

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA DO TECIDO CONJUNTIVO DE RATOS FRENTE AO
MATERIAL DE REPARO À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO NEO MTA PLUS**

Lucas Siqueira Pinheiro

Porto Alegre
2016

LUCAS SIQUEIRA PINHEIRO

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA DO TECIDO CONJUNTIVO DE RATOS FRENTE AO
MATERIAL DE REPARO À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO NEO MTA PLUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica, ênfase em Endodontia.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Fabiana Soares Grecca

Linha de pesquisa: Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Pinheiro, Lucas Siqueira

Resposta inflamatória do tecido conjuntivo de ratos frente ao material de reparo à base de silicato de cálcio NeoMTA Plus / Lucas Siqueira Pinheiro. -- 2016.

50 f.

Orientadora: Fabiana Soares Grecca.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Endodontia. 2. Biocompatibilidade. 3. Material reparador. 4. Silicato de cálcio. I. Grecca, Fabiana Soares, orient. II. Título.

***“ Dos nossos medos
nascem as nossas coragens,
e em nossas dúvidas,
vivem as nossas certezas.
Os sonhos anunciam
outra realidade possível,
e os delírios outra razão.
Nos descaminhos
esperam-nos descobrimentos,
porque é preciso perder-se
para voltar a encontrar-se.”***

Eduardo Galeano

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Silvia Nara Siqueira Pinheiro** e **Cláudio Tavares Pinheiro**, por serem meus maiores exemplos de vida. Por me incentivarem e compreenderem que eu precisaria sair de casa para correr atrás do meu sonho, por me “levantarem” e me lembrarem de quem eu sou nos momentos mais difíceis da minha vida.

Ao meu irmão, **Henrique Siqueira Pinheiro**, por ser um grande amigo e me ajudar sempre que precisei.

À minha avó **Nilda**, que me ajuda e incentiva desde que me mudei para Porto Alegre.

Aos meus avós “emprestados”, **Dada** e **Bebeto**, por me ajudarem em diversos momentos da minha vida, por me esperarem de viagem até madrugada para me cumprimentar pelo meu aniversário.

À **Neusa** e ao **Hélio**, por acenderem uma vela a cada processo de seleção que fiz durante toda minha caminhada, desde o vestibular até a seleção do mestrado.

À minha família de Porto Alegre, **Eliana, Nitta, Hideki, Bianca, Coca, Mirna, Léo, Letícia, Bebeth** e **Luiz**. Obrigado por me acolherem sempre que precisei, por comemorar meus aniversários e me fazerem sentir em casa, amado e querido, diminuindo a saudade da minha família em Pelotas. Sou eternamente grato por tudo.

À minha família de Estância Velha, tio **Lúcio**, tia **Adriana, Júlia, Ana Paula, Bárbara, Felipe, Manuela, Diogo** e **Tuane**. Obrigado por me acolherem quando precisei desde o momento em que realizei a seleção para o mestrado até os momentos em que passei os fins de semana na casa de vocês para visitá-los. Por saber que eu poderia contar com vocês em qualquer dificuldade.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. **Fabiana Soares Grecca**, a quem admiro como pessoa e profissional. Obrigado por ter confiado em mim e me aceito como mestrando. Agradeço, também, por me estender a mão em momentos muito difíceis, compreender minhas dificuldades, acreditar no meu potencial e me incentivar sempre.

Ao Prof. Dr. **Regis Burmeister dos Santos**, por sempre me receber com palavras acolhedoras, pela preocupação e pelo incentivo.

À Prof^a. Dr^a. **Simone Bonato Luisi**, pelo agradável convívio e pelos ensinamentos durante o estágio de pré-clínica.

Ao Prof. Dr. **Francisco Montagner**, pelo exemplo de profissional e ser humano, pela dedicação em tudo que faz.

À Prof^a. Dr^a. **Patrícia Maria Poli Kopper Mora**, pelos conhecimentos transmitidos, pela ajuda na aquisição de um dos materiais e pelo agradável convívio.

Ao Prof. Dr. **João Ferlini Filho**, pelos ensinamentos, paciência, pela amizade e pelas risadas durante os cafezinhos na sala da especialização.

Ao Prof. Dr. **Marcus Vinicius Reis Só**, pelos ensinamentos, pelas palavras acolhedoras e cuidadosas, pela amizade e pelo exemplo de profissional.

À Prof^a. Dr^a. **Roberta Kochenborger Scarparo**, pelos ensinamentos, pelo exemplo de profissional e pelo agradável convívio durante o estágio na clínica de graduação;

À Prof^a. Dr^a. **Ranata Grazziotin**, pela ajuda na obtenção de um dos materiais da pesquisa, pelos ensinamentos e pelo agradável convívio.

Ao meu orientador de graduação Prof. Dr. **Rogério de Castilho Jacinto**, pelo exemplo de profissional e ser humano, pela humildade e pelo incentivo na carreira docente. Mesmo longe, sei que tenho um amigo que me apoia sempre.

Aos meus colegas e amigos do mestrado, **Júlia, Ramiro, Alex, Camila e Luciana**, pela amizade e ajuda durante esses anos.

Às minhas colegas de pós-graduação e amigas **Daiana Boijink e Júlia Iglesias**, por me ajudarem durante a parte prática dessa pesquisa e não medirem esforços para conclusão da mesma.

Aos meus **colegas e amigos de pós-graduação**, pela amizade e pelo agradável convívio.

Aos meus **amigos de Pelotas** pela grande amizade e apoio.

Ao **Programa de Pós Graduação em Odontologia** da Universidade Federal Do Rio Grande do Sul.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão de bolsa de mestrado.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)**, pela oportunidade de aprendizado por meio da pós-graduação.

A todos que direta, ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a biocompatibilidade em tecido conjuntivo de ratos do NeoMTA Plus (NMP) e comparar com o Agregado Trióxido Mineral (MTA) e Biodentine (BD). Foram utilizados 18 ratos divididos em 3 grupos (n=6) para cada período experimental (7, 30 e 90 dias). Tubos de polietileno contendo os materiais, tendo como controle o tubo vazio foram implantados. Decorridos os períodos experimentais e após processamento histológico, observou-se as características do componente celular inflamatório, da condensação fibrosa e da formação de abscesso. A análise estatística entre os grupos foi realizada através do teste de Friedman, complementado pelo teste de Dunn. As comparações entre os períodos experimentais foram realizadas através do teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Dunn ($P \leq 0,05\%$). Não houve diferença estatística significativa quando se avaliou os diferentes materiais no mesmo período experimental para todos os eventos inflamatórios ($P > 0,05$). Em relação à presença de infiltrado inflamatório, foi encontrada diferença significativa entre os períodos experimentais de 7 e 90 dias nos grupos NeoMTA Plus, Biodentine e controle, havendo diminuição da inflamação. Foi encontrada predominância de infiltrado linfoplasmocitário em todos materiais no período de 7 dias, havendo diminuição significativa desse componente no período de 90 dias. O NeoMTA Plus e o grupo controle apresentaram diminuição de linfócitos e plasmócitos entre os períodos de 30 e 90 dias ($P \leq 0,05$). Apenas o Biodentine, aos 7 dias, apresentou escore 2 (leve) de neutrófilo com diminuição do primeiro período para os períodos de 30 e 90 dias ($P \leq 0,05$). Com exceção do MTA, houve diminuição do macrófago ao longo do tempo, porém, foi encontrada diferença estatística nos grupos NeoMTA Plus e controle entre os períodos de 7 e 90 dias ($P \leq 0,05$). No que diz respeito à presença de célula gigante, não foi constatada diferença entre os períodos em nenhum dos materiais testados ($P > 0,05$). Houve ausência desse componente para os grupos NeoMTA plus e controle, e escore leve para o Biodentine e MTA. Foi encontrada presença de condensação fibrosa e evolução no espessamento estatisticamente significativa entre os períodos 7 e 90 dias em todos materiais ($P \leq 0,05$). Considerando este resultados, os materiais testados no estudo podem ser considerados biocompatíveis.

Palavras-chave: Endodontia, biocompatibilidade, material reparador, silicato de cálcio.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the biocompatibility in connective tissue of rats of NeoMTA Plus (NMP) and to compare it to Mineral Trioxide Aggregate (MTA) and Biodentine (BD). Eighteen rats were divided into three groups (n = 6) for each experimental period (7, 30 and 90 days). Polyethylene tubes containing the materials and empty tubes (control) were implanted. After the experimental periods and histological processing, observations were made of the cellular inflammatory component, the fibrous condensation, and the abscess formation. Statistical analysis among groups was performed using the Friedman and Dunn test. The comparisons among experimental periods were performed using the Kruskal-Wallis and Dunn test ($P \leq 0.05\%$). There was no statistically significant difference when the different materials were evaluated in the same experimental period for all inflammatory events ($P > 0.05$). In relation to the presence of inflammatory infiltrate, a significant difference was found among 7 and 90 days to NeoMTA Plus, Biodentine and control groups, with a decrease in inflammation. It was found predominance of lymphoplasmacytic infiltrate in all materials in the period of 7 days, with a significant decrease of this component in 90 days. NeoMTA Plus and control group showed decreased lymphocytes and plasmocytes among 30 and 90 days ($P \leq 0.05$). Only Biodentine, at 7 days, presented score 2 (light) to neutrophil with a decrease in the first period for the periods of 30 and 90 days ($P \leq 0.05$). With the exception of MTA, there was a decrease in macrophage over time, but a statistical difference was found in the NeoMTA Plus and control groups among 7 and 90 days ($P \leq 0.05$). Regarding the presence of giant cells, no difference was found among the periods in any of the tested materials ($P > 0.05$). There was absence of this component for NeoMTA plus and control groups, and light score for Biodentine and MTA. It was found fibrous condensation and evolution in thickening among 7 and 90 days in all materials ($P \leq 0.05$). Considering these results, the materials tested in the study can be considered biocompatible.

Keywords: Endodontics, biocompatibility, repair material, calcium silicate

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 Métodos de avaliação de biocompatibilidade | 13 |
| 2.1.1 Testes iniciais | 13 |
| 2.1.2 Testes secundários | 13 |
| 2.1.3 Testes de “aplicação” ou pré-clínicos | 15 |
| 2.2 Materiais testados | 15 |
| 2.2.1 Materiais à base de silicato de cálcio | 15 |
| 2.2.1.1 MTA | 16 |
| 2.2.1.2 Biodentine | 18 |
| 2.2.1.3 NeoMTA Plus | 19 |
| 3 OBJETIVOS | 22 |
| 4 METODOLOGIA | 23 |
| 4.1 Considerações éticas | 23 |
| 4.2 Local de realização da pesquisa | 23 |
| 4.3 Aquisição e adequação alimentar dos ratos | 23 |
| 4.4 Amostragem | 24 |
| 4.5 Delineamento | 24 |
| 4.5.1 Procedimentos clínicos | 24 |
| 4.5.2 Remoção das peças cirúrgicas | 26 |
| 4.6 Análise histológica | 26 |
| 4.7 Instrumentos de avaliação | 26 |
| 4.8 Análise estatística | 27 |
| 5 RESULTADOS | 28 |
| 6 DISCUSSÃO | 33 |
| 6.1 Metodologia empregada | 33 |
| 6.2 Análise dos resultados | 34 |
| 7 CONCLUSÃO | 38 |
| REFERÊNCIAS | 39 |
| ANEXO A | 49 |
| ANEXO B | 50 |

1 INTRODUÇÃO

A exposição da polpa dentária pode ocorrer devido a cárie, trauma ou durante o preparo cavitário. Nesses casos, preservar o tecido pulpar em um estado saudável é importante no tratamento de dentes com polpa vital, principalmente onde não houve a completa formação radicular (NAIR et al., 2009). Por essa razão, o tratamento conservador da polpa é um procedimento frequentemente utilizado na prática clínica. O objetivo principal desse tratamento é a manutenção das características histológicas normais do tecido conjuntivo remanescente através da proteção da área exposta com um material biocompatível e pela formação de uma barreira completa do tecido calcificado. (LEE et al., 2015).

Em casos de ápice incompleto, permite ainda a continuação da formação radicular, o que leva ao fechamento fisiológico apical com estrutura radicular fortalecida (KATEBZADEH; DALTON; TROPE, 1998). Por outro lado, em dentes imaturos onde há perda de vitalidade, o tratamento requer primeiramente a eliminação da infecção bacteriana do canal radicular para posterior selamento apical com material reparador que irá estimular a formação de tecido calcificado.

Por outro lado, o material em contato com o periodonto ou extravasado pode dificultar o desenvolvimento do processo de reparo que muitas vezes se dá através da fagocitose por células inflamatórias e do encapsulamento do "objeto estranho" por um tecido conjuntivo fibroso (MENDONÇA & ESTRELA, 2001).

A escolha de um correto material reparador é definitiva para o sucesso do tratamento conservador e no tratamento de dentes imaturos, compreendendo-se a importância crescente na evolução dos materiais para este fim. Um material ideal deve ter biocompatibilidade e ser capaz de induzir diferenciação celular do tecido, formar tecido mineralizado, além de possuir atividade antibacteriana (LIU; WANG; DONG, 2015).

Biocompatibilidade é a capacidade que um material possui de obter uma resposta biológica apropriada quando aplicada a um tecido biológico (WILLIAMS, 2008). Um material é considerado biocompatível quando a resposta inflamatória induzida por ele ao tecido se torna insignificante ao longo do tempo (SILVEIRA et al., 2011).

A implantação de materiais endodônticos em tecido conjuntivo de ratos é um dos métodos mais utilizados para determinar biocompatibilidade, devido a

semelhança do genoma de ratos e humanos (DA FONSECA et al., 2016; KOLA, 2004; MARCIANO et al., 2016). A capacidade de gerar efeito inflamatório pode ser avaliada através do exame histopatológico do tecido que envolve o implante (ZMENER; GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1988; SILVEIRA et al., 2011).

A cura pulpar após exposição direta à polpa é um complexo processo molecular e celular. Schroder, em 1985, descreve o primeiro estágio envolvendo a migração vascular e inflamatória de células, proliferação e adesão, para controlar e eliminar o irritante. Na segunda etapa, a reparação ocorre com migração, proliferação e adesão de células-tronco mesenquimais da polpa dentária.

Materiais que reivindicam melhor desempenho são continuamente introduzidos e comercializados, exemplo disso são os diversos materiais odontológicos à base de silicato de cálcio como: Biodentine (BD; Septodont, Saint-Maur-de-Fosses, France), Agregado Trióxido Mineral (MTA, Angelus, Londrina, PR, Brasil) e Neo MTA Plus (NMP, Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, USA). O NeoMTA Plus, recém-lançado no mercado, de acordo com o fabricante, é indicado para capeamento pulpar, pulpotomia, selamento de perfurações e obturação retrógrada.

Apesar de serem à base de silicato de cálcio, os mesmos possuem outros diferentes componentes em sua fórmula que podem interferir na compatibilidade biológica quando em contato com tecido conjuntivo.

Estes materiais reagem com água para produzir gel de hidrato de silicato de cálcio e hidróxido de cálcio. O cálcio em contato com soluções fisiológicas forma uma camada de hidroxiapatita na superfície do cimento. Valores de pH alcalinos também estimulam a formação da hidroxiapatita. Além disso, os íons hidroxila estimulam a liberação de fosfatase alcalina e proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), que participam do processo de mineralização (GANDOLFI et al., 2014).

Ainda, o pH favorável ativa a fosfatase alcalina, liberando íons fosfato que reage com os íons cálcio da corrente sanguínea gerando uma matriz orgânica de fosfato, ou seja, a hidroxiapatita.

A capacidade dos materiais à base de silicato de cálcio de liberar íons cálcio e formar hidroxiapatita implica no potencial de bioatividade e biocompatibilidade dos cimentos à base de silicato de cálcio (TAY et al., 2007; CAMILLERI; SORRENTINO; DAMIDOT, 2013) e é um fator chave para terapias endodônticas conservadoras bem sucedidas.

Embora a compatibilidade biológica seja uma característica essencial em um

material utilizado para reparo, não existem estudos na literatura que avaliem essa propriedade do material NeoMTA Plus.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Métodos de avaliação de biocompatibilidade

Diversos testes devem ser realizados para que seja determinada a biocompatibilidade de um material odontológico. Estes podem ser divididos em três níveis: testes iniciais de toxicidade, secundários e testes de “aplicação” (COSTA & SOUZA, 2005). Dentro de cada nível existem diferentes metodologias empregadas de acordo com a indicação e aplicação do material pesquisado.

2.1.1 Testes iniciais

Os testes iniciais determinam de maneira preliminar o comportamento dos materiais testados e/ou de seus componentes. Esse nível de teste não leva em consideração o modo de aplicação do material testado (PETERS, 2013). Os testes de citotoxicidade permitem o desenvolvimento de protocolos estandardizados e reproduzíveis (PETERS et al., 2001) por isso é o teste inicial mais comumente utilizado (COSTA & SOUZA, 2005).

Citotoxicidade é definida como a capacidade de um material impactar a viabilidade celular. Esse teste determina capacidade de inibição de crescimento, lise celular e demais efeitos celulares que podem ser causados pelas substâncias testadas (PETERS, 2013).

Vários tipos de linhagens celulares têm sido utilizadas em pesquisas de citotoxicidade de materiais odontológicos para tratamento conservador da polpa, como por exemplo, células pseudo-osteoblásticas (ATTIK et al., 2014), células-tronco pulpares (LUO et al., 2014, PÉRARD et al., 2013), fibroblastos gengivais humanos (ZHOU et al., 2013), linhagem celular pseudo-odontoblástica (PÉRARD et al., 2013), entre outras.

2.1.2 Testes secundários

Estes estudos tem finalidade de fornecer dados científicos sobre a interação do material com sangue, tecido conjuntivo e tecido ósseo. Dos cinco testes secundários recomendados (teste de irritação da membrana mucosa, toxicidade

dérmica por exposição repetida, implantação subcutânea, implantação em tecido ósseo e sensibilização), o teste de implantação de materiais em tecido conjuntivo subcutâneo de animais tem sido utilizado com larga frequência para avaliar materiais recomendados para terapia pulpar (COSTA; HEBLING; SOUZA, 2005).

Modelos experimentais com roedores têm sido amplamente utilizados com variação metodológica na forma de armazenamento dos materiais testados como, por exemplo, injeção direta em tecido conjuntivo subcutâneo (YESILSOY et al., 1988), colocação do material em tubos de dentina (HOLLAND, 1999), tubos de teflon (OLSSON; SLIWKOWSKI; LANGELAND, 1981; SAFAVI; PASCON; LANGELAND, 1983), tubos de silicone (ZMENER; GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1988) e tubos de polietileno (DA FONSECA et al., 2016). Além disso, pode-se avaliar a reação do material em tecido ósseo utilizando tubos (TORABINEJAD et al., 1995) ou através da injeção do material (RAHIMI et al., 2012).

A implantação de tubos de polietileno tem sido mundialmente utilizada. Torneck, em 1966, introduziu a utilização desse material ao avaliar a reação induzida por ele, concluindo que houve leve reação inflamatória nas primeiras semanas e que diminuiu ao longo do tempo, além disso, observou formação de cápsula fibrosa ao redor dos tubos após sessenta dias. Da mesma forma, Makkes et al (1977), observaram que o tubo de polietileno gerou leve reação inflamatória e que essa reação foi gerada devido ao trauma cirúrgico durante a colocação do tubo na cavidade.

Olsson, Sliwkowski e Langeland (1981), afirmam que o método de implantação em tecido subcutâneo de ratos pode ser empregado para avaliação de compatibilidade biológica de materiais pois demonstra detalhadamente a reação tecidual quando em contato com determinado material. E segundo Yaltirik et al. (2004), esse tipo de método permite a padronização da interface tecido-material para fim de pesquisa.

O tempo de avaliação após a implantação do material é de extrema importância para a correta classificação do processo inflamatório provocado pelo material testado, não há um consenso na literatura em relação a esse fator. Porém, a maioria das pesquisas sugere a avaliação após sete dias para observar o quadro reacional inicial e evitam avaliar a reação inflamatória antes desse período devido ao trauma cirúrgico gerado pela implantação dos materiais (MAKKES et al., 1977). Após esse período, é interessante observar a reação inflamatória em um período

intermediário de trinta dias para avaliar de maneira comparativa a evolução do quadro reacional dos materiais testados (MORI et al., 2014; COSTA; HEBLING; SOUZA, 2005). Para que se observe um provável mecanismo de reparação em períodos mais longos, a literatura demonstra variação no período experimental, desde sessenta dias (DA FONSECA et al., 2016) até noventa dias (GRECCA et al., 2011) após a implantação.

Existem diversas formas de avaliar a resposta inflamatória induzida pelo método de implantação, uma delas foi proposta por Figueiredo et al, em 2001, que consideram critério de avaliação achados importantes no processo inflamatório como: tecido de granulação, neutrófilos polimorfonucleares, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos, células gigantes, macrófagos, presença de abscesso e de condensação fibrosa, além disso, observou também a presença de cimento no endotélio. Definiu a intensidade de cada componente celular em escores em: 0 (ausente), 1 (leve) e 2 (severa) e escores para capsula fibrosa como 1 (fina camada) e 2 (espessa camada). Dessa forma, esses critérios permitem avaliar os principais achados histológicos no processo inflamatório e analisar de forma objetiva os resultados (SCARPARO, 2007).

2.1.3 Testes de “aplicação” ou pré-clínicos

Esta terceira etapa envolve a aplicação de testes em animais dentro do contexto clínico o qual o material é empregado. Existem diversos testes de aplicação recomendados para avaliação biológica de materiais dentários, como por exemplo: teste de irritação pulpar, aplicação em endodontia, implante dental e de capeamento pulpar/pulpotomia. Caso constatado sucesso nesta etapa, o material pode ser avaliado biologicamente em humanos (COSTA; HEBLING; SOUZA, 2005).

2.2 Materiais testados

2.2.1 Materiais à base de silicato

Materiais à base de silicato de cálcio são formados a partir da mistura de pó e líquido. O pó é composto basicamente por silicato dicálcio e tricálcio e o líquido utilizado geralmente é a água destilada. Após a mistura do pó com o líquido obtém-

se um material na forma de um gel que libera principalmente hidróxido de cálcio e silicato de cálcio hidratado que se solidifica (CAMILLERI, 2007).

O primeiro material à base de silicato de cálcio foi desenvolvido para fins endodônticos na década de 1990, sendo denominado Agregado Trióxido Mineral (MTA) (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993) e comercializado como ProRoot MTA (Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, USA) na coloração cinza. A adição do radiopacificador óxido de bismuto é o componente diferencial deste produto para o cimento Portland (FUNTEAS; WALLACE; FOCHTMAN, 2003).

Inicialmente, o MTA foi desenvolvido para ser utilizado apenas como material retroobturador, porém, devido às suas propriedades hidráulicas, capacidade seladora, bioatividade e biocompatibilidade, tornou-se evidente o seu potencial para outras finalidades clínicas como, por exemplo, capeamento pulpar, pulpotomia, apicigênese e apicificação, selamento de perfurações e outros procedimentos (CAMILLERI, 2015a; PRATI & GANDOLFI, 2015).

Desde então, novos materiais à base de silicato de cálcio têm sido desenvolvidos e comercializados com o objetivo de melhorar as características dos materiais originais, como: difícil manipulação e manuseio, baixa radiopacidade, pigmentação coronária quando em contato com hipoclorito de sódio, longo tempo de presa, risco de *wash-out* em ambientes úmidos e alto custo (CAMILLERI, 2015; PRATI & GANDOLFI, 2015). Esses materiais têm sido denominados materiais “MTA-like” devido a sua composição semelhante ao MTA ou “cimentos biocerâmicos” devido às características de biocompatibilidade desses materiais (COOMARASWAMY; LUMLEY; HOFMANN, 2007; CAMILLERI, 2015a)

Por esses motivos, foram incluídos neste estudo o Agregado Trióxido Mineral (MTA, Angelus, Londrina, PR, Brasil) e Biodentine (BD, Septodont, Saint-Maur-de-Fosses, France) consolidados no mercado e outro cimento recentemente lançado: NeoMTA Plus (NMP, Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, USA), para avaliar se a alteração na composição pode influenciar na resposta inflamatória do material.

2.2.1.1 MTA

Dentre as propriedades desejadas de um material reparador, o MTA possui boa atividade antimicrobiana, bom selamento marginal, baixa citotoxicidade, capacidade para induzir a deposição de tecido mineralizado. (PARIROKH &

TORABINEJAD, 2010a, 2010b). O MTA possui um mecanismo de estimulação do reparo, pela deposição de tecido mineralizado, que é favorecido pelo seu elevado pH e pela sua capacidade de liberação de íons cálcio. (STANLEY et al., 1989; HOLLAND et al., 2001; DUARTE et al., 2003; OKABE et al., 2006).

A baixa citotoxicidade e boa biocompatibilidade do MTA foram atribuídas aos seus principais componentes como o silicato dicálcio, silicato tricálcio, aluminato tricálcio, aluminoferrato de tetracálcio, carbonato de cálcio e óxido de cálcio (HOLLAND et al., 2002; GOMES-FILHO et al., 2008; BIN et al., 2012).

Estudos comprovam a biocompatibilidade desse material. Holland et al (1999) utilizaram o método de implantação de tubos de dentina em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos para avaliar a compatibilidade biológica dos cimentos MTA e hidróxido de cálcio. O processo inflamatório foi caracterizado histologicamente quanto ao tipo e intensidade de reação inflamatória. No grupo do MTA foi observada reação inflamatória crônica leve a moderada no período de 7 dias, sendo que no período de 30 dias foi observada tecido conjuntivo fibroso e infiltrado inflamatório leve. O hidróxido de cálcio provocou a mesma reação que o MTA.

Em 2009, Gomes-Filho et al avaliaram os cimentos à base de MTA da Angelus e Endo-CPM-Sealer (Portland Cement Modified Sealer) (EGEO S.R.L., Buenos Aires, Argentina) e o cimento obturador Sealapex (SybronEndo, Glendora, CA) em tecido conjuntivo de ratos. Todos materiais apresentaram regressão do processo inflamatório ao longo do tempo, sendo o MTA Angelus o primeiro cimento que apresentou processo inflamatório considerado leve, observado no período de 15 dias. Da mesma forma, Scarparo et al em 2010 avaliaram o Endo CPM Sealer, MTA e AH Plus e observaram resultados favoráveis ao Endo CPM e MTA.

Apesar das características biológicas satisfatórias, o MTA apresenta desvantagens como a dificuldade de manuseio quando misturado a água (TORABINEJAD et al., 1995), longo tempo de presa e, quando em contato com a solução irrigadora hipoclorito de sódio, pode ocorrer pigmentação dental devido a interação entre o radiopacificador óxido de bismuto e a solução (CAMILLERI, 2015b).

Marciano et al (2016) com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas e biológicas associaram propilenoglicol ao MTA e observaram que esta associação não alterou a resposta inflamatória do material em tecido conjuntivo.

Evidências sugerem que a óxido de bismuto interfere no mecanismo de hidratação do MTA e na precipitação do hidróxido de cálcio (CAMILLERI, 2007). Além disso, altera a microestrutura do material aumentando a porosidade e a solubilidade, culminando na redução de sua resistência (CAMILLERI, 2007; COOMARASWAMY; LUMLEY; HOFMANN, 2007; CAMILLERI, 2008; TANOMARU-FILHO et al., 2012). No que diz respeito à biocompatibilidade, tem sido demonstrado que o óxido de bismuto interfere no crescimento celular (CAMILLERI et al., 2004). Além disso, quando avaliado *in vitro*, o óxido de bismuto demonstrou reduzir a citocompatibilidade inicial do cimento (GANDOLFI et al., 2010).

Uma alternativa ao óxido de bismuto é o óxido de zircônia (ZrO_2) que apresentou radiopacidade superior à recomendada pela ISO e não afeta a reação de hidratação do material. Também origina um material bioativo com propriedades comparáveis com o MTA (CAMILLERI; CUTTAJAR; MALLIA, 2011; CUTTAJAR et al., 2011).

Vários estudos têm sido realizados para desenvolver novos materiais que mantenham as propriedades biológicas do agregado, melhorando ao mesmo tempo suas características físicas e químicas (DUBOK, 2000; DE-DEUS et al., 2009).

2.2.1.2 Biodentine (BD)

Biodentine (Septodont, Saint-Maur-de-Fosses, France) é um material à base de silicato de cálcio, desenvolvido com base na composição do cimento Portland (MORI et al., 2014) que começou a ser comercializado em 2009 (MALKONDU; KARAPINAR; KAZAZOGLU, 2014). Este material foi produzido com o objetivo de combinar a alta biocompatibilidade e bioatividade dos cimentos à base de silicato de cálcio com propriedades aperfeiçoadas, tais como rápido tempo de presa (uma função do cloreto de cálcio adicionado a esse cimento) e maior resistência à compressão (resultado do baixo teor de água incorporado ao cimento devido à adição do polímero hidrossolúvel) (GRECH; MALLIA; CAMILLERI, 2013).

Segundo o fabricante, o material promove cicatrização e formação de tecido mineralizado através da produção de dentina reacionária e pontes de dentina e é indicado como material protetor da dentina em restaurações indiretas, lesões cáries profundas ou extensas, capeamento pulpar, pulpotomias, perfuração de furca, reabsorção interna e externa, apicificação e retrobturação.

Este material é formado da mistura de um líquido com um pó e é apresentado em cápsula de dose única para ser triturado num amalgamador durante 30 segundos. O líquido contém polímero hidrossolúvel à base de carboxilato, responsável por reduzir a quantidade necessária de água e pela consistência mais homogênea (HAN; OKIJI, 2011; CAMILLERI et al., 2012), cloreto de cálcio que acelera a hidratação e diminui o tempo de presa do material, e água (LAURENT et al., 2008; GOVINDARAJU; NEELAKANTAN; GUTMANN, 2016). O pó é composto por silicato tricálcio, carbonato de cálcio (incorporado devido à sua biocompatibilidade e conteúdo de cálcio) e óxido de zircônia, que é utilizado como agente radiopacificador e com capacidade de promover adequadas propriedades físico-químicas e melhorar a resposta biológica quando comparado ao óxido de bismuto (CAMILLERI et al., 2013; SILVA et al., 2014).

Alguns estudos foram realizados para determinar a biocompatibilidade e bioatividade do Biodentine. Mori et al (2014) avaliaram a compatibilidade biológica dos cimentos Biodentine, MTA Angelus e à base de óxido de zinco e eugenol em tecido conjuntivo de ratos. Concluiu-se que os cimentos MTA e Biodentine podem ser considerados biocompatíveis, pois a reação induzida pelo primeiro foi insignificante e a induzida pelo segundo se tornou insignificante ao longo do tempo. O mesmo foi observado por Da Fonseca et al (2016) quando avaliaram Biodentine e MTA Angelus.

Segundo HAN & OKIJI (2011, 2013) este material libera íons cálcio que formam uma superfície mineralizada rica em cálcio e fosfato, além da incorporação de cálcio e sílica à dentina radicular indicando sua bioatividade.

Além disso, esse material afetou positivamente o processo de reparo pulpar quando colocado em contato direto com a polpa dentária através do estímulo da proliferação, migração e adesão de células-tronco pulpares (LUO et al., 2014).

2.2.1.3 NeoMTA PLUS (NMP)

O NeoMTA Plus (Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, USA), é uma evolução do MTA Plus (Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, USA).

O MTA Plus é formado a partir da mistura de um pó e um líquido. O pó contém silicato tricálcio, silicato dicálcio, óxido de bismuto, aluminato de cálcio e sulfato de cálcio. O líquido é formado por um gel a base de água com agentes

hidrossolúveis mais finos e polímeros (EID et al., 2014), esse gel confere fácil manipulação do cimento (MCMICHAEL, PRIMUS, OPPERMAN, 2016).

Segundo Camilleri, Formosa e Damidot (2013), o MTA Plus possui partículas mais finas quando comparado ao ProRoot MTA confirmando a informação dada pelo fabricante do MTA Plus.

Gandolfi et al. (2014) observaram que o MTA Plus liberou íons cálcio durante 28 dias em solução aquosa induzindo aumento de pH durante esse período. Essa liberação de íons cálcio está interligada com as características de sorção, solubilidade, porosidade e formação de minerais. Quando comparado ao ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Specialties, Tulsa, OK), o MTA Plus demonstrou essas características de forma mais acentuada, provavelmente devido às suas partículas mais finas de pó.

Rodrigues et al (2016) avaliaram a citotoxicidade, bioatividade osteogênica e expressão de mRNA de marcadores osteogênicos (proteína óssea morfogenética 2, osteocalcina e fosfatase alcalina) induzidos por MTA Plus e MTA Angelus em células tronco pulparem humanas, e concluíram que ambos materiais não são citotóxicos, induzem mineralização *in vitro* e a expressão de marcadores osteogênicos.

Com relação ao NeoMTA Plus, este apresenta óxido de tântalo como radiopacificador ao invés do óxido de bismuto. Ao avaliar algumas características dos materiais NeoMTA Plus, MTA Plus e Biodentine, Camilleri (2015b) observou que, quando em contato com hipoclorito de sódio, o NeoMTA Plus e Biodentine não induziram pigmentação da estrutura dental, já o MTA Plus induziu uma coloração marrom escura. Esses resultados demonstram que os radiopacificadores óxido de tântalo (NeoMTA Plus) e óxido de zircônia (Biodentine) podem ser utilizados como alternativa ao óxido de bismuto (MTA Plus).

A imersão dos materiais em solução salina balanceada de Hank resultou em deposição de hidroxiapatita no MTA Plus e de hidróxido de cálcio no NeoMTA Plus e Biodentine. A deposição desses minerais é de extrema importância para indução de ponte de dentina e continuação de formação radicular em dentes com rizogênese incompleta, demonstrando sua bioatividade (CAMILLERI, 2015b).

No que diz respeito a biocompatibilidade do NeoMTA Plus, não existem estudos na literatura que avaliem sua resposta inflamatória, tornando-se relevante seu estudo.

Uma vez que os materiais reparadores à base de silicato de cálcio são normalmente aplicados em contato íntimo com tecidos pulpares ou periapicais, o teste *in vivo* de biocompatibilidade é um passo preliminar importante na avaliação destes materiais.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar histopatologicamente as reações ocorridas no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos após a implantação de tubos de polietileno contendo materiais de reparo à base de silicato de cálcio.

Objetivos específicos

- Comparar o grau de inflamação nos diferentes grupos testados quanto a:

- 1) intensidade e características do componente celular inflamatório;
- 2) presença e característica da condensação fibrosa;
- 3) ausência ou presença de abscesso.

- Avaliar o desenvolvimento das reações teciduais de cada um dos grupos em diferentes períodos experimentais.

4 METODOLOGIA

4.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa (COMPESQ) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS.

O trabalho foi estruturado seguindo os princípios da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que regulamenta o uso científico em animais e da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA, de 2013, do CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

4.2 Local de realização da pesquisa

A parte experimental deste projeto foi realizada no Laboratório do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, que apresenta equipe treinada e ambiente apropriado para o tratamento e manutenção dos ratos necessários à pesquisa (anexo A). O processamento e análise histológica foram realizados no Núcleo de Pesquisa Básica da Faculdade de Odontologia da UFRGS (anexo B).

4.3 Aquisição e adequação alimentar dos ratos

Para este estudo, foram utilizados 18 ratos machos da linhagem *Wistar* pesando entre 180 e 220 gramas, com quatro semanas de idade, adquiridos no Biotério do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais da UFRGS, onde permaneceram até 72 horas antes do momento do experimento.

Para o experimento, os animais foram mantidos no Laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS em caixas de polipropileno (2 animais/caixa) medindo 32x40x17cm com tampa metálica e forradas de maravalha. As caixas foram regularmente higienizadas e os animais tiveram livre acesso à água filtrada e ração padrão para roedores (Nuvital, Curitiba Paraná, Brasil). As condições

ambientais foram controladas: temperatura (22 ± 1 °C), umidade relativa de 65% e ciclo claro-escuro de 12 h.

Os procedimentos clínicos nos ratos foram realizados pelos pesquisadores devidamente protegidos com equipamentos de proteção individual (EPI) sob supervisão de médica veterinária, conforme a Resolução Normativa nº 6, de 10 de julho de 2012. Foi utilizado um tempo mínimo de adaptação ao novo ambiente de pelo menos 1h. Durante a execução dos experimentos, os animais foram manipulados de maneira a reduzir ao máximo o estresse desnecessário.

4.4 Amostragem

Os 18 animais foram divididos em 3 grupos experimentais de 6 ratos cada, com períodos de observação de 7, 30 e 90 dias, sendo realizada a eutanásia de 6 ratos em cada período experimental.

4.5 Delineamento

4.5.1 Procedimentos clínicos

a) Anestesia dos animais

Todo procedimento operatório foi realizado em ambiente asséptico, sendo os materiais cirúrgicos autoclavados.

Os animais foram submetidos à anestesia geral. Foi realizada a aplicação intraperitoneal de 80mg/kg de Quetamina (Francotar[®] - Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda., Roseira, SP) e 20mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Virbaxyl[®] 2% - Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP).

b) Procedimento operatório

A antissepsia foi realizada na região dorsal do animal utilizando uma gaze esterilizada embebida em solução de álcool iodado 3% (Quinta Essência Cosméticos e Medicamentos Ltda., Porto Alegre, RS), e a tricotomia foi realizada com lâmina de barbear.

Quatro incisões de 1 cm de comprimento e 2 cm de distância entre cada uma foram realizadas com uma lâmina de bisturi, sendo o tecido subcutâneo do animal

divulsionado lateralmente com auxílio de uma tesoura de ponta romba para se obter quatro lojas cirúrgicas. A divulsão tecidual deveria atingir uma extensão de 20 mm, sendo paralela à incisão realizada. Tomou-se o cuidado de não haver sangramento durante a divulsão, caso ocorresse, o animal era descartado.

Foi utilizada uma sonda gástrica de polietileno com 1,3 mm de diâmetro interno (Mark Med Indústria e comércio LTDA., Bragança Paulista, São Paulo, Brasil) para confecção dos tubos. A sonda foi seccionada com auxílio de lâmina de bisturi de forma com que se obtivessem tubos de 10 mm de comprimento.

Os cimentos NeoMTA Plus (Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, USA), Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-Fosses, France) e MTA (Angelus, Londrina, PR, Brasil) foram manipulados de acordo com as instruções do fabricante, introduzidos nos tubos, tomando-se o cuidado de se evitar o extravasamento. Com o auxílio de uma pinça curva adaptada, os tubos preenchidos foram introduzidos nas lojas cirúrgicas, paralelamente à incisão. Um tubo vazio foi introduzido em cada rato e foi considerado o grupo controle. Foi realizada sutura simples com fio de sutura reabsorvível 4-0 (Vicryl - Ethicon, Johnson&Johnson, São José dos Campos, Brasil).

Os animais passaram por um período de recuperação ao final do procedimento, sendo observados constantemente em relação a qualquer alteração comportamental e sinais condizentes com dor e/ou estresse, de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins científicos e didáticos (DBCA), antes de retornarem à sala onde foram mantidos. Os seguintes sinais foram observados e registrados em livro próprio: mudanças no padrão de sono, hidratação, higiene e comportamento exploratório; comportamento agressivo ou anormal, depressão, postura ou movimentos anormais, modificação da expressão facial, resposta aversiva à palpação de área afetada, vocalização anormal, alteração da função cardiovascular ou respiratória, apetite anormal, vômitos e defecação, declínio no peso corporal, alteração da temperatura corporal e diurese anormal.

Quando tais sinais foram detectados, medidas cabíveis foram tomadas para impedir ou minimizar suas consequências para os animais.

A analgesia foi realizada no período pós-operatório para controle da dor. Como medicação analgésica foi utilizado Tramadol (Tramal 50mg) na dose de 5mg/kg de 12 em 12 horas durante 3 dias via intraperitoneal, conforme prescrição do veterinário responsável.

A ferida cirúrgica foi avaliada diariamente.

4.5.2 Remoção das peças cirúrgicas

Decorridos os períodos experimentais, os animais foram eutanasiados com Tiopental intraperitoneal 120mg/kg em solução misturada com anestésico local (Lidocaína 10mg/ml). Após, foi realizada tricotomia com lâmina de barbear e a biópsia excisional da área do implante. As peças cirúrgicas foram fixadas em formol à 10% tamponado por 48 horas.

O material biológico não utilizado foi acondicionado em sacos plásticos brancos apropriados e depositados em freezer especial até seu descarte semanal realizado por empresa especializada (terceirizada e licitada pela UFRGS).

Materiais como seringas, agulhas, lâminas de bisturi foram descartados em *descarpacks*.

4.6 Análise histológica

Após a fixação, os tubos de polietileno foram removidos do tecido através de uma lâmina de bisturi e as peças foram incluídas em parafina. Cortes histológicos com 5 a 6 μm de espessura foram obtidos. Estes cortes foram corados em hematoxilina e eosina.

4.7 Instrumentos de avaliação

A análise dos resultados foi feita por um examinador experiente, seguindo delineamento cego. O Kappa intra-examinador foi realizado obtendo valor maior que 7, exibindo um grau de concordância significativo. Foi utilizado microscópio óptico (Olympus BX-41TF, Olympus Optical Company LTDA., Japão), em aumentos de 40, 100 e 400 vezes para análise das imagens. Cada amostra foi avaliada a partir de 4 cortes histológicos.

Foram descritos os elementos inflamatórios encontrados e determinado a sua proporção no conjunto de eventos (adaptado de Figueiredo et al, 2001).

- Quanto à intensidade do infiltrado inflamatório:

1. Ausente (Células ausentes)
2. Leve (Células esparsas ou em grupamentos reduzidos)
3. Moderado (Células presentes sem ainda dominar o campo microscópico)
4. Intenso (Células presentes sob a forma de infiltrado, dominando o campo microscópico).

- Quanto à presença de neutrófilos, linfócitos/plasmócitos, células gigantes, eosinófilos e macrófagos:

1. Ausente (Células ausentes)
2. Leve (Células esparsas ou em grupamentos reduzidos)
3. Moderado (Células presentes sem ainda dominar o campo microscópico)
4. Intenso (Células presentes sob a forma de infiltrado, dominando o campo microscópico).

- Abscesso

1. Ausente
2. Presente apenas em contato com o material
3. Presente em áreas distantes à presença do material

- Condensação fibrosa

1. Ausência de fibras colágenas envolvendo o material em estudo
2. Presença de fina camada de fibras colágenas envolvendo o material em estudo
3. Presença de camada espessa de fibras colágenas envolvendo o material em estudo.

4.8 Análise estatística

Foi utilizado o teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido pelo post hoc de Dunn quando se avaliou o mesmo material nos diferentes períodos experimentais. Quando se avaliou os diferentes materiais no mesmo período, utilizou-se o teste de Friedman seguido pelo post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%. Todos os dados foram avaliados utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

Os resultados estão ilustrados na tabela 1 e figura 1 e 2.

Houve perda de 1 animal após a cirurgia, durante o período de recuperação, definindo-se 5 animais (n=5) para o período de avaliação de 7 dias.

Não foram encontrados eosinófilos e abscesso em nenhum dos grupos avaliados.

Não houve diferença estatística significativa quando se avaliou os diferentes materiais no mesmo período experimental para todos os eventos inflamatórios ($P > 0,05$).

Em relação à presença de infiltrado inflamatório, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os períodos experimentais de 7 e 90 dias nos grupos NeoMTA Plus, Biodentine e controle, havendo diminuição da inflamação. Ainda no grupo controle, observou-se diferença entre os períodos de 30 e 90 dias ($P \leq 0,05$). Para todos os grupos experimentais observou-se infiltrado inflamatório de severo a moderado aos 7 dias, e aos 30 e 90 dias observou-se regressão dos escores.

Foi encontrada predominância de infiltrado linfoplasmocitário em todos materiais no período de 7 dias, havendo diminuição estatisticamente significativa desse componente no período de 90 dias. O NeoMTA Plus e o grupo Controle apresentaram diminuição de linfócitos e plasmócitos entre os períodos de 7 e 30 e 7 e 90 dias ($P \leq 0,05$).

Quanto à variável neutrófilo, apenas o Biodentine aos 7 dias apresentou escore 2 (leve), com diminuição estatisticamente significativa do primeiro período para os períodos de 30 e 90 dias ($P \leq 0,05$). Nos outros materiais não foi encontrado esse componente.

Quando se avaliou a variável macrófago, com exceção do MTA, houve diminuição deste componente ao longo do tempo, porém, foi encontrado diferença estatística significativa nos grupos NeoMTA Plus e Controle entre os períodos de 7 e 90 dias ($P \leq 0,05$).

No que diz respeito à presença de célula gigante, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os períodos em nenhum dos materiais testados

($P > 0,05$). Houve ausência desse componente para os grupos NeoMTA plus e controle, e escore leve para o Biodentine e MTA.

Por fim, em relação a variável condensação fibrosa, foi encontrada presença e evolução no espessamento estatisticamente significativa entre os períodos 7 e 90 dias em todos materiais. Além disso, constatou-se diferença entre os períodos 7 e 30 dias nos grupos MTA e Controle ($P \leq 0,05$).

TABELA 1. Frequência e porcentagem dos elementos inflamatórios de acordo ao grupo e período experimental

| SCORES | NEO MTA PLUS | | | MTA | | | BIODENTINE | | | CONTROLE | | |
|---|--------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 7 | 30 | 90 | 7 | 30 | 90 | 7 | 30 | 90 | 7 | 30 | 90 |
| INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 0 (0%) | 1 (16,6%) | 6 (100%) | 0 (0%) | 3 (50%) | 3 (50,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (33,3%) | 0 (0%) | 3 (50%) | 6 (100%) |
| 2 | 1 (20,0%) | 4 (66,6%) | 0 (0%) | 1 (20,0%) | 1 (16,6%) | 1 (16,6%) | 0 (0%) | 2 (33,3%) | 1 (16,6%) | 0 (0%) | 3 (50%) | 0 (0%) |
| 3 | 1 (20,0%) | 1 (16,6%) | 0 (0%) | 2 (40,0%) | 2 (33,3%) | 2 (33,3%) | 1 (20,0%) | 4 (66,6%) | 3 (50%) | 3 (60,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 4 | 3 (60,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (40,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 4 (80,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (40,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| NEUTRÓFILOS | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 4 (80,0%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 4 (80,0%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 2 (40,0%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 4 (80,0%) | 6 (100%) | 6 (100%) |
| 2 | 1 (20,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (20,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (20,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (20,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 3 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (40,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 4 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| LINFÓCITOS/PLASMÓCITOS | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 0 (0%) | 4 (66,6%) | 6 (100%) | 0 (0%) | 3 (50%) | 3 (50,0%) | 0 (0%) | 1 (16,6%) | 4 (66,6%) | 0 (0%) | 6 (100%) | 6 (100%) |
| 2 | 2 (40,0%) | 2 (33,3%) | 0 (0%) | 1 (20,0%) | 2 (33,3%) | 3 (50,0%) | 0 (0%) | 4 (66,6%) | 2 (33,3%) | 3 (60,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 3 | 2 (40,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (40,0%) | 1 (16,6%) | 0 (0%) | 3 (60,0%) | 1 (16,6%) | 0 (0%) | 1 (20,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 4 | 1 (20,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (40,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (40,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (20,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| CÉLULAS GIGANTES | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 5 (100%) | 6 (100,0%) | 6 (100%) | 4 (80,0%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 4 (80,0%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 5 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) |
| 2 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 3 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (20,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 4 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (20,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| EOSINÓFILOS | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 5 (100%) | 6 (100,0%) | 6 (100%) | 5 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 5 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 5 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) |
| 2 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 3 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 4 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| MACRÓFAGOS | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 0 (0%) | 1 (16,6%) | 6 (100%) | 2 (40,0%) | 3 (50,0%) | 3 (50,0%) | 0 (0%) | 1 (16,6%) | 2 (33,3%) | 0 (0%) | 3 (50%) | 6 (100%) |
| 2 | 1 (20,0%) | 4 (66,6%) | 0 (0%) | 2 (40,0%) | 2 (33,3%) | 1 (16,6%) | 1 (20,0%) | 2 (33,3%) | 1 (16,6%) | 1 (20,0%) | 3 (50%) | 0 (0%) |
| 3 | 3 (60,0%) | 1 (16,6%) | 0 (0%) | 1 (20,0%) | 1 (16,6%) | 2 (33,3%) | 1 (20,0%) | 3 (50%) | 3 (50%) | 3 (60,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 4 | 1 (20,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 3 (60,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 1 (20,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| ABCESSO | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 5 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 5 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 5 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) | 5 (100%) | 6 (100%) | 6 (100%) |
| 2 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 3 | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| CONDENSAÇÃO FIBROSA | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 3 (60,0%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 5 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 5 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 5 (100%) | 0 (0%) | 0 (0%) |
| 2 | 2 (40,0%) | 6 (100%) | 4 (66,6%) | 0 (0%) | 5 (83,3%) | 5 (83,3%) | 0 (0%) | 6 (100%) | 2 (33,3%) | 0 (0%) | 4 (66,6%) | 4 (66,6%) |
| 3 | 0 (0%) | 0 (0%) | 2 (33,3%) | 0 (0%) | 1 (16,6%) | 1 (16,6%) | 0 (0%) | 0 (0%) | 4 (66,6%) | 0 (0%) | 2 (33,3%) | 2 (33,3%) |

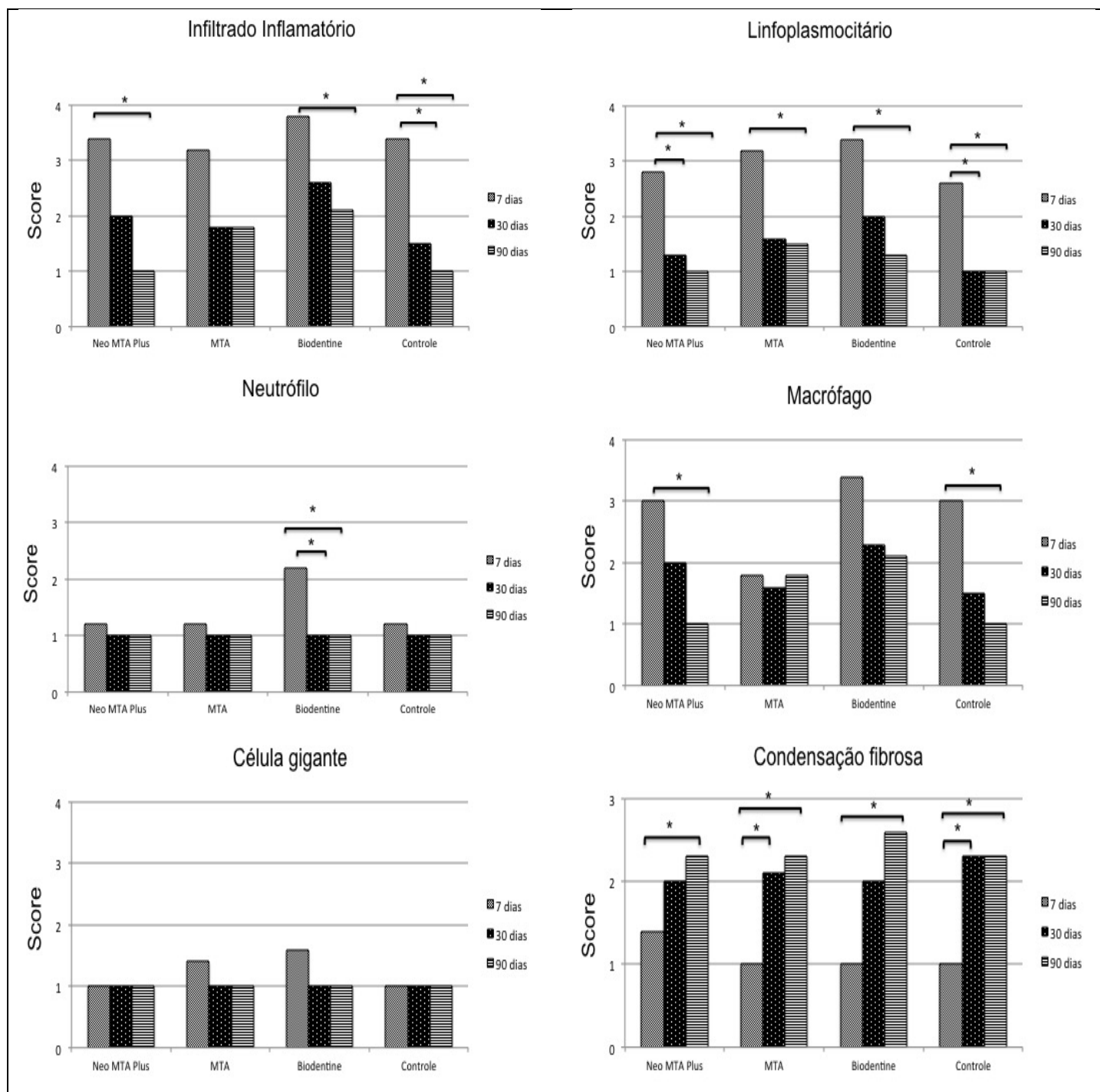


Figura 1. Comparação entre os grupos de estudo e períodos experimentais quanto às seguintes variáveis: infiltrado inflamatório, linfócitos/plasmócitos, neutrófilos, macrófagos, células gigantes e fibras. $P \leq 0,05$.

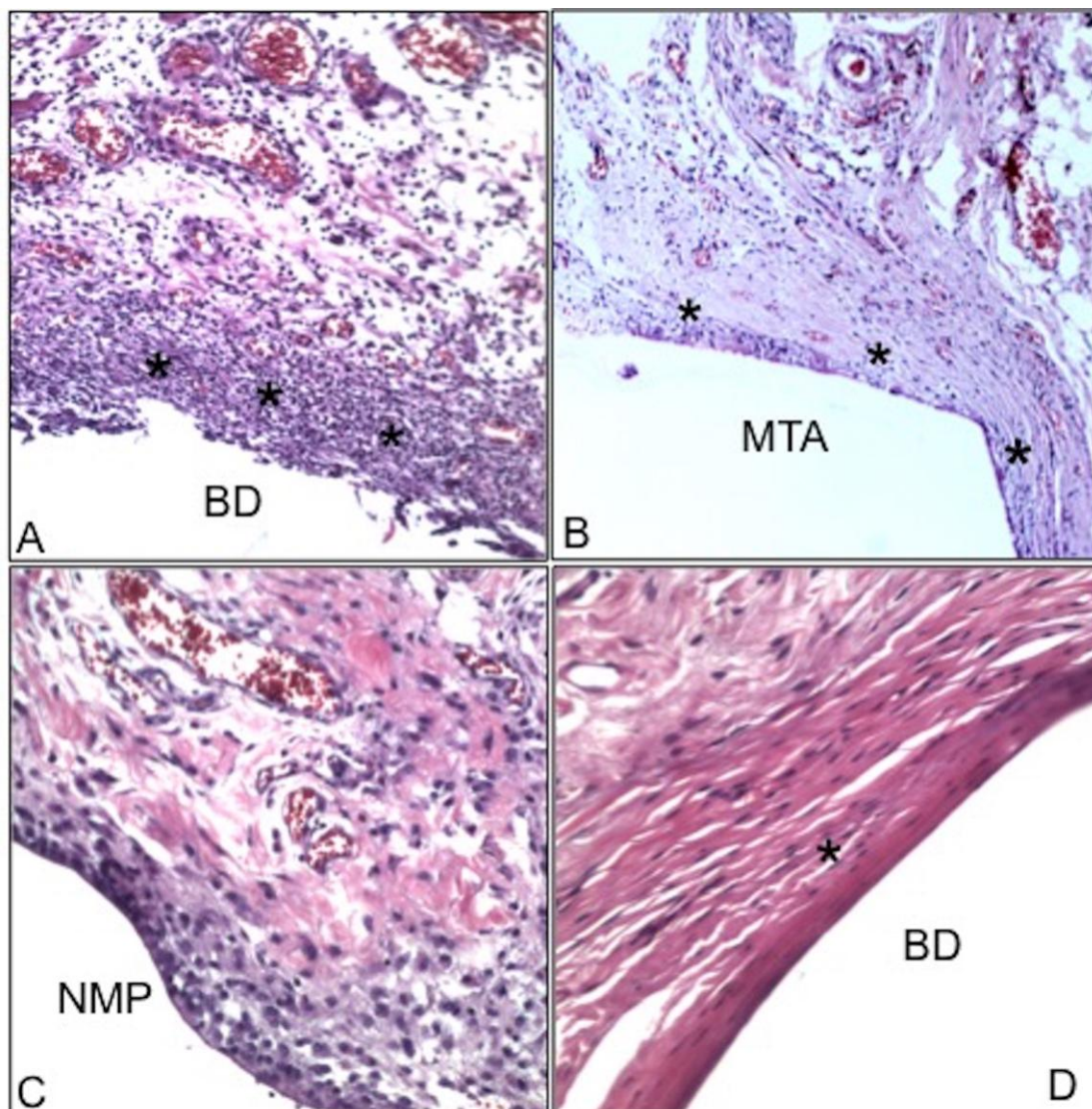


FIGURA 2. Resposta do tecido conjuntivo frente aos diferentes materiais reparadores. (A) Após 7 dias, Biodentine (BD) apresentou infiltrado inflamatório intenso (*) (40x). (B) Após 7 dias, MTA apresentou infiltrado inflamatório moderado (*) (40x). (C) NeoMTA Plus, após 7 dias, apresentou uma resposta inflamatória moderada (*) (300x). (D) Biodentine, após 90 dias, apresentou condensação fibrosa espessa (*) (300x).

6 DISCUSSÃO

6.1 Metodologia empregada

A biocompatibilidade dos materiais dentários é fundamental para evitar reações inflamatórias significativas a fim de permitir a reparação tecidual. Um material considerado biocompatível deve apresentar baixa toxicidade sem promover reação inflamatória e, caso promova, deve reduzir ao longo do tempo para nível insignificante ou leve (HAUMAN & LOVE, 2003). Além disso, a formação de uma cápsula de tecido fibroso ao redor do material indica que o mesmo é tolerado pelos tecidos (YALTIRIK et al., 2004).

Devido a extrema importância da biocompatibilidade de materiais dentários, diversos métodos têm sido utilizados para avaliar essa característica. O método de implantação em tecido conjuntivo de ratos, escolhido para este estudo, é amplamente utilizado como teste secundário para avaliação dessa propriedade (MORI et al., 2014; DA FONSECA et al., 2016; MARCIANO et al., 2016).

O rato foi escolhido como modelo animal para a realização da pesquisa devido às semelhanças genômicas entre esse e o humano (KOLA, 2004) e ao acelerado metabolismo desses animais para que se obtivessem resultados rápidos. Além disso, o teste em ratos é uma forma econômica de verificar a compatibilidade biológica de cimentos endodônticos (MITTAL; CHANDRA; CHANDRA, 1995).

Neste trabalho foram utilizados ratos da mesma linhagem (*Wistar*) para padronização do tecido biológico. Foram selecionados ratos machos, devido às variações hormonais das fêmeas, o que poderia influenciar nos resultados (MIDENA, 2011). Cabe ressaltar que todos os animais possuíam 4 semanas de idade, ocorrendo, dessa forma, a uniformidade na velocidade da resposta metabólica dos animais, possibilitando posterior comparação.

Para este estudo foi escolhido o tubo de polietileno como forma de armazenamento dos materiais devido à característica biocompatível desse material e possibilidade de padronização do comprimento e diâmetro do mesmo (TORNECK, 1966).

Outro fator importante é a manutenção das extremidades dos tubos abertas, dessa forma, diminui-se a possibilidade de perda das amostras caso uma das extremidades ficasse comprometida. Outra vantagem é a facilidade de inserção dos

materiais nos tubos, evitando-se bolhas. Como desvantagem dessa dupla abertura é o possível extravasamento de material no momento da inserção, influenciando diretamente no contato do material com o tecido. A cuidadosa manipulação e inserção dos materiais bem como a implantação dos tubos nas lojas cirúrgicas diminuiu esse risco (SÓ, 2005).

Para que se pudesse ter uma visão geral do processo inflamatório gerado pelos materiais, decidiu-se avaliar o infiltrado celular como um todo, classificando-o de acordo com o grau de severidade como proposto por Figueiredo et al em 2001. Além disso, observou-se a presença e a intensidade de cada um dos principais componentes do processo inflamatório: neutrófilos, linfócitos/plasmócitos, células gigantes, eosinófilos, macrófagos e abscesso. Verificou-se também a presença e o grau de espessura da condensação fibrosa

Através da análise temporal (7, 30 e 90 dias) do processo inflamatório e mecanismo de reparo, pode-se avaliar a evolução da resposta tecidual ao longo dos períodos experimentais, classificando-a quanto ao grau de severidade e definindo, dessa forma, a compatibilidade biológica dos materiais testados.

6.2 Análise dos resultados

Sabe-se que até mesmo materiais reparadores utilizados em Endodontia promovem algum grau de resposta inflamatória, porém, essa resposta deve ser clinicamente aceitável e restrita a curtos períodos de tempo. Pode-se observar que todos os materiais testados e o grupo controle obtiveram resultados mais expressivos em grau de severidade no que tange aos componentes inflamatórios linfócitos/plasmócitos e macrófagos, nos períodos de 7 e 30 dias. Esses tipos celulares são característicos da resposta inflamatória crônica, a qual caracteriza os períodos. Além disso, a presença de macrófagos demonstra a tentativa do organismo em eliminar o material estranho via fagocitose (COTRAN et al., 2004; PEREIRA, F, E, L, 2011; SIQUEIRA JR; RÔÇAS; LOPES, 2011).

Notou-se redução significativa da resposta inflamatória aos 90 dias, ao mesmo tempo em que os materiais apresentaram características de reparo tecidual, pois esta reação foi gradualmente substituída por capsula fibrosa constituída de feixes de fibra colágena e fibroblastos, caracterizando a compatibilidade biológica desses materiais. Resultados semelhantes podem ser observados em estudos

anteriores quando se avaliou o MTA e Biodentine (HOLLAND et al., 1999; VOSOUGHHSSEINI et al., 2008; GOMES FILHO et al., 2009; SCARPARO et al., 2010; SHAHI et al., 2010; MORI et al., 2014; DA FONSECA et al., 2016).

A ausência de eosinófilos, que estão relacionados de forma mais acentuada em reações de hipersensibilidade, e a ausência de abscesso demonstra que os materiais testados não foram agressivos a ponto de gerar maiores danos teciduais. (PEREIRA, F, E, L, 2011).

Apenas o MTA e Biodentine aos 7 dias apresentaram células gigantes, porém sem diferença estatística para os outros materiais. Após este período, essas células estavam ausentes. Este componente representa uma reação do tipo corpo estranho. Segundo Kunie (2004) e Andrade (2004), células gigantes caracterizam um material de difícil degradação pelo organismo.

Houve presença de neutrófilos apenas aos 7 dias, isso se deve por essas células serem características da fase aguda dos processos inflamatórios e estar em maior quantidade no sangue circulante e por apresentarem muitos receptores quimiotáticos (COTRAN et al., 2004; PEREIRA, F, E, L, 2011). Após este período, da mesma forma que as células gigantes, os neutrófilos estavam ausentes.

O predomínio de infiltrado inflamatório nos períodos iniciais pode ser explicado devido à liberação de íons cálcio por parte dos materiais à base de silicato de cálcio. A indução do aumento no pH durante a presa e, em adição ao calor liberado por essa reação, provocam o recrutamento das células inflamatórias, além da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (KOH et al., 2007; VOSOUGHHOSSEINI et al., 2008; SHAHI et al., 2010). Por outro lado, a liberação de íons cálcio e a alcalinidade do meio estimulam a formação de hidroxiapatita, liberação de fosfatase alcalina e proteína morfogenética óssea 2, importantes no processo de mineralização (GANDOLFI et al., 2014).

Apesar das características biológicas satisfatórias, algumas características físico-químicas do MTA são indesejáveis (TORABINEJAD et al., 1995; CAMILLERI, 2007; CAMILLERI, 2015a; CAMILLERI, 2007; COOMARASWAMY; LUMLEY; HOFMANN, 2007; CAMILLERI, 2008; TANOMARU-FILHO et al., 2012), o que levou ao desenvolvimento de outros materiais à base de silicato de cálcio. Um fator importante a ser observado e que gerou o objetivo do estudo é que os materiais reparadores de silicato de cálcio possuem diferentes componentes em sua fórmula

que podem interferir na resposta inflamatória do tecido. Exemplo disso está nos radiopacificadores dos 3 materiais testados.

O óxido de bismuto, presente no MTA Angelus, tem demonstrado redução na citocompatibilidade inicial do cimento e, além disso, interfere no crescimento celular (CAMILLERI et al., 2004; GANDOLFI et al., 2010). O NeoMTA Plus possui como agente radiopacificador o óxido de tântalo, este componente quando injetado em cêndilo de coelho juntamente com um cimento utilizado em implantes odontológicos foi considerado biocompatível por não interferir na reparação óssea (HOEKSTRA et al., 2014). O material Biodentine apresenta o óxido de zircônia como radiopacificador. Esse agente tem demonstrado possuir baixa citotoxicidade quando testado em fibroblastos, podendo ser considerado citocompatível segundo (SLOMPO et al., 2015; SILVA et al., 2014) avaliaram em conjuntivo de ratos a resposta inflamatória de um cimento à base de silicato de cálcio associado ao óxido de bismuto ou de zircônia e verificaram que o óxido de zircônia apresentou melhores resultados. Neste estudo não encontramos diferença entre os materiais estudados.

Apesar de não apresentar diferença estatística, o Biodentine apresentou para todos os componentes inflamatórios o resultado menos favorável, principalmente no período de 7 dias, o que também foi observado em outras pesquisas (MORI et al., 2014; DA FONSECA et al., 2016). O cloreto de cálcio, presente no líquido do Biodentine para reduzir o tempo de presa, segundo Kang et al (2013), reduz a viabilidade e ligação celular em comparação com o MTA puro. Outro componente presente no líquido desse material, o polímero hidrossolúvel à base de carboxilato, foi capaz de induzir reação inflamatória leve na polpa dental, porém foi gradualmente substituída por tecido sadio (HILL, 2007). O carbonato de cálcio, presente no pó do Biodentine, pode ser considerado responsável pelo alto pH (GRECH; MALLIA; CAMILLERI, 2013) e conseqüentemente o recrutamento de células inflamatórias. (HAN & OKIJI, 2013).

As partículas mais finas do MTAPlus, que tem basicamente a mesma formulação que o NeoMTA Plus, tem mostrado características como formação de minerais mais acentuada que o ProRoot MTA (GANDOLFI et al., 2014). Apesar de não ter diferença estatística, o NeoMTA Plus foi que apresentou resultados mais próximos ao grupo controle, e esta resposta pode também estar associada ao tamanho das partículas.

Um material é considerado biocompatível quando a resposta inflamatória induzida por ele ao tecido se torna insignificante ao longo do tempo (SILVEIRA et al., 2011). Considerando esta assertiva, os materiais testados no estudo podem ser considerados biocompatíveis.

7 CONCLUSÕES

Não houve diferença estatística significativa quando se avaliou o NeoMTA Plus comparado ao MTA e Biodentine no mesmo período experimental para todos os eventos inflamatórios. Houve redução significativa da resposta inflamatória aos 90 dias, ao mesmo tempo em que os materiais apresentaram características de reparo tecidual, pois esta reação foi gradualmente substituída por cápsula fibrosa constituída de feixes de fibra colágena e fibroblastos, caracterizando a compatibilidade biológica desses materiais.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Z. A. Tecido conjuntivo: reparo, regeneração e cicatrização. In: MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**. 4 ed. São Paulo: Atheneu. 2004. Cap.8, p.135-151.

ATTIK, G, N.; VILLAT, C.; HALLAY, F.; PRADELLE-PLASSE, N.; BONNET, H.; MOREAU, K.; COLON, P.; GROSGOGEAT, B. In vitro biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine versus MTA. **International Endodontic Journal**, v.47, p.1133-1141, 2014.

BIN, C. V.; VALERA, M. C.; CAMARGO, S. E. A.; RABELO, S. B.; SILVA, G. O.; BALDUCCI, I.; CAMARGO, C. H. R. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v.38, n.4, p.498-495, 2012.

CAMILLERI, J.; CUTTAJAR, A.; MALLIA, B. Hydration characteristics of zirconium oxide replaced Portland cement for use as a root-end filling material. **Dental Materials**, v.27, p.845–854, 2011

CAMILLERI, J.; FORMOSA, L.; DAMIDOT, D. The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. **International Endodontic Journal**, v.46, n.9, p.831-840, 2013.

CAMILLERI, J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. **International Endodontic Journal**, v.40, p.462-470, 2007.

CAMILLERI, J.; KRALJ, P.; VEBER, M.; SINAGRA, E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. **International Endodontic Journal**, v.4, n.8, p.737-743, 2012.

CAMILLERI, J. Mineral trioxide aggregate: present and future developments. **Endodontic Topics**, v.32, p.31-46, 2015a.

CAMILLERI, J.; MONTESIN F. E.; PAPAIOANNOU, S.; MCDONALD, F.; FORD T. R. P. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. **International Endodontic Journal**, v.37, p.699–704, 2004.

CAMILLERI, J. Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine used for pulpotomy procedures. **Journal of Endodontics**, v.41, n.7, p.1139-1145, 2015b.

CAMILLERI, J.; SORRENTINO, F.; DAMIDOT, D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. **Dental Materials**, v.29, p.580-593, 2013.

CAMILLERI, J. The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. **International Endodontic Journal**, v.41, p.151-157, 2008.

COOMARASWAMY, K.S.; LUMLEY, P. J.; HOFMANN, M. P. Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. **Journal of Endodontics**, v.33, n.3, p.295-298, 2007

COSTA, C. A. S; SOUZA, P. P. C. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: ESTRELA, C. **Metodologia Científica**. São Paulo: Artes Médicas, 2005. Cap.11, p.211-230.

COSTA, C. A. S; HEBLING, J; SOUZA, P. P. C. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: ESTRELA, C. **Metodologia Científica**. São Paulo: Artes Médicas, 2005. Cap.12, p.231-271.

COTRAN, R, S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. ROBBINS. **Pathologic basis of disease**. v.7. Philadelphia: Saunders, 2004.

CUTAJAR, A.; MALLIA, B.; ABELA, S.; CAMILLERI, J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. **Dental Materials**, v.27, p.879-891, 2011.

DA FONSECA, T. S.; DA SILVA, G. F.; TANOMARU-FILHO, M.; SASSO-CERRI, E.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; Cerri, P. S. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. **International Endodontic Journal**, v.49, p.145-153, 2016.

DE-DEUS, G.; CANABARRO, A.; ALVES, G.; LINHARES, A.; SENNE, M. I.; GRANJEIRO, J. M. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. **Journal of Endodontics**, v.35, n.10, p.1387-1390, 2009.

DUARTE, M. A.; DEMARCHI, A. C.; YAMASHITA, J. C.; KUGA, M. C.; FRAGA SDE, C. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. **Oral Surgery, Oral**

Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, v.95, n.3, p.345-347, 2003.

DUBOK, V. A. Bioceramics: yesterday, today, tomorrow. **Powder metallurgy and metal ceramics**, v.39, n.7-8, p.381-94, 2000.

EID, A. A.; GOSIER, J. L.; PRIMUS, C. M.; HAMMOND, B. D.; SUSIN, L. F.; PASHLEY, D. G.; TAY, F. R. In vitro biocompatibility and oxidative stress profiles of different hydraulic calcium silicate cements. **Journal of Endodontics**, v.40, n.2, p.255-260, 2014.

FIGUEIREDO, J. A. P.; PESCE, H. F.; GIOSO, M. A.; FIGUEIREDO, M. A. Z. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. **International Endodontic Journal**, v.34, n.5, p.377-385, 2001.

FUNTEAS, U. R.; WALLACE, J. A.; FOCHTMAN, F. W. A Comparative analysis of Mineral Trioxide Aggregate and Portland Cement. **Australian Endodontic Journal**, v.29, n.1, p.43-44, 2003.

GANDOLFI, M. G.; CIAPETTI, G.; TADDEI, P.; PERUT, F.; TINTI, A.; CARDOSO, M. V.; MEERBEEK, B. V.; PRATI, C. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. **Dental Materials**, v.26, n.10, p.974-992, 2010.

GANDOLFI, M. G.; SIBONI, F.; PRIMUS, C. M.; PRATI, C. Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate. **Journal of Endodontics**, v.40, n.10, p.1632-1637, 2014.

GOMES-FILHO, J. E.; FARIA, M. D.; BERNABÉ, P. F. E.; NERY, M. J.; OTOBONI-FILHO, J. A.; DEZAN-JÚNIOR, E.; COSTA, M. M. T. M.; CANNON, C. Mineral trioxide aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. **Journal of Endodontics**, v.34, n.1, p.62-65, 2008.

GOMES-FILHO, J. E.; WATANABE, S.; BERNABÉ, P. F. E.; COSTA, M. T. M. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. **Journal of Endodontics**, v.35, n.2, p.256-260, 2009.

GOVINDARAJU, L.; NEELAKANTAN, P.; GUTMANN, J. L. Effect of root canal irrigating solutions on the compressive strength of tricalcium silicate cements. **Clinical Oral Investigations**, 2016. Epub ahead of print.

GRECCA, F. S.; KOPPER, P. M.; SANTOS, R. B.; FOSSATI, A. C.; CARRARD, V. C.; ACASIGUA, G. A.; FIGUEIREDO, J. A. Biocompatibility of RealSeal, its primer and AH Plus implanted in subcutaneous connective tissue of rats. **Journal of Applied Oral Science**, v.19, n.1, p.52-56, 2011.

GRECH, L.; MALLIA, B.; CAMILLERI, J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. **Dental Materials**, v.29, n.2, p.e20-e28, 2013.

HAN, L.; OKIJI, T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. **International Endodontic Journal**, v.44, n.12, p.1081-1087, 2011.

HAN, L.; OKIJI, T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. **International Endodontic Journal**, v.46, n.9, p.808-814, 2013.

HAUMAN, C. H.; LOVE, R. M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. **International Endodontic Journal**, v.36, n.3, p.147-160, 2003.

HILL, E, E. Dental cements for definitive luting: a review and practical clinical considerations. **The Dental Clinics of North America**, v.51, p.643-658, 2007.

HOEKSTRA, J, W, M; BEUCKEN, J, J, J, P.; LEEUWENBURGH, S, C, G.; BRONKHORST, E, M.; MEIJER, G, J.; JANSEN, J, A. Tantalum oxide and barium sulfate as radiopacifiers in injectable calcium phosphate-poly(lactic-co-glycolic acid) cements for monitoring in vivo degradation. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.102A, p.141–149, 2014.

HOLLAND, R.; SOUZA, V.; NERY, M. J.; FARACO JUNIOR, I. M.; BERNABE, P. F.; OTOBONI FILHO, J. A.;JR, E.D. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v.25, n.3, p.161-166, 1999.

HOLLAND, R.; SOUZA, V.; NERY, M. J; OTOBONI FILHO, J. A.; BERNABÉ P. F.; DEZAN JÚNIOR, E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. **Brazilian Dental Journal**, v.12, n.1, p.3-8, 2001.

HOLLAND, R.; SOUZA, V.; NERY, M, J.; BERNABÉ, P, F, E.; FILHO, J, A, O.; JUNIOR, E, D.; MURATA, S, S. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. **Journal of Endodontics**, v.28, n.3, p.173-176, 2002.

<http://www.angelus.ind.br/MTA-Angelus-10.html>, acessado em outubro, 2016

<http://avalonbiomed.com/neomta/>, acessado em outubro, 2016

<http://www.septodont.co.uk/sites/default/files/brochureBiodentineHDUK.pdf>.
Acessado em outubro, 2016.

KANG, J.; LEE, B.; SON, H.; KOH, J.; KANG, S.; SON, H.; CHANG, H.; HWANG, I.; HWANG, Y.; OH, W. Biocompatibility of mineral trioxide aggregate mixed with hydration accelerators. **Journal of Endodontics**, v.39, n.4, p.497-500, 2013.

KATEBZADEH, N.; DALTON, B, C.; TROPE, M. Strengthening immature teeth during and after apexification. **Journal of Endodontics**, v.24, n.4, p.256-259, 1998.

KOLA, I. Putting the rat on the map. **Nature Biotechnology**, v.22, n.5, p.529-531, 2004.

KUNIE, I, R, C. Granulomas. In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**. 4 ed. São Paulo: Atheneu. 2004. Cap.9, p.153-161.

LAURENT, P.; CAMPS, J.; DE MEO, M.; DEJOU, J.; ABOUT, I. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. **Dental Materials**, v.24, n.11, p.1486-1494, 2008.

LEE, S.; MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **Journal of Endodontics**, v.19, n.11, p.541-544, 1993.

LEE, H.; SHIN, Y.; KIM, S.; LEE, H.; CHOI, H.; SONG, J. S. Comparative study of pulpal responses to pulpotomy with ProRoot MTA, RetroMTA, and TheraCal in dogs' teeth. **Journal of Endodontics**, v.41, n.8, p.1318-1324, 2015.

LIU, S.; WANG, S.; DONG, Y. Evaluation of a Bioceramic as a Pulp Capping Agent In Vitro and In Vivo. **Journal of Endodontics**, v.41, n.5, p.652-657, 2015.

LUO, Z.; KOHLI, M. R.; YU, Q.; KIM, S.; QU, T.; HE, W. X. Biodentine induces human dental pulp stem cell differentiation through mitogen-activated protein kinase and calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II pathways. **Journal of Endodontics**, v.40, n.7, p.937-942, 2014.

LUO, Z.; LI, D.; KOHLI, M. R.; YU, Q.; KIM, S.; HE, W. X. Effect of Biodentine on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. **Journal of Dentistry**, v.42, n.4, p.490-497, 2014.

MAKKES, P. C.; VAN VELZEN, S. K.; WESSELINK, P. R.; DE GREEVE, P. C. Polyethylene tubes as a model for the root canal. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 44, p. 293-300, 1977.

MALKONDU, O.; KAZANDAG, M. K.; KAZAZOGLU, E. A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. **Biomed Research International**, 160951, 2014.

MARCIANO, M. A; GUIMARÃES, M. M; AMOROSO-SILVA, P; CAMILLERI, J; DUARTE, M. A. H. Physical and chemical properties and subcutaneous implantation of mineral trioxide aggregate mixed with propylene glycol. **Journal of Endodontics**, v.42, n.3, p.474-479, 2016.

MCMICHAEL, G. E.; PRIMUS, C. M.; OPPERMAN, L. A. Dentinal tubule penetration of tricalcium silicate sealers. **Journal of Endodontics**, v.42, n.4, p.632-636, 2016.

MENDONÇA, E. F.; ESTRELA, C. Reparo após o Tratamento Endodôntico. In: ESTRELA, C.; FIGUEIREDO, J. A. P. **Endodontia: Princípios Biológicos e Mecânicos**. São Paulo: Editora Artes Médicas, 2001; p. 295-314.

MIDENA, R, Z. Análise da reação de tecido subcutâneo de ratos à implantação de pastas de hidróxido de cálcio associadas a diferentes substâncias. 2011. 124f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo - Bauru.

MITTAL, M.; CHANDRA, S.; CHANDRA, S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. **Journal of Endodontics**, v.21, n.12, p.622-624, 1995.

MORI, G. G.; TEIXEIRA, L. M.; DE OLIVEIRA, D. L.; JACOMINI, L. M.; DA SILVA, S. R. Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. **Journal of Endodontics**, v.40, n.9, p.1485-1488, 2014.

NAIR, P.N.R.; DUNCAN, H.F.; PITT FORD, T.R.; LUDER, H.U. Histological , ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. **International Endodontic Journal**, v.42, p.422-444, 2009.

OKABE, T.; SAKAMOTO, M.; TAKEUCHI, H.; MATSUSHIMA, K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**. v.32, n.3, p.198-201, 2006.

OLSSON, B.; SLIWKOWSKI, A.; LANGELAND, K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. **Journal of Endodontics**, v.7, n.8, p.355-369, 1981.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a Comprehensive Literature Review part I: Chemical, Physical and Antibacterial properties. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 16-27, 2010a.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-Part III: Clinical applications,drawbacks, and mechanism of action. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 3, p. 400-413, 2010b.

PETERS, L, B.; WESSELINK, P, R.; BUIJS, J, F.; WINKELHOFF, V, A, J. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. **Journal of Endodontics** v.27, n.2, p.76-81, 2001.

PETERS, O, A. Editorial. **International Endodontic Journal**, v.46, p.195-197, 2013.

PÉRARD, M.; CLERC, J, L.; MEARY, F.; PÉREZ, F.; TRICOT-DOLEUX, S.; PELLEN-MUSSI, P. Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.24, p.1527-1534, 2013.

PEREIRA, F, E, L. Inflamações. In: BOGLIOLO et al. **Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap.7, p. 183-217.

PITTET, C.; LEMAITRE, J. Mechanical characterization of brushite cements: a Mohr circles' approach. **Journal of Bio-medical Materials Research**, v.53, p.769-780, 2000.

PRATI, C; GANDOLFI, M. G. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. **Dental Materials**, v.31, p.351-370, 2015.

RAHIMI, S.; MOKHTARI, H.; SHAHI, S.; KAZEMI, A.; ASGARY, S.; EGHBAL, M.; MESGARIABBASI, M.; MOHAJERI, D. Osseous reaction to implantation of two endodontic cements: Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium enriched mixture (CEM). **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.17, n.5, p.e907-e911, 2012.

SAFAVI, K, E.; PASCON, E, A.; LANGELAND, K. Evaluation of tissue reaction to endodontic materials. **Journal of Endodontics**, v.9, n.10, p.421-429, 1983.

RODRIGUES, E. M.; CORNÉLIO, A. L. G.; MESTIERI, L. B.; FUENTES, A. S. C.; SALLES, L. P.; ROSSA-JUNIOR, C.; FARIA, G.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; TANOMARU-FILHO, M. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. **International Endodontic Journal**, 2016.

SAGHIRI, M, A.; TANIDEH, N.; GARCIA-GODOY, F.; LOTFI, M.; KARAMIFAR, K.; AMANAT, D. Subcutaneous connective tissue reactions to various endodontic biomaterials: an animal study. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v.7, n.1, p.15-21, 2013.

SCARPARO, R, K. Análise da reação tecidual a cimentos endodônticos de óxido de zinco e eugenol, à base de resina epóxica e à base de resina metacrilato: estudo "*in vivo*". 2007. 123f. Dissertação (Mestrado - Endodontia). Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS - Porto Alegre.

SCARPARO, R. K.; Haddad, D.; ACASIGUA, G. A.; FOSSATI, A. C.; FACHIN, E. V.; GRECCA, F. S. Mineral trioxide aggregate-based sealer: analysis of tissue reactions to a new endodontic material. **Journal of Endodontics**, v.36, n.7, p.1174-1178, 2010.

SHAHI, S.; RAHIMI, S.; YAVARI, H, R.; MOKHTARI, H.; ROSHANGAR, L.; ABASI, M, M.; SATTARI, S.; ABDOLRAHIMI, M. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. **Journal of Endodontics**, v.36, n.5, p.899-903, 2010.

SCHRODER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp- capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. **Journal of Dental Research**, v.64, p.541-8, 1985

SILVA, G. F.; BOSSO, R.; FERINO, R. V.; TANOMARU-FILHO, M.; BERNARDI, M. I.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M.; CERRI, P. S. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: Evaluation of physicochemical and biological properties. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v.102, n.12, p.4336-4345, 2014.

SILVEIRA, C. M.; PINTO, S. C.; ZEDEBSKIRDE, A.; SANTOS, F. A.; PILATTI, G. L. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, n.1, p. 21-27, 2011.

SIQUEIRA JR., J, F.; RÔÇAS, I, N.; LOPES, H, P. Patologias Pulpar e Perirradicular. In: **Endodontia: biologia e técnica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. Cap. 2, p.21-82.

SLOMPO, C.; PERES-BUZALAF, C.; GASQUE, K, C, S.; DAMANTE, C, A.; ORDINOLA-ZAPATA, O.; DUARTE, M, A, H.; OLIVEIRA, R, C. Experimental calcium silicate-based cement with and without zirconium oxide modulates fibroblasts viability. **Brazilian Dental Journal**, v.26, n.6, p.587-591, 2015.

SÓ, M, V, R. PASTAS À BASE DE HIDRÓXIDO DE CÁLCIO – Avaliação da biocompatibilidade, pH e liberação de íons cálcio. 200. 107f. tese (Doutorado - Endodontia). - UFRGS - Porto Alegre. Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP- Araraquara

STANLEY, H. R. Pulp capping: conserving the dental pulp—can it be done? Is it worth it? **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v.68, n.5, p.628-639, 1989.

TANOMARU-FILHO, M.; MORALES, V.; SILVA, G. F.; BOSSO, R.; REIS, J. M. S. N.; DUARTE, M. A. H.; GUERREIRO-TANOMARU, J. M. Compressive strength and setting time of MTA and Portland cement associated with different radiopacifying agents. **International Scholarly Research Network Dentistry**, 2012.

TAY, F, R.; PASHLEY, D, H.; RUEGGERBERG, F, A.; LOUSHINE, R, J.; WELLER, R, N. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the Portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. **Journal of Endodontics**, v.33, n.11, p.1347-1351, 2007.

THOMPSON, S. W; HUNT, R. D. **Selected histochemical and histopathological methods**. Flórida: Charles C Thomas; 1966. p.615-46.

TORABINEJAD, M.; RASTEGAR, A. F.; KETTERING, J. D.; PITT-FORD, T. R. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. **Journal of Endodontics**, v.21, n.3, p.109-112, 1995.

TORNECK, C. D. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 21, n. 3, p.379-87, 1966.

TRAN, D.; HE, J.; GLICKMAN, G. N.; WOODMANSEY, K. F. Comparative analysis of calcium silicate-based root filling materials using an open apex model. **Journal of Endodontics**, v.42, n.4, p.654-658, 2016.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**; v.29, p.2941-2953, 2008

YALTIRIK, M.; OZBAS, H.; BILGIC, B.; ISSEVER, H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. **Journal of Endodontics**, v.30, n.2, p.95-99, 2004.

YESILSOY, C.; KOREN, L, Z.; MORSE, D, R.; M, A.; KOBAYASHI, C. A comparative tissue toxicity os established and newer root canal sealers. **Oral surgery Oral, Oral Medicine, Oral Pathology**, v.65, n.4, p.459-567, 1988.


ZMENER, O.; GUGLIELMOTTI, M. B.; CABRINI, R. L. Biocompatibility of two calcium hydroxide-based endodontic sealers: a quantitative study in the subcutaneous connective tissue of the rat. **Journal of Endodontics**, v.14, n.5, p.229-235, 1988.

ZHOU, H.; SHEN, Y.; WANG, Z.; LI, L.; ZHENG, Y.; HÄKKINEN, L.; HAAPASALO, M. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. **Journal of Endodontics**, v.39, n.4, p.478-483, 2013.

ANEXO A**Autorização da utilização do Laboratório de Biologia Bucal do Departamento de Ciências Morfológicas do ICBS****AUTORIZAÇÃO DO USO DE DEPENDÊNCIAS DO LABORATÓRIO**



Autorizo, pelo presente, que as dependências do Laboratório de Biologia Bucal do Departamento de Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS sejam utilizadas pelo pesquisador Lucas Siqueira Pinheiro com a finalidade de conduzir experimentos necessários ao projeto intitulado AVALIAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE DOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS BIODENTINE, MTA PLUS E ENDOFILL EM TECIDO CONJUNTIVO DE RATOS.

Porto Alegre, 09 de junho de 2015



Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

ANEXO B**Autorização da utilização do Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia**

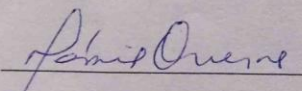
 

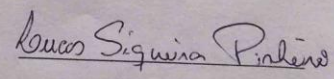
Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Faculdade de Odontologia - Universidade Federal do Rio Sul

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA BUCAL

Eu Lucas Siqueira Pinheiro vinculado ao Programa de Pós Graduação em Odontologia/Endodontia sob orientação Profa. Fabiana Soares Grecca solicito a confecção de 72 lâminas histológicas, coloração tipo HE pelo **Laboratório de Patologia Bucal** do NPBO do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para o projeto de Mestrado Título **AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS BIODENTINE, MTA PLUS E ENDOFILL EM TECIDO CONJUNTIVO DE RATOS**

Desde já me comprometo em informar, em qualquer forma de apresentação e /ou publicação a fonte deste material.


Márcia Oliveira
Professora - UFRGS
CRO-RS 8733


Lucas Siqueira Pinheiro

Porto Alegre, 09 de junho de 2015
