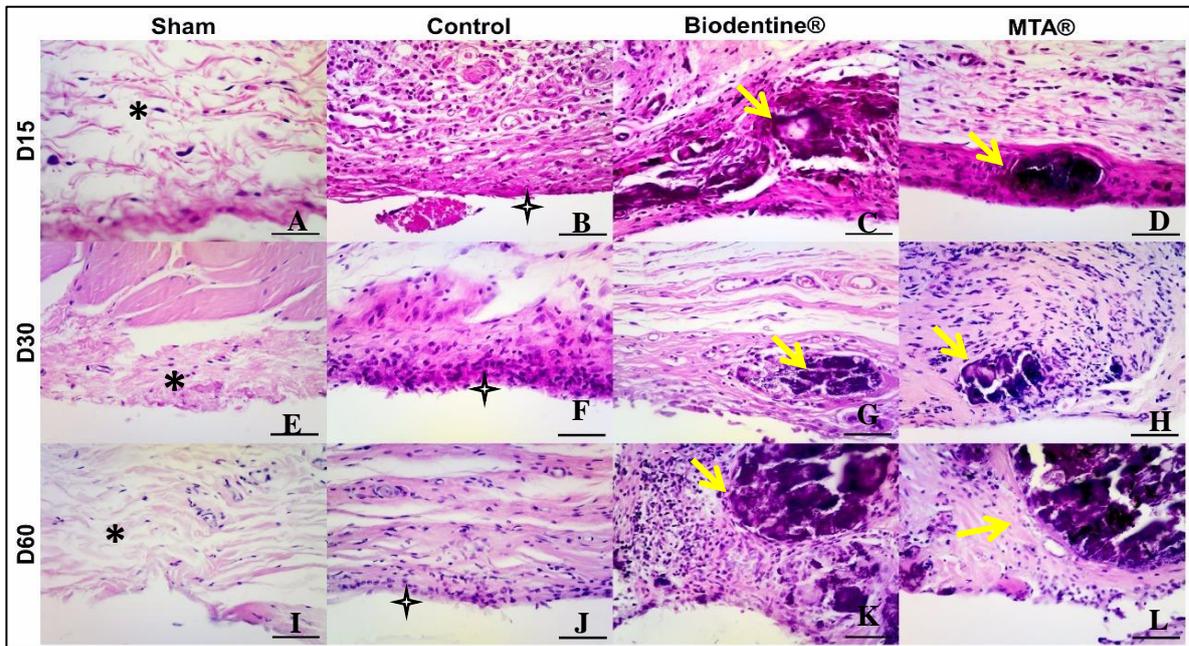
	Grupos				p-Valor
	SHAM	CONT	BD	MTA	
Perfil inflamatório					
Dia 15	0 (0-1)	1 (0-2)*	0 (0-2)	0 (0-2)	0,046
Dia 30	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-2)	2 (0-2)*†	0,007
Dia 60	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-0)	0,304
p-Valor	0,409	0,143	0,822	0,044	
Escore de inflamação					
Dia 15	0 (0-2)	1 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-2)	0,086
Dia 30	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-2)	1 (0-3)*	0,005
Dia 60	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0,304
p-Valor	0,409	0,067	0,456	0,086	
Tecido de granulação					
Dia 15	0 (0-1)	1 (1-2)*	1 (0-2)*	1 (1-2)*	<0,001
Dia 30	0 (0-0)	1 (1-2)*	1 (1-2)*	1 (0-2)*	<0,001
Dia 60	0 (0-0)	0 (0-1)†	0 (0-1)†	1 (0-2)	0,107
p-Valor	0,409	0,003	0,001	0,470	
Fibrose					
Dia 15	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	1 (0-2)*	<0,001
Dia 30	0 (0-0)	1 (0-2)*	1 (1-2)*	1 (0-2)*	<0,001
Dia 60	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-2)	1 (0-2)	0,179
p-Valor	0,449	0,165	0,470	0,394	

Fonte: elaborado pelo autor

Tabela 3. Porcentagem da presença de calcificação distrófica nos três períodos experimentais; onde * é a comparação entre os grupos em cada período e †comparação de cada material em relação ao tempo.

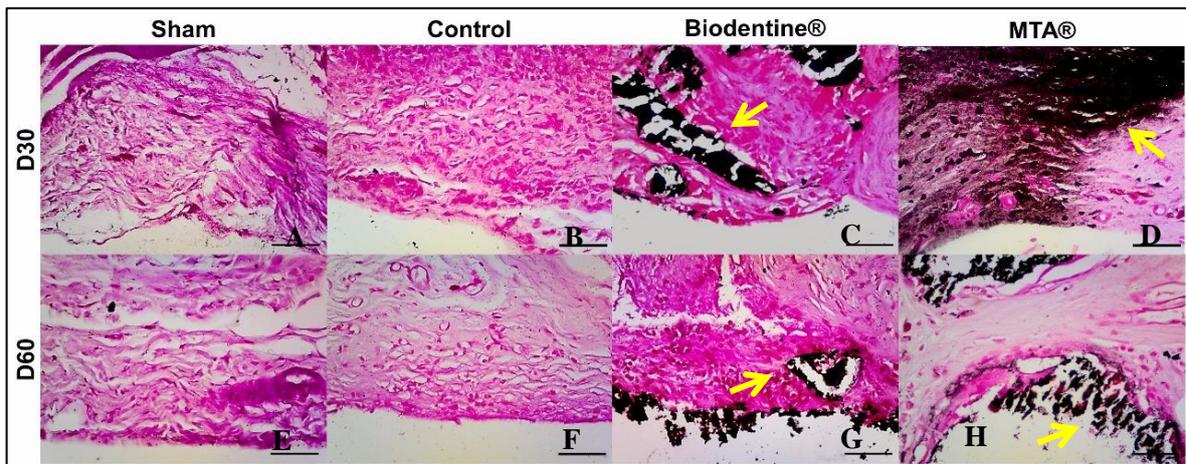
Calcificação distrófica					
Dia 15	0%	0%	87%*	38%*	<0,001
Dia 30	0%	0%	58%*	54%*	<0,001
Dia 60	0%	0%	62%*	50%*	0,002
p-Valor	1,000	1,000	0,249	0,725	

Fig. 1. Cortes histológicos de tecido subcutâneo nos períodos de 15, 30 e 60 dias (x40). * Infiltrado inflamatório. ✦ Interface do tecido conjuntivo e espaço do tubo de polietileno. Setas amarelas evidenciam estruturas de calcificação distrófica nos grupos BD e MTA.



Fonte: elaborado pelo autor

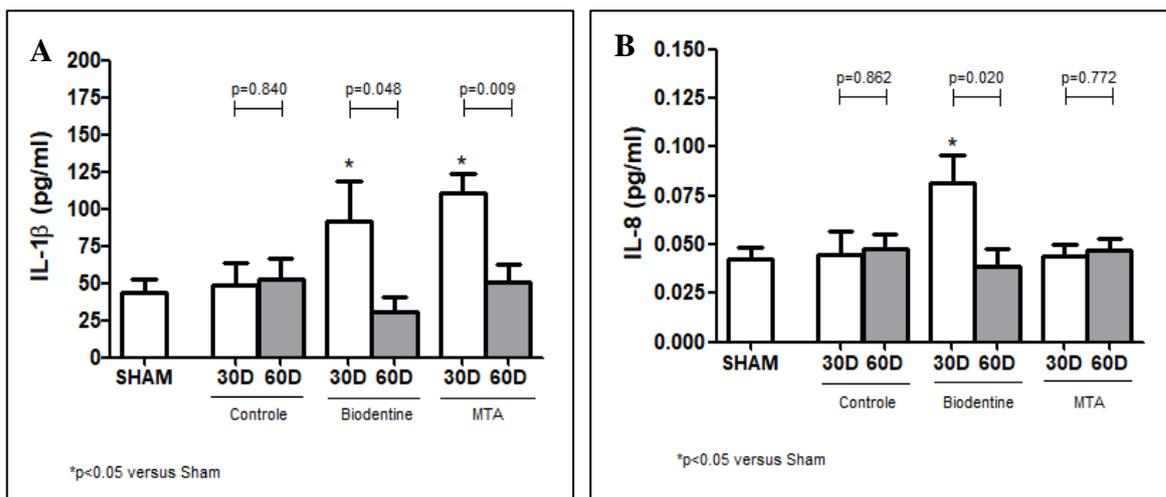
Figura 2. Cortes histológicos de tecido subcutâneo nos períodos de 30 e 60 dias pela técnica de coloração Von Kossa.(40x). Setas amarelas evidenciam estruturas de calcificação nos grupos que apresentavam os materiais de estudo.



Fonte: elaborado pelo autor

O ensaio ELISA revelou que a média de liberação de IL-1 β (pg / mL) foi significativamente maior em relação ao grupo Sham, no dia 30, tanto para o grupo BD quanto para grupo o MTA (Fig.3A). Aos 60 dias, a expressão de IL-1 β diminuiu significativamente dentro de cada grupo. Na análise para a média de liberação de IL-8 (pg / mL) apenas o grupo BD apresentou resultado significativo, tanto em relação ao Sham, quanto dentro do próprio grupo ao longo do tempo, quando, aos 60 dias, houve expressão reduzida (Fig. 4B).

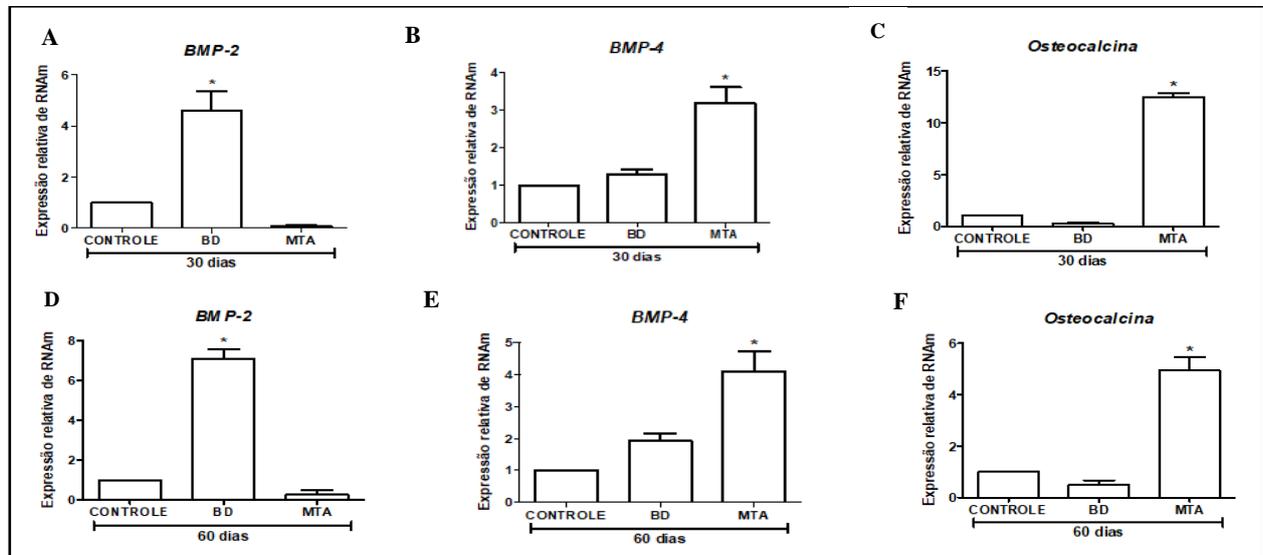
Figura.3. Níveis de citocinas IL-1 β e IL-8 nos grupos Sham, controle, Biodentine e MTA, nos períodos de 30 e 60 dias. A) Média de liberação para IL-1 β . B) Média de liberação para IL-8. Análise estática por ANOVA e teste t de student.



Fonte: elaborado pelo autor

Efeito de MTA e BD sobre a expressão relativa de genes osteogênicos

Figura 4. Níveis da expressão relativa de RNAm para BMP-2, BMP-4 e OC nos períodos de 30 e 60 dias, nos grupos controle, BD e MTA. Os dados foram expressos como média \pm SEM. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).



Fonte: elaborado pelo autor

De acordo com os resultados da qPCR, a expressão de BMP-2 no grupo BD aumentou significativamente comparado com o controle ao longo do tempo (Fig.4A e 4D) ($P < 0,05$). A expressão de RNAm para BMP-4 e OC no grupo MTA aumentou significativamente quando comparado ao controle (Fig. 4B e 4E; Fig 4C e 4F) ($P < 0,05$), no grupo BD, entretanto, foi similar ao controle.

Discussão

Com o presente estudo, podemos constatar que o perfil e a intensidade inflamatória apresentada pelos materiais avaliados, Biodentine e MTA Angelus, quando comparados aos grupos sham e controle, bem como ao longo do tempo, mostraram características que se encontram dentro da normalidade para um material biocompatível. A presença de calcificação distrófica, já identificada aos 15 dias nos grupos BD e MTA, juntamente com as estruturas impregnadas por prata destacadas pela coloração Von kossa, evidenciam o início de um processo de mineralização. Além disso, houve aumento das citocinas pró- inflamatórias IL-1 β para BD e MTA e IL-8 apenas para BD aos 30 dias, com valores reduzidos aos 60 dias, sugerindo haver reparo tecidual. Na tentativa de compreender os mecanismos com que esses materiais induzem um processo de mineralização, foi quantificada a expressão de RNAm para proteínas envolvidas no processo de formação óssea

como BMP-2, BMP-4 e osteocalcina. BD apresentou aumento significativo na expressão do RNAm para BMP-2 e no grupo MTA houve um aumento significativo na expressão do RNAm para BMP-4 e OC.

A implantação em tecido subcutâneo de ratos com tubos de polietileno foi utilizada para avaliar a biocompatibilidade dos materiais, visto que testes envolvendo implantação de materiais nos possibilita analisar as interações que ocorrem entre o tecido hospedeiro e o material estudado (TORNECK, 1966; DE- DEUS *et al.*, 2005). O uso dos tubos de polietileno é uma técnica bastante difundida, pois simula as condições do canal radicular (FRIEND; BROWNE, 1968; FERRAZ *et al.*, 1990), em que as porções terminais do tubo contendo o material entram em contato com o tecido conjuntivo, representando a relação forame apical/tecidos periapicais. Tornando-se assim, um recurso metodológico comprovadamente satisfatório (MOTTA, 2003; KOWALSKI, 2004; YALTIRIK, *et al.*, 2004; MORAIS *et al.*, 2006; SHAHI *et al.*, 2006).

Em relação ao tempo de avaliação, as análises foram realizadas aos 15, 30 e 60 dias, à semelhança de outros trabalhos em tecido subcutâneo (MORETTON *et al.*, 2000; SUMER *et al.*, 2006; MAGRO-KATO, 2007). Em 2000, MORETTON *et al.* afirmaram que o período de 60 dias é suficiente para avaliar respostas teciduais a longo prazo, apesar de na literatura não existir um consenso quanto aos períodos de avaliação.

Em estudos que envolvem tecido conjuntivo, a biocompatibilidade é demonstrada pela formação de cápsula fibrosa ao redor dos tubos implantados, sugerindo que o mesmo é bem tolerado pelos tecidos (WUCHERPFENNING; GREEN, 1999; YALTIRIK *et al.*, 2004; CINTRA *et al.*, 2006; SUMER *et al.*, 2006; COUTINHO-FILHO *et al.*, 2008). No presente estudo, houve a formação de cápsula fibrosa em todos os espécimes, e em todos os períodos experimentais, confirmando o processo de reparo.

À análise histopatológica, quanto ao perfil inflamatório e a sua intensidade aos 15, 30 e 60 dias, apenas o grupo MTA obteve diferenças estatisticamente significativas, isto porque, aos 30 dias houve intenso infiltrado inflamatório, e, dentro do próprio grupo, foi o único período de evidenciação de maior quantidade de polimorfonucleares, caracterizando uma inflamação crônica, apesar de cessar aos 60 dias (escore 0). De acordo com o padrão ISO 7405 (2007), uma reação inflamatória moderada 15 dias após a colocação do implante, com uma tendência para diminuir após 12 semanas, é considerado aceitável. Assim, similar aos nossos resultados, estudos anteriores trazem que mais importante do que o potencial irritante dos materiais é a duração deste efeito nos tecidos aos quais são aplicados (HAUMAN & LOVE, 2003; SHAHI *et al.*, 2006).

Quando analisados os três grupos em que o tubo estava presente, todos os grupos no período de 15 e 30 dias apresentaram perfil de tecido de granulação semelhante. Esse fato pode nos levar a sugerir que a presença do tubo induziu a formação do tecido de granulação. Viola *et al.*, 2012, consideram o polietileno dos tubos inertes, assim a reação inflamatória encontrada no seu grupo controle (tubos de polietileno vazios) pode ser provocada por traumatismo devido a procedimentos experimentais, desta forma, a reação inflamatória induzida por Biodentine e MTA foi estimulada pelos componentes liberados por esses materiais, corroborando com nossos resultados.

O discreto aumento dos escores de fibrose nos grupos controle, Biodentine e MTA quando comparados ao grupo Sham no dia 30, assemelham-se a estudos anteriores (KAPLAN, 2003 e MOTTA, 2003) em que a presença do aumento na colagenização indicou a evolução do processo de reparação.

A reação dos íons de cálcio a partir de Ca(OH)_2 e a dissociação iônica do dióxido de carbono dos tecidos resultam na formação de cristais de calcita que são birrefringentes para luz polarizada, levando à formação de áreas calcificadas, que foram evidenciadas em nosso estudo. Além disso, o alto pH fornecido pela hidroxila favorece o processo de reparo do tecido, as propriedades antimicrobianas (TAGGER *et al.*, 1988; DESAI *et al.*, 2009) e induz a formação de tecido mineralizado (HOLLAND *et al.*, 2002; DUARTE *et al.*, 2003 e ELDENIZ *et al.*, 2007).

Diante disso, podemos relacionar a presença de calcificação distrófica e de áreas von kossa positiva a esse potencial de biomineralização, visto que as granulações encontradas foram também relatadas em estudos anteriores como sendo oriundas da reação do cálcio (presente nos cimentos) com o gás carbônico do tecido, tornando-se fatores sugestivos de início de formação de tecido mineralizado (HOLLAND, em 1971; SEUX *et al.*, 1991; YALTIRIK *et al.*, 2004). Apesar de que alguns estudos questionem esse método de coloração (MELOAN *et al.*, 1985; BONEWALD *et al.*, 2003), por sugerir que as manchas coradas podem não se tratar de fontes de cálcio verdadeiras, a expressão de RNAm de proteínas envolvidas no processo de formação óssea, como a osteocalcina, quantificada em nosso estudo, nos levam a sugerir que realmente há uma formação de tecido mineralizado sendo iniciado, visto que essa proteína apresenta forte ligação ao cálcio e está envolvida no início do processo de mineralização (OWEN *et al.*, 1990).

Os biomateriais podem provocar uma cascata inflamatória que compreende o recrutamento e a adesão de neutrófilos e macrófagos, reação ao corpo estranho e encapsulamento fibroso (WILLIAMS, 2008). Vários fatores podem estar envolvidos na

expressão e nos seus efeitos, o que inclui diversos tipos de células e mediadores inflamatórios (STASHENKO *et al.*, 1987). Inicialmente, durante a resposta inflamatória, TNF- α e IL-1 β apresentam um efeito pró-inflamatório seguido por um efeito regulatório nas fases posteriores da inflamação (ZAKHAROVA, 2005; SILVA *et al.*, 2008). A IL-1 β é uma citocina que medeia a reabsorção óssea. Sua síntese acontece por meio de várias células e macrófagos próximos da reabsorção óssea e dos osteoclastos. Pode estar envolvida numa variedade de atividades celulares, incluindo a proliferação celular, diferenciação e apoptose (HAGLUND *et al.*, 2003). Há evidências de que o MTA estimula a produção de IL-1 β por osteoblastos (KOH *et al.*, 1997). No estudo de Gomes-Filho *et al.* 2009, ao avaliar a produção de citocinas do Endo-CPM-Sealer, Sealapex e MTA Angelus, constataram que os materiais induziram a liberação de IL-1 β , mas apenas o MTA do Angelus foi estatisticamente significativo. Resultado esse semelhante ao nosso estudo, em que o grupo MTA, assim como o BD, apresentaram significativa expressão de IL-1 β aos 30 dias, provavelmente por apresentarem composições químicas similares.

Nas primeiras 24 h após um defeito ósseo há uma elevada expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias, são elas TNF- α , IL-1 β e IL-6, que exercem um papel indispensável na manutenção do estágio inicial da inflamação, pois recrutam células, estimulam a angiogênese e a cicatrização óssea mediada por biomateriais (KOLAR *et al.*, 2011; TSIRIDIS *et al.*, 2007). Desse modo, assim como uma inflamação equilibrada pode ser crítica para um reparo ósseo eficaz, uma resposta inflamatória grave ou prolongada pode ser prejudicial para o processo de remodelação (MOUNTZIARIS & MIKOS, 2008; CLAES *et al.*, 2012). Diante disso, em nossos estudos, os níveis significantes de IL-1 β aos 30 dias para ambos materiais e sua redução aos 60 dias implicam no processo de reparo para ambos materiais.

Outra citocina pró- inflamatória importante investigada nesse estudo foi a IL-8. Essa citocina é conhecida por ser um estimulador potencial de diferenciação de osteoclastos e destruição óssea em doença óssea metastática (BENDRE *et al.*, 2003). A produção de IL-8 em osteoclastos por estimulação RANKL aumenta a osteoclastogênese induzida por RANKL de maneira autocrina dependente, enquanto a osteoclastogênese é inibida bloqueando anticorpos contra a IL-8 ou tratando com inibidores do receptor de IL-8 *in vitro* (KOPESKY *et al.*, 2014).

No estudo de Mitchell *et al.*, 1999, a IL-6 e a IL-8 foram detectadas, sugerindo turnover osseo promovido pelo MTA. A IL-6 é expressada por osteoblastos quando estimulada por fatores de crescimento e estimula a diferenciação e recrutamento de

osteoclastos, já a IL-8 estimula o recrutamento de precursores de osteoclastos e estimula a angiogênese.

Dados experimentais têm sugerido que CXCL8 (IL-8) e seus receptores contribuem para a eliminação de agentes patogênicos, mas também podem contribuir significativamente para processos associados a doenças, incluindo lesão tecidual, fibrose, angiogênese e tumorigênese (RUSSO *et al.*, 2014). Lin *et al.*, 2017 mostraram que a IL-8 aumentou a eficiência de ligação de BMP-2 e seus receptores a partir de um nível celular e, conseqüentemente, melhorou a osteoindutividade de BMP-2. O que pode sugerir a ligação de BD ao seu potencial osteoindutor, pois na quantificação de citocinas, em nosso estudo, esse material expressou significativamente a IL-8 aos 30 dias, bem como expressou o RNAm de BMP-2 no mesmo período.

Em um estudo em cultura de células, avaliando o nível de RNAm de genes osteogênicos (fosfatase alcalina, osteocalcina e sialoproteína óssea) nos materiais MTA, BD e Bioagregate, constatou-se que houve aumento desses genes significativamente nos grupos MTA e Bioagregate em comparação com os controles. Não houve, porém, diferença estatisticamente significativa em relação aos controles para o grupo BD (LEE *et al.*, 2014). Semelhante a esse achado, em nosso estudo, percebeu-se o aumento considerável no grupo MTA para OC, e o grupo BD não apresentou resultado significativo quanto a esse gene.

Embora muitos estudos tenham revelado que todas as citocinas têm um papel importante na diferenciação odontogênica, a BMP-2 possui habilidade de indução dentinária específica (IOHARA *et al.*, 2004; CASAGRANDE *et al.*, 2010). O que nos leva a crer que as diferenças apresentadas em nossos resultados para os RNAm de BMP-2 e BMP-4 expressos com significância entre os dois materiais pode ser em relação a sua composição química.

O BD apresenta em sua composição silicato tricálcico, que tem potencial de promover um processo de mineralização e estimular a proliferação celular e diferenciação (ZANINI *et al.*, 2012; LAURENT *et al.*, 2012; TRAN *et al.*, 2012). Em estudo anterior, foi detectada a formação de osteodentina e de TGF β – 1, quando aplicado BD em células da polpa, o que favoreceu uma mineralização na área. Por pertencer a família de TGF β – 1, podemos inferir a relação dos RNAm de BMP – 2 e BMP-4 expressos em nosso estudo tanto por BD quanto por MTA.

Conclusão

Biodentine e MTA, portanto, são materiais biocompatíveis. A calcificação distrófica, juntamente com a coloração por técnica de von Kossa, apresentaram resultados que indicam início de processo de mineralização, tornando-se mais concreta principalmente pela expressão de RNAm de importantes genes de proteínas atuantes no processo de formação óssea (OC, BMP- 2 e BMP- 4). Podemos sugerir que os materiais que formam os compostos estão intimamente relacionados com as citocinas pro-inflamatórias participantes no período de reparo, bem como os mecanismos celulares que elas podem desencadear na expressão de genes envolvidos na formação de tecido mineralizado.

Referências

- BENDRE MS, MONTAGUE DC, PEERY T, AKEL NS, GADDY D, SUVA LJ. Interleukin-8 stimulation of osteoclastogenesis and bone resorption is a mechanism for the increased osteolysis of metastatic bone disease. **Bone** 2003;33:28-37.
- BONEWALD LF, HARRIS, SE, ROSSER J, DALLAS MR, DALLAS SL, CAMACHO NP, BOYAN B, BOSKEY A. Von Kossa Staining Alone Is Not Sufficient to Confirm that Mineralization In Vitro Represents Bone Formation. **Calcif Tissue Int** (2003) 72:537–547.
- CASAGRANDE L, DEMARCO FF, ZHANG Z, *et al.* Dentin-derived bmp-2 and odontoblast differentiation. **J Dent Res** 2010;89:603–8.
- CLAES, L., RECKNAGEL, S., ANDIGNATIUS, A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. **Nature Reviews Rheumatology** 8, 133, 2012.
- CHENARD KE, TEVEN CM, HE TC, REID RR. Bone morphogenetic proteins in craniofacial surgery: current techniques, clinical experiences, and the future of personalized stem cell therapy. **Journal of biomedicine & biotechnology**. 2012;2012:601549.
- COUTINHO- FILHO T, DE- DEUS G, KLEIN L, MANERA G, PEIXOTO C, GURGEL FILHO ED. Radiopacity and histological assessment of Portland cement plus bismuth oxide. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2008; 106 (6): e69- 77.
- DAMAS BA, WHEATER MA, BRINGAS JS, HOEN MM. Cytotoxicity comparison of mineral trioxide aggregates and EndoSequence bioceramic root repair materials. **J Endod**. 37:372–5(2011).
- DE-DEUS G, XIMENES R, GURGEL-FILHO ED, *et al.* Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV304 endothelial cells. **Int Endod J** 2005;38:604–9.
- DESAI S, CHANDLER N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. **J Endod**. 2009;35(4):475-80. doi:10.1016/j.joen.2008.11.026
- DUARTE MA, DEMARCHI ACO, YAMASHITA JC, KUGA MC, FRAGA SC. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2003;95(3):345-7. doi:10.1067/moe.2003.12

ELDENIZ AU, ERDEMIR A, KURTOGLU F, ESENER T. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**2007;103(3):e86-91. doi:10.1016/j.tripleo.2006.10.018

FERRAZ, S.L. et al. Estudo da histocompatibilidade de cimento endodôntico no tecido conjuntivo subcutâneo utilizando três metodologias. **Rev Odontol USP**, v.4, n.3, p.241-6, jul./set. 1990.

HAGLUND R, HE J, JARVIS J, et al. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. **Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2003;95: 739–45.

HESS D, SOLOMON E, SPEARS R, HE J. Retreatability of a bioceramic root canal sealing material. **J Endod.** Nov;37(11):1547-9 (2011).

HOLLAND R, SOUZA V, NERY MJ, BERNABÉ F, FILHO JA, JUNIOR ED et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after implantation of calcium hydroxide-containing sealers. **J Endod.** 2002; 28(3):173-6. doi:10.1097/00004770-200203000-00007

IOHARA K, NAKASHIMA M, ITO M, *et al.* Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. **J Dent Res** 2004; 83:590–5.

KAPLAN, A.E. et al. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. **Int Endod J**, v.36, p.527-532, Aug. 2003.

KOH ET, TORABINEJAD M, PITT FORD TR, et al. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. **J Biomed Mater Res** 1997;37: 432–9.

KOPESKY P, TIEDEMANN K, ALKEKHIA D, ZECHNER C, MILLARD B, SCHOEBERL B, KOMAROVA SV. Autocrine signaling is a key regulatory element during osteoclastogenesis. **Biol Open** 2014;3:767-776.

LIN D, CHAI Y, MA Y, BING D, YUAN Y, LIU C. Rapid initiation of guided bone regeneration driven by spatiotemporal delivery of IL-8 and BMP-2 from hierarchical MBG-based scaffold, **Biomaterials** (2017), doi: 10.1016/j. **Biomaterials.**2017.11.011.

MELOAN SN, PUCHTLER H (1985) Chemical mechanisms of staining methods: von Kossa's technique. What von Kossa really wrote and a modified reaction for selective demonstration of inorganic phosphate. **J Histotechnol** 8:11–13

MITCHELL PJ, PITT FORD TR, TORABINEJAD M, MCDONALD F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. **Biomaterials** 1999;20:167-73.

MOUNTZIARIS, P.M., ANDMIKOS, A.G. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. **Tissue Eng Pt B-Rev** 14, 179, 2008.

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

OWEN TA, ARONOW M, SHALHOUB V, *et al.* Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. **J Cell Physiol** 1990;143:420-30.

SCHUTTE RJ, XIE L, KLITZMAN B, *et al.* In vivo cytokine-associated responses to biomaterials. **Biomaterials** 2009;30:160-8

SEUX, D. *et al.* Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide containing cement. **Arch Oral Biol**, v.36, n.2, p.117-28, Jan./June 1991.

SHAHI S, RAHIMI S, LOTFI M, *et al.* A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. **J Endod** 2006;32:776-80.

STASHENKO P, DEWHIRST FE, ROONEY ML, *et al.* Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. **J Bone Miner Res** 1987;2:559-65.

TAGGER M, TAGGER E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH 26 in monkeys. **Endod Dent Traumatol** 1989;5:139-46.

THOMSON TS, BERRY JE, SOMERMAN MJ, KIRKWOOD KL. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. **J Endod** 2003;29:407-12.

TRAN XV, GORIN C, WILLIG C, BAROUKH B, PELLAT B, DECUP F, OPSAHL VITAL S, CHAUSSAIN C, BOUKPESSI T. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. **J Dent Res** 2012;91:1166-1171 WILLIAMS DF. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**. 2008;29:2941-53.

TSIRIDIS, E, UPADHYAY, N, AND GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules? **Injury** 38, S11, 2007.

ZANINI M, SAUTIER JM, BERDAL A, SIMON S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. **J Endod** 2012; 38:1220-6.

VIOLA NV, GUERREIRO-TANOMARU JM, DA SILVA GF, SASSO-CERRI E, TANOMARU-FILHO M, CERRI PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. 2012; 100(7): 1773-81.

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

ZAKHAROVA M, ZIEGLER HK. Paradoxical anti-inflammatory actions of TNF-alpha: inhibition of IL-12 and IL-23 via TNF receptor 1 in macrophages and dendritic cells. **J Immunol** 2005;175:5024-33.

ZHAO X, HE W, SONG Z, *et al.* Mineral trioxide aggregate promotes odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stemcells. **Mol Biol Rep** 2012;39:215–20.

6. CONCLUSÃO

Biodentine e MTA são materiais biocompatíveis, não induziram necrose, apresentaram reação inflamatória limitada, pois sua intensidade reduziu dentro do limite considerado como tolerável. A calcificação distrófica, juntamente com a coloração por técnica de von Kossa, apresentaram resultados que indicam início de processo de mineralização, essa ideia tornou-se mais concreta principalmente por terem sido expressos RNAm de importantes genes de proteínas atuantes no processo de formação óssea (OC, BMP- 2 e BMP- 4).

Apesar de apresentarem composições semelhantes, o RNAm de BMP- 2, foi significativo apenas no grupo BD, bem como a dosagem de IL- 8. A expressão dos RNAm de OC e BMP-4 foram significativos apenas no grupo MTA. Enquanto que IL-1 β apresentou resultados significantes em ambos os materiais. Isso nos leva a sugerir que os materiais que formam os compostos estão intimamente relacionados com as citocinas pro-inflamatórias que participam no período de reparo, bem como os mecanismos celulares que elas podem desencadear na expressão de genes envolvidos na formação de tecido mineralizado. É fato o potencial de mineralização, porém quais mecanismos estão envolvidos nesse processo ainda se faz necessário mais estudos.

7. REFERÊNCIAS

BEHMER OA, TOLOSA EMC, FREITAS-NETO AGF. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. In: Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas-Neto AGF. Coloração de grânulos intracelulares. Pigmento cálcio – Kossa. São Paulo: EDART. **Editora da Universidade de São Paulo**; 1976. p. 104.43-7. 20.

CAMILLERI J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregates. **International Endodontic Journal**. 2007; 40: 462-70.

CAMILLERI J. “Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate”. **International Endodontic Journal**, vol. 41, no. 5, pp. 408–417, 2008.

CHENARD KE, TEVEN CM, HE TC, REID RR. Bone morphogenetic proteins in craniofacial surgery: current techniques, clinical experiences, and the future of personalized stem cell therapy. **Journal of biomedicine & biotechnology**. 2012;2012:601549.

- CINTRA LTA, RIBEIRO TAAR, GOMES-FILHO JE. Biocompatibility and biomineralization assessment of a new root canal sealer and root-end filling material. **Dental Traumatology**. 2013. 29, 145–50.
- COOMARASWAMY KS, LUMLEY PJ, HOFMANN MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement–based (MTA-like) system. **International Endodontic Journal**. 2007; 33(3): 295-8.
- DUDEJA PG, DUDEJA KK, SRIVASTAVA D, GROVER S. Microorganisms in periradicular tissues: Do they exist? A perennial controversy. **J Oral Maxillofac Pathol**. 2015 Sep-Dec; 19(3): 356–363.
- FONSECA TS, SILVA GF, TANOMARU-FILHO M, SASSO-CERRI E, GUERREIRO-TANOMARU J. M. & CERRI P. S. **International Endodontic Journal**, 49, 145–153, 2016
- FORMOSA LM, MALLIA B, CAMILLERI J. The effect of curing conditions on the physical properties of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. **International Endodontic Journal** .2012; 45(4): 326-36.
- GEURTSEN W. Biocompatibility of root canal filling materials. **Aust Endod J**. 2001;27(1):12-21. doi:10.1111/j.1747-4477.2001.tb00445.x
- GUNESER MB, AKBULUT MB, ELDENIZ AU. Effect of various endodontic irrigants on the push-out bond strength of Biodentine and conventional root perforation repair materials. **International Endodontic Journal**. 2013. 39:380–4.
- HERFORD AS, STOFFELLA E, TANDON R. Reconstruction of mandibular defects using bone morphogenetic protein: can growth factors replace the need for autologous bone grafts? A systematic review of the literature. **Plastic surgery international**. 2011;2011:165824.
- HOLLAND R, SOUZA V, NERY MJ, OTOBONI-FILHO JA, BERNABÉ PFE, DEZAN-JUNIOR E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**. 1999. 25, 161– 6.
- HOLLAND R, DE SOUZA V, NERY MJ, OTOBONI FILHO JA, BERNABÉ PF, DEZAN JÚNIOR E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **J Endod**. 1999;25:161-6.
- HOLLAND, R. et al. Estudo histológico do comportamento do tecido conjuntivo subcutâneo do rato ao implante de alguns materiais obturadores de canal radicular: influência da proporção pó-líquido. **Rev Ass Paul Cir Dent**, v.25, n.3, p.101-10, maio/jun. 1971.
- HINATA G, YOSHIBA K, HAN L, EDANAMI N, YOSHIBA N, OKIJI T. Bioactivity and biomineralization ability of calcium silicate-based pulp-capping materials after subcutaneous implantation. **International Endodontic Journal**. 2017 Jun 26. doi: 10.1111/iej.12802.
- KIM J, SONG YS, MIN KS, KIM SH, KOH JT, LEE BN, CHANG HS, HWANG IN, OH WM, HWANG YC. Evaluation of reparative dentin formation of ProRoot MTA, Biodentine and BioAggregate using micro-CT and immunohistochemistry. **Restor Dent Endod**. 2016 Feb;41(1):29-36. doi: 10.5395/rde.2016.41.1.29. Epub 2016 Jan 4.
- KIM M, CHOE S. BMPs and their clinical potentials. **BMB reports**. 2011;44(10):61934.

KOUBI G, COLON P, FRANQUIN JC. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teetha prospective study. **Clin Oral Investig.** 2012;17:243–9.

KOLAR P, GABER T, PERKA C, DUDA GN, BUTTGEREIT F. Human Early Fracture Hematoma is characterized by Inflammation and Hypoxia. **Clin Orthop Relat R** 469(11) (2011) 3118-3126.

LAURENT P, CAMPS J, DEM'EO M, D'EJOU J, ABOUT I. "Induction of specific cell responses to a Ca₃SiO₅-based posterior restorativematerial. **Dental Materials**,vol.24,no.11,pp.1486– 1494,2008.

LAURENT P, CAMPS J, ABOUT I. "Biodentine™ induces TGF-β1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization." **International Endodontic Journal**.vol.45,no.5, pp.439–448,2012.

LEE YL, LEE BS, LIN AY, LAN WH, LIN CP. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. **Biomaterials.** 2004; 25: 787-93.

LEONARDO MR, LEAL JM. Materiais obturadores de canais radiculares. In: Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 1063-145.

MOTTA, A.G. da et al. Reação do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao MTA e ao hidróxido de cálcio. **Rev Bras Odontol**, v.60, n.4, jul./ago. 2003.

OLIVEIRA EMF, DE SOUZA VITORINO N, DE FREITAS PHL, WASSAL T, NAPIMOGA MH. Use of recombinant proteins for maxillary reconstruction. (English). Uso de proteínas recombinantes na reconstrução de maxilares (Portuguese). 2011;59(3):491-6.

PAWAR AM, KOKATE SR, SHAH RA. Management of a large periapical lesion using Biodentine as retrograde restoration with eighteen months evident follow up. **J Conserv. Dent.** 2013; 16:573-5.

PERARD M, LE CLERC J, MEARY F, P´EREZ F, TRICOT-DOLEUX S PELLEN-MUSSI P. "Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA," **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, vol. 24, no. 6, pp. 1527–1534, 2013.

RAHIMI M, JAINAEN A, PARASHOS P, MESSER HH. Bonding of resin-based sealers to root dentin. **J Endod.** 2009;35(1):121-4. doi:10.1016/j.joen.2008.10.009.

RUSSO RC, GARCIA CC, TEIXEIRA MM, AMARAL FA. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert Rev. Clin. Immunol.** Early online, 1–27 (2014)

SCHEMBRI M, PELOW G, CAMILLERI J. Analyses of heavy metals in mineral trioxide aggregate and Portland cement. **J Endod.** 2010; 36(7): 1210-5.

SCHILDER H. Filing root canals in three dimensions. **J Endod.** 2006;32(4):281-90. doi:10.1016/j.joen.2006.02.007

Septodont. Biodentine™ Package insert [Online]. Available from:http://www.septodont.ca/sites/default/files/Biodentine%20IFU_0.pdf [Accessed October 2014].

SOUZA PP, ARANHA AM, HEBLING J, et al. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. **Dent Mater.** 2006;22:838–44.

TANOMARU-FILHO M, CHAVES FALEIROS FB, SAÇAKI JN, HUNGARO DUARTE MA, GUERREIRO-TANOMARU JM. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. **J Endod.** 2009; 35: 1418-21.

TORABINEJAD M, HONG CU, MCDONALD F, PITT FORD TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **J Endod** 1995;21:349–53.

WEIS MV, PARASHOS P, MESSER HH. Effect of obturation technique on sealer cement thickness and dentinal tubule penetration. **Int Endod J.** 2004;37(10):653-63. doi:10.1111/j.1365-2591.2004.00839.x

ZANINI M, SAUTIER JM, BERDAL A, SIMON S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. **J Endod.**2012; 38:1220-1226.

ZHOU HM, SHEN Y, WANG ZJ, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. **J Endod.**2013; 39:478–83.