



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Tiago Silva da Fonseca



Araraquara
2014



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Tiago Silva da Fonseca

*Resposta tecidual induzida por
Biodentine™ e MTA Branco
em subcutâneo de ratos*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**

Co-orientadora: **Prof.^a Dr.^a Juliane Maria
Guerreiro Tanomaru**

Araraquara
2014

Fonseca, Tiago Silva da.

Resposta tecidual induzida por Biodentine™ e MTA Branco em subcutâneo de ratos / Tiago Silva da Fonseca – Araraquara: [s.n.], 2014.

93 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri

Co-Orientadora: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru

1. Endodontia 2. Materiais biocompatíveis 3. Testes de materiais
4. Imunoistoquímica 5. Colágeno 6. Fator 1 de crescimento de fibroblastos. 7. Mastócitos 8. Interleucina-6 I. Título

TIAGO SILVA DA FONSECA

**Resposta tecidual induzida por Biodentine™ e MTA Branco
em subcutâneo de ratos**

Comissão Julgadora

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

2º examinador: Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões

3º examinador: Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

Araraquara, 14 de março de 2014

Dados curriculares

Tiago Silva da Fonseca

Nascido a 31 de agosto de 1988 em Manaus – AM

Filiação José Anísio Vasconcelos da Fonseca
Ana Lucia da Silva Fonseca

2005-2010 Graduação em Odontologia
Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus

2008-2009 Monitoria na disciplina de Endodontia
Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus

2009-2010 Iniciação Científica na disciplina de Endodontia
Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus

2010-2012 Especialização em Endodontia
Universidade Paulista – UNIP, Manaus

2011 Estágio docente voluntário da disciplina de Endodontia
Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus

2012-2014 Mestrado em Odontologia, Área de concentração em Endodontia
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, Araraquara



SECTI
Secretaria de Estado de
Ciência, Tecnologia e Inovação
Certificada pela ISO 9001:2008



Este trabalho foi desenvolvido com o apoio do Governo do Estado do Amazonas por meio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, com a concessão de bolsa de estudo.

Dedicatória

Esta conquista é dedicada integral e especialmente ao meu amado pai, **JOSÉ ANISIO VASCONCELOS DA FONSECA**, e à minha amada mãe, **ANA LUCIA DA SILVA FONSECA**. Sem vocês, tenho certeza de que eu nada seria. Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão pelo apoio incondicional a cada ideia de minha mente obstinada. Nunca conseguirei agradecer o bastante toda a dedicação e todos os esforços demandados por ambos para que eu consiga alcançar meus objetivos, mesmo quando desafios homéricos são a vocês impostos para que eu possa realizar meus sonhos. Preciso pedir desculpas pela minha intransigente persistência em sair temporariamente de Manaus para obter o almejado título de Mestre. Sei o quanto vocês ficaram apreensivos por eu deixar tudo rumo a esta então desconhecida Araraquara. Simone de Beauvoir disse que “todas as vitórias ocultam uma abdicação”. Também sei o quanto sofreram pela minha ausência durante estes dois anos. Estejam certos de que não medirei esforços para retribuir cada segundo longe do seu abraço. Em vocês encontro a mais pura, sublime e completa forma de amor. O sorriso de satisfação com meu triunfo em seus rostos faz tudo valer a pena. Vocês são as minhas fontes de inspiração. Amo-os.

Às minhas avós, **MARIA DE LOURDES VALE E SILVA** e **JULIA VASCONCELOS DA FONSECA**. Mulheres guerreiras as quais, mesmo na ausência de seus respectivos esposos **LÁZARO PINTO DA SILVA** (*in memoriam*) e **DIOMAR HERMES DA FONSECA** (*in memoriam*), tiveram firmeza, força, fibra, garra e determinação para criar e educar todos os seus filhos, netos e bisnetos. Muito obrigado por fazerem parte de quem sou.

Às minhas irmãs, **ROSANA VALE DA SILVA** e **MICHELLE BIANCA VASCONCELOS DA FONSECA**. Muito obrigado pelo carinho fraterno, pelas palavras de apoio e incentivo, por torcerem por mim e comemorarem comigo cada conquista e, principalmente, por se orgulharem de cada objetivo alcançado. Vocês são muito especiais para mim.

Ao meu sobrinho, **VINICIUS VALE UCHOA DE PAULA**. Meu melhor amigo, meu “irmão mais novo”, meu Mestre em jogos eletrônicos. A cada retorno a Manaus, minha maior alegria é ver a sua exultante e radiante felicidade no aeroporto. Ambigualmente, minha maior consternação é ver suas tristes lágrimas decorrentes de cada uma das minhas partidas. Peço desculpas por me ausentar do seu convívio nestes dois anos. Saiba que me sinto honrado e orgulhoso por servir de exemplo para você e por vê-lo se desenvolvendo tão rápido. Conte sempre comigo, meu amigo.

Agradecimentos especiais

Ao meu estimado orientador, Prof. Dr. **PAULO SÉRGIO CERRI**. Orgulho-me por ter convivido durante estes dois anos de Mestrado com um exemplo de profissional, pesquisador, professor e, principalmente, ser humano. Muito obrigado pela amizade sincera, pelas preciosas lições de Histologia, pelo primoroso perfeccionismo, por me acolher como orientado, pela valiosa atenção, especialmente após os horários convencionais, e por sempre me ajudar a transpor minhas dificuldades. Parafraseando Platão, “a orientação inicial que alguém recebe da educação também marca a sua conduta ulterior”. Tenha a certeza de que levarei seus ensinamentos para minha vida profissional, como docente e pesquisador, e os transmitirei aos meus vindouros discentes.

À minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a **JULIANE MARIA GUERREIRO TANOMARU**, pela disponibilidade e presteza em ouvir e prontamente solucionar minhas dúvidas, pelo inestimável auxílio durante a fase experimental desta Dissertação, pela amizade e pela confiança em mim depositada. Este trabalho seria mais árduo sem sua imponderável colaboração.

Ao Prof. Dr. **MARIO TANOMARU FILHO**, pela confiança em mim depositada desde o início da Pós-Graduação, pela amizade, pela constante atenção dispensada, por ter me direcionado à Endodontia biológica, pela colaboração no desenvolvimento deste projeto e por me ajudar a concretizar o ideal de integrar a Endodontia da UNESP de Araraquara.

À Prof.^a Dr.^a **ESTELA SASSO CERRI**, pela amizade e agradável convivência diária, pela visão de Biologia além da Odontologia, pelas sugestões no decorrer da fase de análises de resultados e por gentilmente abrir as portas dos Laboratórios de Histologia e Embriologia e de Imuno-Histoquímica, concedendo insumos para as reações efetuadas.

Ao Dr. **GUILHERME FERREIRA DA SILVA**, pela amizade franca, pela acolhida na Pós-Graduação, pela colaboração em cada fase deste trabalho, por estar sempre disposto a atender quaisquer questionamentos, pelo apoio e companheirismo necessários a quem transita entre a Endodontia e a Histologia e pela disponibilidade no desenvolvimento desta Dissertação.

Agradecimentos

À **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**, UNESP, nas pessoas do Magnífico Reitor Prof. Dr. **JULIO CEZAR DURIGAN**, da Vice-Reitora Prof.^a Dr.^a **MARILZA VIEIRA CUNHA RUDGE**, do Pró-Reitor de Pós-Graduação Prof. Dr. **EDUARDO KOKUBUN**, e da Pró-Reitora de Pesquisa Prof.^a Dr.^a **MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI** pela valorização da pesquisa como instrumento de desenvolvimento do País e por oportunizá-la a todos os brasileiros.

À **FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**, FOAr, nas pessoas da Diretora Prof.^a Dr.^a **ANDRÉIA AFFONSO BARRETTO MONTANDON** e da Vice-Diretora Prof.^a Dr.^a **ELAINE MARIA SGAVIOLI MASSUCATO**, pela infraestrutura disponibilizada para a busca e produção de conhecimento.

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**, FOAr/UNESP, nas pessoas do Coordenador Prof. Dr. **CARLOS ROSSA JUNIOR** e do Vice-Coordenador Prof. Dr. **JONI AUGUSTO CIRELLI**, pela possibilidade de que uma formação acadêmica de excelência seja laureada.

Aos Professores da **DISCIPLINA DE ENDODONTIA** desta Faculdade, Prof. Dr. **FABIO LUIZ CAMARGO VILELLA BERBERT**, Prof.^a Dr.^a **GISELE FARIA**, Prof. Dr. **IDOMEIO BONETTI FILHO**, Prof.^a Dr.^a **JULIANE MARIA GUERREIRO TANOMARU**, Prof. Dr. **MÁRIO TANOMARU FILHO**, Prof. Dr. **MILTON CARLOS KUGA** e Prof. Dr. **RENATO DE TOLEDO LEONARDO**, pelos conhecimentos transferidos e pela respeitosa acolhida neste grupo internacionalmente renomado e reconhecido, o qual tão bem recebe seus estudantes.

Aos funcionários da Seção Técnica de Pós-Graduação, **MARA CANDIDA MUNHOZ DO AMARAL**, **JOSÉ ALEXANDRE GARCIA** e **CRISTIANO AFONSO**

LAMOUNIER, por sempre estarem com um cortês sorriso no rosto e solicitamente dispostos a elucidar quaisquer incertezas e dúvidas.

Aos funcionários do **DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA**, na pessoa da Secretária **CREUSA MARIA HORTENCI**, e do **DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**, na pessoa da Secretária **MARGARETE BUENO DE MORAES**, pelo auxílio sempre oportuno para sanar quaisquer adversidades ou obstáculos.

Aos técnicos **PEDRO SÉRGIO SIMÕES** e **LUIS ANTONIO POTENZA**, sempre dispostos a ajudar durante a rotina de laboratório, pelos valorosos predicados técnicos, por todos os ensinamentos laboratoriais e pela relevante colaboração durante o processamento histológico.

Ao técnico **ADRIANO PALOMINO DE OLIVEIRA**, responsável pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara, pelas fundamentais instruções relativas à abordagem e ao manejo dos animais na fase experimental.

À equipe de funcionários da **BIBLIOTECA** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de sua Diretora Técnica **CERES MARIA CARVALHO GALVÃO DE FREITAS**, pelas revisões no intuito de sanar eventuais equívocos no texto final e pelo auxílio durante as consultas bibliográficas.

À **FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO AMAZONAS**, FAPEAM, pela concessão de auxílio financeiro em forma de bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. **ANDRÉ AUGUSTO FRANCO MARQUES**, Vice-Coordenador do Curso de Graduação em Odontologia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Meu dileto amigo e primeiro orientador, responsável por me apresentar à Endodontia. Seu veemente entusiasmo no ensino desta Arte foi fundamental em minha predileção profissional e em meus primeiros passos científicos.

Aos colegas da Turma de Mestrado em Endodontia, **ADINAE TRINDADE JUNIOR**, **ANA CAROLINA VENÇÃO**, **CAMILA GALLETI ESPIR**, **FERNANDO ANTONIO VAZQUEZ GARCIA**, **KÁTIA CRISTINA KEINE**, **LETÍCIA BOLDRIN MESTIERI** e **MIRIAM GRAZIELE MAGRO**, e a todos os demais colegas da Pós-Graduação em Endodontia, pelo companheirismo, pela prestatividade em ajudar e pela mútua contribuição desde os primeiros seminários.

Aos colegas do **LABORATÓRIO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA**, Prof. Dr. **BRENO HENRIQUE CANEQUIM**, Pós-Doutorando **GUILHERME FERREIRA DA SILVA**, Pós-Graduandos **FLÁVIA LUCIANA BELTRAME**, **GISELA RODRIGUES DA SILVA SASSO**, **JOSÉ PAULO DE PIZZOL JUNIOR**, **JULIANA DAMIELI NASCIMENTO**, **JULIANA FELTRIN DE SOUZA**, **PRISCILA APARECIDA DE OLIVEIRA** e **RINALDO FLORENCIO DA SILVA**, e estagiários do curso de Odontologia, **LUCIANA GUILHERME NAVARRO** e **MATHEUS TAVARES ROSA**, e do curso de Farmácia-Bioquímica, **ANDRESSA BAGGIO**, **FABIANE DE SANTI**, **TALITA BONATO DE ALMEIDA** e **THAÍS FLORIANO MARCELINO**, pelo harmonioso convívio e pela disponibilidade e cortesia em colaborar sempre que necessário.

Aos amigos **MIRIAM GRAZIELE MAGRO** e **VINÍCIUS DE PAIVA GONÇALVES**, por terem se tornado minha família em Araraquara. Obrigado pela amizade, convivência, união, companheirismo, preocupação e por terem me proporcionado momentos tão agradáveis e felizes. Juntos nós rimos, choramos, comemoramos, discutimos, nos alegamos, nos apoiamos. Acima de tudo, o tempo que passamos juntos será inesquecível.

Aos amigos **ADRIANA ALICIA CABRERA ORTEGA** e **FERNANDO ANTONIO VAZQUEZ GARCIA**, meus amigos mexicanos os quais, por também estarem geograficamente impedidos de retornar para casa a cada final de semana, fizeram a minha vida em Araraquara mais divertida. *Los extrañaré cuando se vayan.*

Aos amigos **ANA CAROLINA VENÇÃO, CÁSSIO ROCHA SCARDUELI, LIVIA ALVES CORRÊA MORETTI, LUCAS HUDARI CORBI e VINICIUS IBIAPINA MASCARENHAS**, por todos os bons momentos de alegria e descontração.

Às amigas **ERIKA CAROLINE JUCÁ DE OLIVEIRA, MAIRA DE SOUZA CARVALHO e MÁRCIA VALÉRIA DE ABTIBOL NOGUEIRA**, a qual também trilhou junto comigo o curso de graduação em Odontologia, pela amizade pura e verdadeira e pela alegria em me receber quando visito Manaus.

Aos colegas da **IX TURMA DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA** da Universidade do Estado do Amazonas, por todas as boas lembranças partilhadas durante o tempo de faculdade.

Aos professores do **GRUPO DE ENDODONTIA DE MANAUS** e aos colegas da **III TURMA DO CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ENDODONTIA** da Universidade Paulista, por toda a troca de conhecimentos e experiências, pelos sábados exaustivos mas recompensadores e por todos os momentos os quais passamos juntos.

À minha calorosa, coesa, animada, singular, amorosa, excêntrica e espirituosa **FAMÍLIA**, tios e primos os quais me abstenho de citar individualmente para não incorrer na deselegância de esquecer alguém. Obrigado por encorajarem-me a romper as fronteiras, pela estrutura familiar, pelo apoio moral e pelos regabofes em todas as tradicionais reuniões. Cada um de vocês é muito importante para mim.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, prestaram sua contribuição para que eu me sinta em casa em Araraquara e também aos que ajudaram em cada etapa da construção desta Dissertação.

Muito obrigado a cada um!

A revolta de Atlas (1957)

Volume III, capítulo 7 – “Quem está falando é John Galt”, p. 394 (Sextante, 2010)

“Em nome do que há de melhor em vocês, não sacrifiquem este mundo àqueles que são o que há de pior nele. Em nome dos valores que os mantêm vivos, não deixem que sua visão do homem seja distorcida pelo que há de feio, covarde, irracional naqueles que jamais chegaram a merecer o título de homens. Não esqueçam que o que caracteriza o homem é a postura ereta, a mente intransigente, a capacidade de percorrer estradas infinitas. Não deixem que se apague o seu fogo insubstituível, fagulha por fagulha, nos pântanos do desespero do ‘mais ou menos’, do ‘não é bem isso’, do ‘ainda não’, do ‘de jeito nenhum’. Não deixem morrer o herói que vive em suas almas, solitário e frustrado por nunca ter conseguido atingir a vida merecida. Examinem sua estrada e a natureza da sua luta. O mundo que vocês desejavam pode ser conquistado: ele existe, é real, é possível, é seu.”

Ayn Rand, 1905-1982

(Nascida Alisa Zinov'yevna Rosenbaum)
Filósofa russa naturalizada norte-americana

Fonseca TS. Resposta tecidual induzida por Biodentine™ e MTA Branco em subcutâneo de ratos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

Resumo

Biodentine™ é um biomaterial à base de silicato de cálcio produzido, segundo o fabricante, com o intuito de apresentar propriedades físico-químicas e biológicas superiores ao MTA. Nosso objetivo foi avaliar a resposta tecidual promovida por Biodentine™ (BDT) e MTA Angelus Branco em subcutâneo de ratos. Foram utilizados ratos adultos distribuídos em 3 grupos (n=20/grupo), segundo o material preenchendo os tubos de polietileno implantados no subcutâneo: BDT, MTA e GC (controle, tubos vazios). Após 7, 15, 30 e 60 dias, os implantes e os tecidos adjacentes foram processados para parafina. Cortes longitudinais das cápsulas adjacentes aos implantes foram corados com H&E, tricrômico de Masson, Picrosirius e submetidos ao Alcian Blue (AB) e reações imuno-histoquímicas para IL-6 e FGF-1. Obteve-se a densidade numérica de células inflamatórias (CI), de células imunomarcadas para IL-6 e FGF-1 e de mastócitos AB-positivos, além da porcentagem de colágeno birrefringente. Os dados foram submetidos à ANOVA e teste Tukey ($p \leq 0,05$). O número de CI e de células imunomarcadas para IL-6 e FGF-1 foi significativamente maior aos 7 dias em todos os grupos. Diferenças significantes no número de células IL-6-positivas não foram observadas entre BDT e MTA aos 30 e 60 dias; aos 60 dias, diferenças significantes no número de CI também não foram detectadas. O número de células FGF-1-positivas foi significativamente maior no grupo BDT em comparação ao grupo MTA, em todos os períodos. A densidade numérica de mastócitos e a porcentagem de colágeno aumentaram significativamente ao longo do tempo. Aos 60 dias, o número de mastócitos e o conteúdo de colágeno foram significativamente maiores nos grupos BDT e MTA, respectivamente. A redução significativa do processo inflamatório, concomitante à redução na imunoexpressão para IL-6, indica que ambos os materiais são biocompatíveis. A acentuada imunoexpressão de FGF-1 aos 7 dias sugere que este fator deve ser responsável, pelo menos em parte, pela proliferação de fibroblastos e, conseqüentemente, estimula a formação de colágeno nas cápsulas. Os mastócitos devem ter um papel importante na remodelação das cápsulas, pois uma forte correlação foi detectada entre o aumento significativo de mastócitos e de colágeno.

Palavras-chave: Endodontia, Materiais biocompatíveis, Teste de materiais, Imuno-histoquímica, Interleucina-6, Fator 1 de crescimento de fibroblastos, Mastócitos, Colágeno

Fonseca TS. Tissue reaction induced by Biodentine™ and White MTA in rat subcutaneous [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2014.

Abstract

Biodentine™ is a new calcium silicate-based biomaterial which presents improved physicochemical and biological properties compared to MTA. The aim of this study was to evaluate the tissue reaction promoted by Biodentine™ (BDT) and MTA Angelus White in rat subcutaneous. Adult rats were distributed into 3 groups (n=20/group) according to the implanted materials: BDT, MTA or CG (Control group; empty tubes). After 7, 15, 30 and 60 days, the implants and adjacent tissues were fixed and embedded in paraffin. Longitudinal sections of the capsule adjacent to implants were stained with H&E, Masson's trichrome, Picrosirius and submitted to Alcian Blue (AB). Immunohistochemical reactions for IL-6 and FGF-1 were also performed. The number of inflammatory cells (IC), IL-6 and FGF-1 immunolabeled cells, AB-positive mast cells as well as birefringent collagen percentage were obtained. Data were statistically analyzed by ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). The number of IC and IL-6 and FGF-1 immunolabeled cells were significantly high at 7 days in all groups. At 30 and 60 days, significant differences in the number of IL-6-positive cells were not detected between BDT and MTA. At 60 days, statistical difference in the IC number was not observed between BDT and MTA groups. In all periods, the number of FGF-1-positive cells was significant higher in BDT group in comparison to MTA. The numerical density of mast cells and collagen percentage increased over time. At 60 days, mast cells number and collagen content were significantly high in BDT and MTA groups, respectively. A significant reduction of inflammatory process and IL-6 immunoexpression indicates that both materials are biocompatible. Intense FGF-1 immunoexpression at 7 days suggests that this factor may be responsible, at least in part, for fibroblast proliferation and subsequent collagen formation in the capsules. Since a strong correlation between mast cells number and collagen density was detected, it is conceivable to suggest that mast cells play a pivotal role in the capsules remodeling.

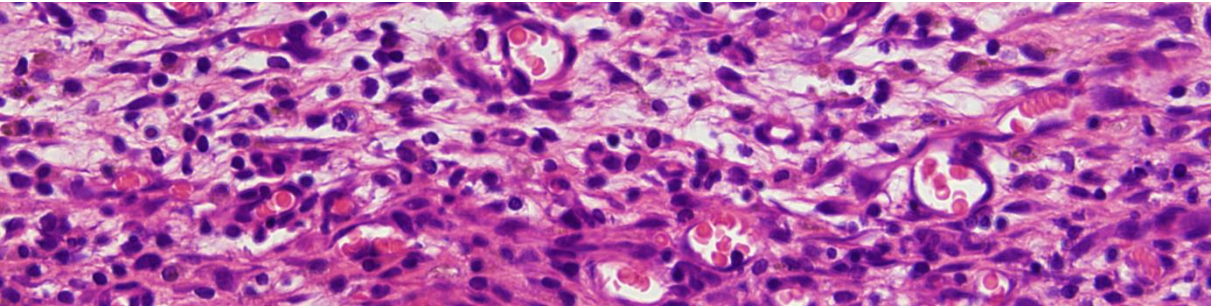
Keywords: Endodontics, Biocompatible materials, Materials testing, Immunohistochemistry, Interleukin-6, Fibroblast growth factor 1, Mast cells, Collagen

Sumário

1 Introdução	18
2 Proposição	27
3 Capítulo 1	29
3.1 Abstract	30
3.2 Introduction.....	31
3.3 Materials and methods	32
3.3.1 Experimental procedures.....	32
3.3.2 Histological procedures	33
3.3.3 Numerical density of inflammatory cells	34
3.3.4 IL-6 immunohistochemistry.....	34
3.3.5 Statistical analysis	35
3.4 Results	36
3.4.1 Morphological findings and numerical density of inflammatory cells	36
3.4.2 IL-6 immunohistochemistry.....	39
3.5 Discussion	42
3.6 Acknowledgments	45
3.7 References	45
4 Capítulo 2	50
4.1 Resumo	51
4.2 Introdução	52
4.3 Material e método.....	54
4.3.1 Animais.....	54

4.3.2 Procedimentos cirúrgicos	54
4.3.3 Processamento histológico.....	55
4.3.4 Análise morfológica dos implantes	56
4.3.5 Reação imuno-histoquímica para detecção de FGF-1	56
4.3.6 Densidade numérica de mastócitos Alcian Blue-positivos nas cápsulas/mm ² ..	57
4.3.7 Mensuração do colágeno birrefringente	58
4.3.8 Análise estatística	59
4.4 Resultado	60
4.4.1 Análise morfológica	60
4.4.2 Densidade numérica de células imunomarcadas para FGF-1.....	63
4.4.3 Densidade numérica de mastócitos	65
4.4.4 Mensuração do colágeno birrefringente	67
4.4.5 Análises de correlação	69
4.5 Discussão.....	71
4.6 Agradecimentos	74
4.7 Referências	75
5 Conclusão	80
Referências	82
Anexo	91

1 Introdução



Cimentos reparadores à base de silicato de cálcio têm sido considerados de escolha tanto para o selamento de defeitos de dentina e de comunicações entre a cavidade pulpar e a superfície externa do dente quanto para retrobturação em cirurgias parendodônticas⁴¹. Um exemplo deste grupo de materiais é o Mineral Trióxido Agregado (MTA, do inglês *Mineral Trioxide Aggregate*), pioneiramente proposto para o selamento de perfurações radiculares laterais³⁰.

O MTA Angelus Branco (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil) é um pó branco constituído de partículas hidrófilas, composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, dióxido de silício, óxido de alumínio e óxido de bismuto^{9,11}. Quimicamente, é semelhante ao cimento Portland, exceto pela adição de óxido de bismuto como radiopacificador²⁶. O MTA é, atualmente, o material mais indicado para diferentes situações clínicas, como proteções pulpares indiretas e diretas, selamento de comunicações entre a cavidade pulpar e os tecidos periodontais tais como perfurações radiculares e de furca, reabsorções internas e externas, apicificação e para retrobturação em cirurgias parendodônticas^{39,41}, pois apresenta adequadas propriedades biológicas^{24,44,48,51,55,61}, baixa citotoxicidade⁶⁶ e boas propriedades físicas, químicas e mecânicas³⁸.

As boas propriedades do MTA têm estimulado estudos com formulações experimentais na tentativa de tornar possível que este material seja utilizado também como um cimento obturador de canais radiculares. Assim, modificações em seus componentes têm proporcionado maior fluidez e, conseqüentemente, facilidade em sua inserção nos canais radiculares, o que poderia possibilitar o uso deste material como cimento endodôntico obturador^{34,61}.

Quando o MTA é hidratado, as partículas de silicato de cálcio convertem-se em um gel coloidal que se cristaliza, resultando na favorável ação seladora do material^{3,6,12,44}. O cálcio excedente da hidrólise do silicato de cálcio precipita-se na forma de hidróxido de cálcio, o que justifica o pH alcalino do MTA, de aproximadamente 8,6 após 24h, 8,1 após 7 dias e 7,8 após 28 dias⁵⁴. Granulações birrefringentes sob luz polarizada ficam dispersas pelo tecido quando este material é implantado no subcutâneo de ratos²²; tem sido sugerido que estas granulações possam representar cristais de apatita, formados a partir da reação do cálcio derivado do hidróxido de cálcio com o gás carbônico e os íons fosfato do tecido⁴⁴. Assim, a bioatividade do MTA é atribuída à formação de cristais de apatita quando em contato com soluções fisiológicas contendo fosfato^{20,21,44}.

Adicionalmente, o MTA promove recrutamento de leucócitos a partir dos vasos sanguíneos, induzindo inicialmente um processo inflamatório nos tecidos adjacentes^{48,51,61,62}, estimulando também a produção de citocinas moduladoras da inflamação⁵². Citocinas⁴⁶ são moléculas produzidas por diferentes tipos celulares, envolvidas na regulação dos processos de proliferação e diferenciação celular e incluem interleucinas, interferons, fatores estimuladores de colônia (CSF) e alguns fatores de crescimento. Com o decorrer do tempo, ocorre uma redução gradativa no número de células inflamatórias em resposta ao MTA^{51,61}, sugerindo a compatibilidade biológica deste material.

Dentre as interleucinas, a interleucina-6 (IL-6) é uma importante reguladora da inflamação e tem seus níveis aumentados nos processos inflamatórios⁴⁶. Inicialmente, induz o recrutamento de neutrófilos e, em seguida, atua na transição da inflamação aguda para a inflamação crônica, modulando a apoptose dos polimorfonucleares, recrutando monócitos e estimulando sua diferenciação em

macrófagos. Também exerce papel na diferenciação de linfócitos B e T, a partir da apresentação de antígeno, além de atuar na regulação do metabolismo ósseo e em algumas funções neurais⁴⁶.

Um dos principais grupos de fatores de crescimento é a família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF). Trata-se de um conjunto de 22 genes com sequências relacionadas entre si de polipeptídeos e distribuídos em sete proteínas com potencial mitogênico para uma ampla variedade de células^{2,59,65}. Os tipos majoritariamente estudados são o FGF-1 (FGF ácido) e o FGF-2 (FGF básico). Ambos promovem angiogênese a partir de interações de alta afinidade com receptores de tirosina-quinase e baixa afinidade com elevados níveis de proteoglicanos com heparan-sulfato sobre a superfície celular⁵⁹. O FGF-1 possui as atividades biológicas de angiogênese, cicatrização de feridas, reparo de fraturas ósseas, neuroproteção e, quando em níveis exacerbados, oncogênese⁶⁵. Além disso, o FGF-1 está associado a áreas de inflamação crônica, devido ao estímulo à proliferação celular^{32,42}.

É possível que o MTA interfira na homeostase tecidual, inibindo ou induzindo a secreção de citocinas tais como IL-6 e FGF-1 pelas células de tecido conjuntivo justaposto ao material quando em contato com tecidos. Conseqüentemente, estas podem ser possíveis vias moleculares envolvidas na resposta biológica a este material, tanto na reação inflamatória quanto no processo de reparo.

Apesar das vantagens, o MTA apresenta tempo de presa longo²⁵ e é de difícil manuseio por possuir consistência arenosa, a qual dificulta a inserção e a condensação no local indicado⁴¹; pode, ainda, alterar a cor da coroa dentária⁶⁰. Além disso, o radiopacificador utilizado neste material, o óxido de bismuto, pode ocasionar uma redução da resistência à compressão e aumento da porosidade do material¹³;

também já foi reportado que o óxido de bismuto inibe a proliferação celular¹⁰. Deste modo, para substituir o óxido de bismuto, outros radiopacificadores têm sido estudados, como o óxido de zircônio^{14,23,34,50,61}.

Na tentativa de contornar os problemas do MTA e, ao mesmo tempo, usufruir de suas boas propriedades, novos materiais à base de silicato de cálcio têm sido propostos, como o Biodentine™ (Septodont® Inc., Saint Maur des Fossés, França). Trata-se de um substituto dentinário bioativo^{15,29,31,45} com propriedades mecânicas semelhantes à dentina⁴⁵ e que pode ser utilizado tanto na coroa quanto na raiz, com indicações semelhantes às do MTA^{20,21,28,29}. Apresenta-se comercialmente na forma pó-líquido. Seu pó é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de cálcio, óxido de ferro, carbonato de cálcio e, como radiopacificador, óxido de zircônio, enquanto o líquido é composto por água, cloreto de cálcio e policarboxilato, um agente redutor de água com efeito surfactante^{8,11,21}.

O Biodentine™ possui indicações tanto na dentística quanto na endodontia, ou seja, pode ser utilizado para restaurações temporárias em esmalte e definitivas em dentina^{27,29,40}, forramento de cavidades profundas^{7,27}, restaurações cervicais e radiculares^{7,40}, capeamento pulpar direto e pulpotomia^{36,58}, selamento de perfurações radiculares e de furca¹⁸, reparo de reabsorções internas perfurantes e externas, apicificação e obturação retrógrada em cirurgias parendodônticas¹⁷. O principal constituinte do Biodentine™ é o silicato tricálcico, manufaturado pelo próprio fabricante de acordo com a tecnologia de silicato bioativo (Active Biosilicate Technology™, no original em inglês), o que garante a alta pureza do material^{3,16}. O policarboxilato é um polímero hidrossolúvel surfactante o qual reduz a quantidade de água necessária bem como possibilita uma mistura mais homogênea. Por sua vez, o

carbonato de cálcio adicionado ao pó aumenta a disponibilidade de cálcio do material⁸.

A biocompatibilidade é a habilidade de um biomaterial exercer suas funções de acordo com a terapia proposta para sua utilização sem gerar efeitos danosos aos tecidos hospedeiros e, ao mesmo tempo, estimular uma resposta celular e tecidual que induza a restituição estrutural e funcional dos tecidos ou a sua reparação⁶³ sendo, portanto, considerada um dos requisitos básicos na avaliação de um material endodôntico^{5,37}. Um biomaterial a ser aplicado em situações clínicas não deve apenas ser inofensivo para o organismo, mas deve induzir uma resposta que seja favorável à situação clínica para a qual foi planejado⁶³. Materiais biologicamente incompatíveis podem gerar injúrias químicas aos tecidos, levando à redução do potencial de reparo destas áreas além de intensificar o processo inflamatório já instalado, como em lesões periapicais, prejudicando os índices de sucesso do tratamento^{19,37}.

Há três níveis de testes para a avaliação de compatibilidade biológica de materiais dentários: os testes primários, como o teste de citotoxicidade, onde o material é avaliado *in vitro*; os testes secundários, como implantação óssea ou em subcutâneo, onde a resposta biológica local é verificada *in vivo*, em modelos animais; e os testes de aplicação clínica, onde são utilizados modelos animais para aplicação dos materiais de acordo com as recomendações de emprego clínico³⁷.

A análise de implantes em subcutâneo de animais pequenos é considerada um teste secundário de avaliação biológica^{5,37}. Este método de avaliação foi inicialmente padronizado por Torneck^{56,57}, o qual relatou a formação de tecido conjuntivo denso com discreto ou nulo infiltrado inflamatório adjacente aos tubos de polietileno esterilizados implantados em subcutâneo de ratos, após longo período de

avaliação, de 60 dias. Os tubos de polietileno podem ser preenchidos com pastas ou cimentos endodônticos e inseridos no subcutâneo dorsal de ratos. Olsson et al.³⁷ (1981), utilizando tubos de teflon, reiterou a aplicabilidade deste método, confirmando que é possível avaliar a resposta tecidual ao material em diversos períodos após os implantes, possibilitando a obtenção de um resultado tanto numérico quanto descritivo. O MTA tem sido extensamente avaliado em subcutâneo de ratos^{48,55,61,62}, confirmando sua boa resposta biológica, enquanto que o BiodentineTM ainda não possui dados na literatura alusivos a este teste.

Relativamente às poucas avaliações in vivo disponíveis na literatura, BiodentineTM exibe bons resultados, comparáveis ao MTA. Tran et al.⁵⁸ (2012) verificaram que BiodentineTM e MTA Branco induzem proliferação celular, com escassas células inflamatórias próximas aos materiais nos períodos iniciais, após capeamento pulpar em ratos; além disso, houve imunopositividade para sialoproteína dentinária e osteopontina, reforçando o potencial de indução de mineralização por ambos os materiais. Nowicka et al.³⁶ (2013) não encontraram evidência de inflamação, abscesso ou necrose na região subjacente à ponte de dentina formada em resposta ao capeamento pulpar com BiodentineTM e MTA Branco em humanos. Shayegan et al.⁴⁹ (2012) realizaram tanto pulpotomia quanto capeamento pulpar em dentes decíduos suínos, verificando que BiodentineTM e MTA Branco induzem inicialmente o recrutamento de infiltrado inflamatório, com redução significativa no decorrer do tempo, e também estimulam a formação de tecido mineralizado.

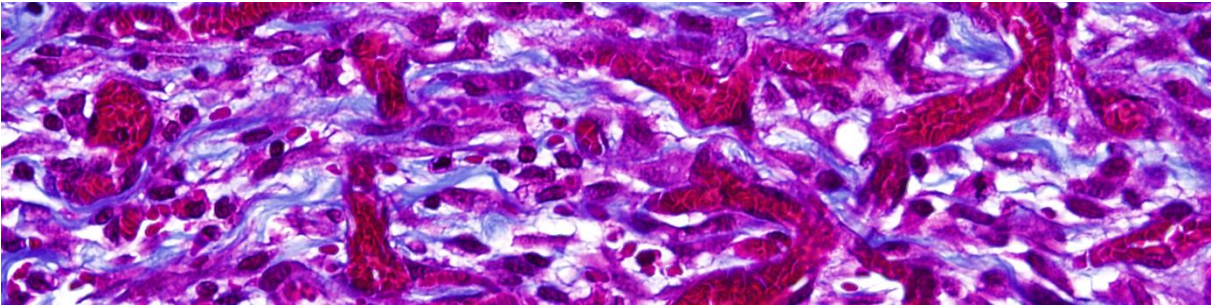
Quando aplicados para o selamento de perfurações radiculares ou de furca ou em retrobturações, os cimentos à base de silicato de cálcio permanecem em contato com o tecido conjuntivo do ligamento periodontal por período indeterminado,

ou seja, enquanto o dente permanecer em função. Para compreender os mecanismos que regem o processo de biocompatibilidade, é necessário analisar as propriedades físicas, químicas e biológicas da interface de contato entre o biomaterial implantado e o organismo e/ou tecido hospedeiro, para determinar quais as possíveis consequências desta interação em longo prazo⁶³.

Os cimentos à base de silicato de cálcio podem ser empregados rotineiramente para selar perfurações radiculares e de furca^{35,64}, as quais podem ser originadas por cáries profundas, reabsorções ou como dano iatrogênico. Sem o tratamento adequado, podem levar à perda do dente^{33,43}. Quando ocorre perfuração do assoalho da câmara pulpar atingindo o processo alveolar, o ligamento periodontal e o tecido ósseo são destruídos em intensidade variada, dependendo da extensão da comunicação e, como consequência, estabelece-se um processo inflamatório¹. O tecido inflamatório pode invaginar para o interior do dente por meio da trajetória da perfuração formando um pólip, com pedículo aderido ao ligamento periodontal^{1,47,53}. O não tratamento dessa perfuração permite a contaminação via meio bucal, determinando a progressão do processo inflamatório que, por sua vez, leva a uma maior destruição do osso alveolar^{1,4,33,47,53}.

Não há, atualmente, um material que apresente todas as características desejadas para o tratamento das comunicações entre a cavidade pulpar e o periodonto adjacente. Assim, busca-se um biomaterial que promova um ambiente favorável ao processo de reparo, tanto do tecido conjuntivo como do tecido ósseo, modulando a evolução da resposta inflamatória e, de preferência, estimulando a liberação de fatores de crescimento e, conseqüentemente, favorecendo a reparação dos tecidos. Deste modo, BiodentineTM foi lançado comercialmente como uma possível alternativa ao MTA, por apresentar consistência mais adequada para

inserção em cavidades e menor tempo de presa, favorecendo um uso clínico mais simplificado, devido à sua consistência diferente do aspecto arenoso típico do MTA. Embora se afirme que o Biodentine™ é um substituto dentinário bioativo, portanto esperando-se que se trate de um material biocompatível, pouco se sabe ainda sobre a reação tecidual promovida por este material e os possíveis eventos celulares e moleculares que modulam esta resposta.



2 Proposição

O objetivo do presente estudo foi avaliar a reação tecidual provocada por Biodentine™ e MTA Angelus Branco em subcutâneo de ratos. Os objetivos específicos foram subdivididos em dois capítulos.

Capítulo 1

O objetivo do presente estudo foi avaliar a biocompatibilidade do Biodentine™ em subcutâneo de ratos. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar morfológica e quantitativamente o processo inflamatório induzido por Biodentine™ e comparar com o MTA;
- Analisar a imunexpressão para interleucina-6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória, nas cápsulas adjacentes ao Biodentine™ e comparar ao MTA;
- Investigar uma possível correlação entre o número de células inflamatórias e de células imunopositivas para IL-6.

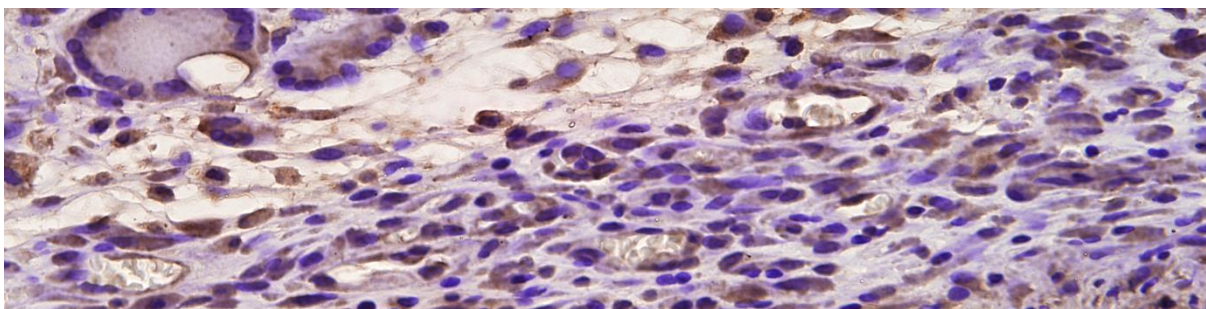
Capítulo 2

O objetivo do presente estudo foi investigar possíveis mecanismos envolvidos no processo de substituição da reação inflamatória por tecido conjuntivo denso das cápsulas formadas em resposta a implantes de Biodentine™ e MTA Angelus Branco em subcutâneo de ratos. Assim, nosso propósito foi investigar:

- Se o fator 1 de crescimento de fibroblastos (FGF-1) participa do processo de remodelação das cápsulas;
- Uma possível participação dos mastócitos no processo de remodelação das cápsulas, ao longo do tempo;
- Se as cápsulas formadas em resposta aos implantes contendo Biodentine™ e MTA diferem no que se refere ao conteúdo de colágeno;
- Se há correlação entre o FGF-1 e a formação de colágeno bem como entre o número de mastócitos e a quantidade de colágeno nas cápsulas.

3 Capitulo 1*

Inflammatory response and IL-6
immunoexpression after Biodentine™
and MTA Angelus implantation
in rat subcutaneous



* Diretrizes do periódico "Journal of Endodontics"

3.1 Abstract

Introduction: Biodentine™ (BDT) is a new tricalcium silicate-based biomaterial which presents similar indications to MTA. The aim of this study was to evaluate inflammatory process induced by Biodentine™ and MTA in rat subcutaneous.

Methods: In sixty rats, a polyethylene tube filled with BDT or MTA was placed in the dorsal subcutaneous; in the control group (CG), empty tubes were implanted. After 7, 15, 30 and 60 days, the polyethylene tubes surrounded by connective tissue were fixed and embedded in paraffin. The number of inflammatory cells (IC) was estimated in HE-stained sections; numerical density of immunolabeled cells for interleukin-6 (IL-6) was also performed. The differences among the groups were subjected to Tukey test ($p \leq 0.05$). **Results:** The highest number of IC and IL-6-positive cells was observed at 7 days, in all groups; a gradual and significant reduction was seen in these parameters over time. In initial periods, a significant increase in the IC and IL-6 immunolabeled cells was observed in the capsules of the BDT group. At 60 days, statistical differences in the number of IC and IL-6-positive were not found between BDT and MTA groups. Moreover, the capsules exhibited several fibroblasts and bundles of collagen fibers. **Conclusions:** The significant reduction in the number of inflammatory cells and in the immunoexpression for IL-6 indicates that Biodentine™, in rat subcutaneous, is a biocompatible material.

Key Words: Biodentine™, MTA Angelus, biocompatibility, histology, interleukin-6, immunohistochemistry

3.2 Introduction

Calcium silicate-based cements, such as mineral trioxide aggregate (MTA), are usually indicated to seal communications between pulp chamber and periodontium, including furcal and lateral root perforations, as well as root-end filling. Although MTA presents suitable physicochemical and biological properties (1-4), it has been reported that this material is difficult to handling (5) and to insert into cavities, and shows high setting time (6). Furthermore, the addition of bismuth oxide (Bi_2O_3) in MTA as radiopacifier agent, decreases mechanical stability (7), increases porosity (5) and inhibits cell growth due to its surface roughness and chemical nature (8). Thus, it has suggested some changes in the calcium silicate-based cements in the attempt to improve their physicochemical and biological properties (9).

Biodentine™ (Septodont® Inc., Saint Maur des Fossés, France) is a calcium silicate-based biomaterial considered as a bioactive dentine substitute (10, 11). Thus, Biodentine™ is indicated for coronal and radicular restorations (11, 12), pulp capping and pulpotomy (13-15), root repair and root-end filling (16). Commercially, Biodentine™ was launched in the market as a material with improved physicochemical and biological properties in comparison to MTA. Therefore, there are some differences in its composition. Its powder contains zirconium oxide (ZrO_2) as radiopacifying agent, which exhibits better biological response than Bi_2O_3 (9). The aqueous solution contains calcium chloride (CaCl_2) to reduce setting time (17), and polycarboxylate, a hydrosoluble polymer with a surfactant effect which maintains a balance between consistency of the mixture and low water content (18, 19).

Considering that root-end filling and root repair materials maintain a close relationship with periapical tissues, several molecules are produced and released by host cells (20). Among these molecules, interleukin-6 (IL-6) has an important role in

the complex cascade of events that orchestrate the inflammatory processes (21). IL-6 controls recruitment of neutrophils as well as induces B and T lymphocytes differentiation (21). IL-6 levels are increased in inflamed pulp tissue and in periapical lesions (22). As calcium silicate-based materials usually induce an inflammatory reaction due to release of hydroxyl (OH^-) and calcium (Ca^{2+}) ions, we evaluated the tissue reaction promoted by Biodentine™ and White MTA (Angelus) in rat subcutaneous. For this purpose, the quantitative analyses of inflammatory cells (IC) and IL-6 immunolabeled cells were performed in the capsules adjacent to both materials.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Experimental procedures

The research protocol of this study was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the São Paulo State University, Brazil (CEUA n^o. 15/2012 – Araraquara Dental School – UNESP*). Sixty male Holtzman rats (*Rattus norvegicus albinus*) weighing 220 ± 10 g were used. The animals were maintained in individual stainless steel cages under 12h light/12h dark cycle at controlled temperature ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$), with water and food provided *ad libitum*.

The rats were distributed into three groups containing 20 animals each according the evaluated material: BDT (Biodentine™; Septodont® Inc., Saint Maur des Fossés, France), MTA (White Mineral Trioxide Aggregate; Angelus Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brazil) and CG (control group, empty polyethylene tubes). After mixing the materials according to manufacturer's

* Annex

recommendations, 60 polyethylene tubes (Embramed Ind. Com., São Paulo, SP, Brazil) with 10.0 mm length and 1.6 mm diameter, previously sterilized with ethylene oxide, were filled with BDT or MTA or left empty, and immediately implanted into the dorsal subcutaneous.

The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of 10% ketamine hydrochloride (80 mg/kg of body weight) combined with 2% xylazine hydrochloride (4 mg/kg of body weight). The dorsal skin was shaved and disinfected with 5% iodine solution. Thereafter, a 2 cm-long incision was performed using a scalpel (Fibra Cirúrgica, Joinville, SC, Brazil) and one polyethylene tube was placed into the subcutaneous pocket. After 7, 15, 30 and 60 days of implantation, the tubes surrounded by connective tissue were excised and the specimens were processed for paraffin embedding and analyzed under light microscope.

3.3.2 Histological procedures

The specimens were fixed for 48 hours at room temperature in 4% formaldehyde (prepared from paraformaldehyde) buffered at pH 7.2 with 0.1 M sodium phosphate. Then, the specimens were dehydrated and embedded in paraffin. Longitudinal sections, 6- μ m thick, were stained with hematoxylin and eosin (HE) for morphological and morphometrical analysis. Some sections were adhered to silanized slides (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) for immunohistochemical detection of IL-6.

3.3.3 Numerical density of inflammatory cells

The number of IC was undertaken using a camera (DP-71, Olympus, Tokyo, Japan) attached to a light microscope (BX-51, Olympus, Tokyo, Japan) and an image analysis system (Image Pro-Express 6.0, Olympus, Tokyo, Japan) as previously described (2, 3, 9). The quantitative analysis was performed in all animals of each group and periods evaluated. In each animal, three HE-stained sections of the capsule adjacent to tube opening were captured at intervals of at least 100 μm . In each section, a standardized field of 0.09 mm^2 of the capsule in close juxtaposition to the opening of implanted tube was analyzed, totaling 0.27 mm^2 per implant. In each field, the IC (neutrophils, lymphocytes, plasma cells and macrophages) were computed using the image analysis system. Thus, in each implant the total number of IC counted was divided by 0.27 mm^2 and therefore the number of IC/ mm^2 was obtained.

3.3.4 IL-6 immunohistochemistry

For the IL-6 reaction, a goat antibody anti-IL-6 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) was used. For antigen retrieval, deparaffinized sections adhered to silanized slides were immersed in 0.001 M sodium citrate buffer pH 6.0 and maintained at 90-94°C for 10 min in a microwave oven. After a cooling-off period, the endogenous peroxidase was blocked with 5% hydrogen peroxide for 20 min. After washings in 0.05M Tris-HCl buffer pH 7.4, the sections were incubated with 2% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, USA) for 20 min. Subsequently, the sections were incubated overnight at 4°C with anti-IL-6 goat primary antibody, diluted 1:400. After washings in Tris-HCl buffer, immunoreaction

was detected by the Universal Dako LSAB[®] + Kit Peroxidase (LSAB + System-HRP, Dako Inc., Carpinteria, CA, USA); in other words, after incubation for 20 min at room temperature with Multi-LINK solution containing biotinylated mouse/rabbit/goat immunoglobulins, the sections were washed in Tris-HCl buffer and were incubated with streptavidin-peroxidase complex for 20 min at room temperature. Peroxidase activity was revealed by 3,3'-diaminobenzidine chromogen (Betazoid DAB, Biocare Medical Inc., Concord, CA, USA) for 3 min and the sections were counterstained with Carazzi's hematoxylin. As negative controls, the immunohistochemical reaction was performed replacing the primary anti-IL-6 by non-immune serum.

The number of IL-6-immunolabelled cells/mm² of the capsule was estimated using an image analysis software (Image Pro-Express 6.0, Olympus) at 695x magnification (9). For each animal, IL-6 positive cells were counted in a standardized field of 0.09 mm² of the capsule adjacent to the opening of the implanted tube. In each animal, the values were divided by area and then the number of IL-6 immunopositive cells/mm² was obtained.

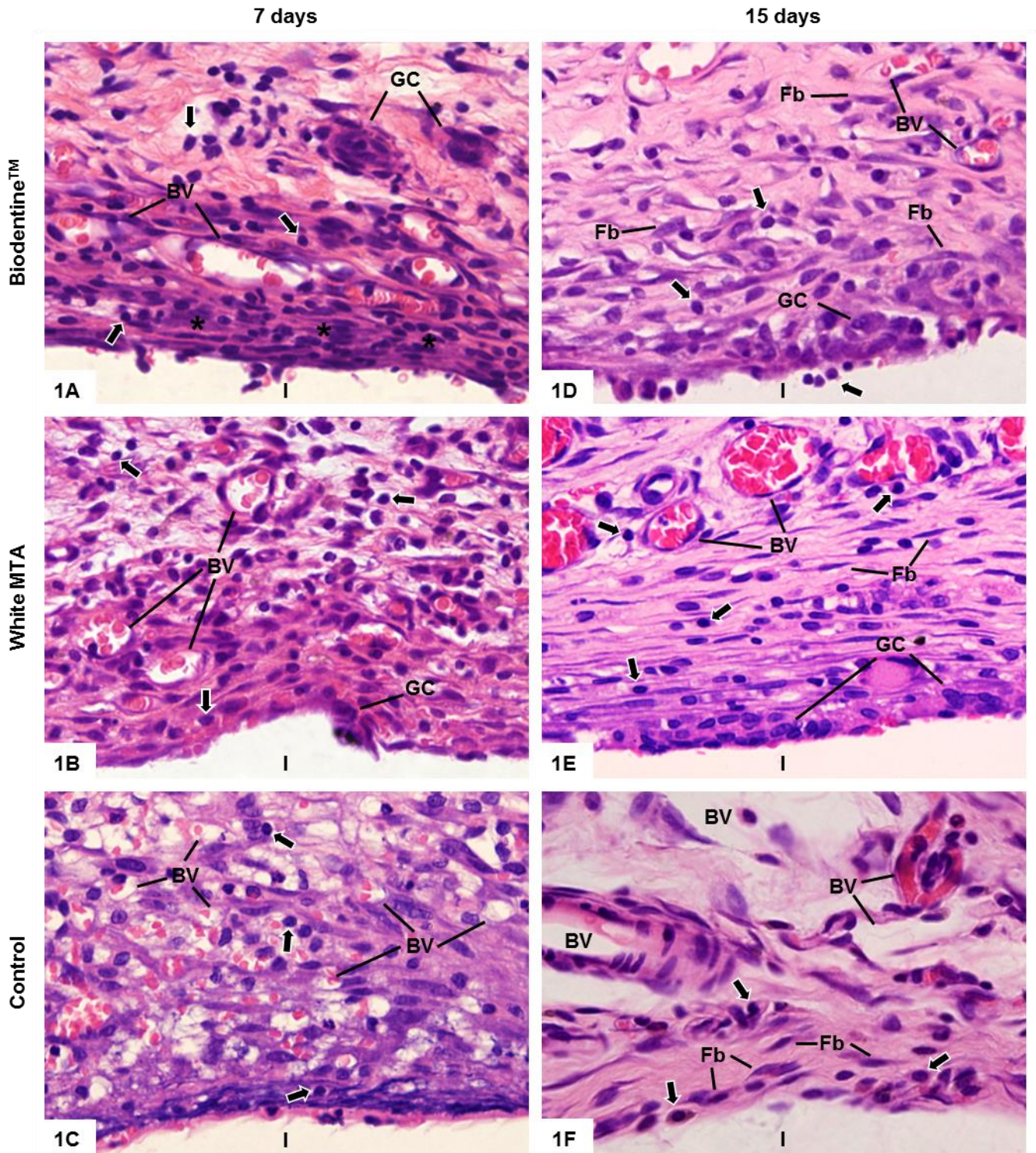
3.3.5 Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using the SigmaStat 2.0 software (Jandel Scientific, Sausalito, CA, USA). The data were submitted to ANOVA and Tukey test. The significance level was set as $p \leq 0.05$. The association between IC number and IL-6 immunopositive cells was evaluated by Pearson correlation coefficient, with significance level accepted $p \leq 0.01$.

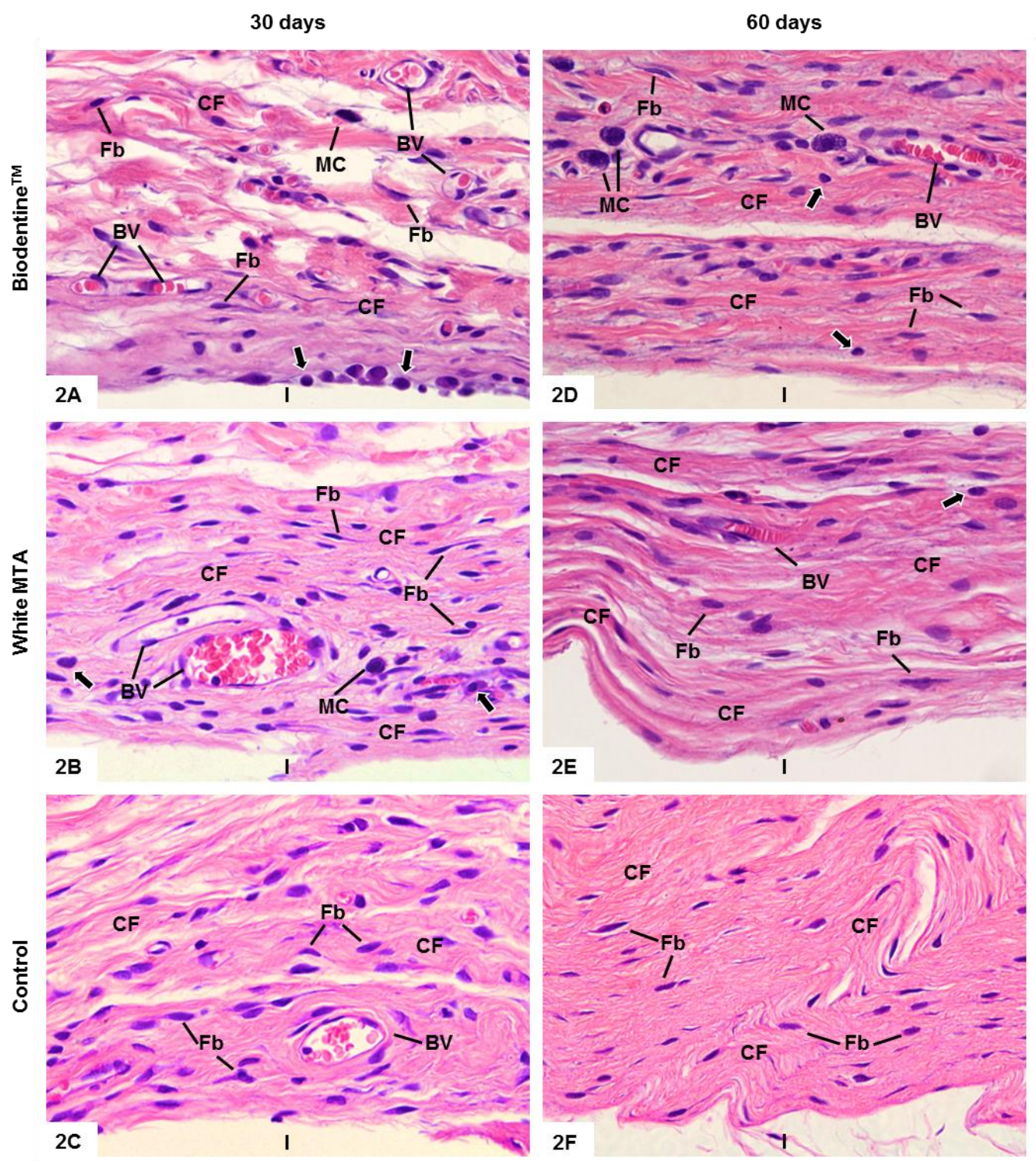
3.4 Results

3.4.1 Morphological findings and numerical density of inflammatory cells

The morphological analysis was performed in the portions of capsules adjacent to opening of the implanted tubes, i.e. in close juxtaposition to the materials. At 7 days, the capsules showed a moderate inflammatory process containing mainly lymphocytes, plasma cells and macrophages; moreover, large blood vessels profiles were often observed in all groups (Figs. 1A-1C). In BDT and MTA groups, the capsules exhibited some multinucleated giant cells (Figs. 1A and 1B). The quantitative analysis revealed that the IC number was significantly higher in BDT group in comparison to MTA group (Table 1). In all groups, a significant reduction in the number of IC was found in the capsules at 15 days (Figs. 1D-1F and Table 1). However, the number of IC remained significantly higher in BDT group in comparison to MTA and CG groups (Table 1). Furthermore, multinucleated giant cells were still present in the capsules of BDT and MTA groups (Figs. 1D and 1E). At 30 days, few IC were observed in the capsules (Figs. 2A-2C); these cells were often next to blood vessels and in the innermost surface of the capsules (Figs. 2A and 2B). After 60 days, the capsules showed several fibroblasts and thick bundles of collagen fibers (Figs. 2D-2F). It is important to note that in this period, statistical differences between BDT and MTA groups were not observed in the number of IC (Table 1).



Figures 1A-1F – Light micrographs of sections showing portions of capsules of BDT (**Figs. 1A** and **1D**), MTA (**Figs. 1B** and **1E**) and CG (**Figs. 1C** and **1F**) groups at 7 days (**Figs. 1A-1C**) and 15 days (**Figs. 1D-1F**). **Figs. 1A-1C** – The capsules exhibit several inflammatory cells (arrows), mainly lymphocytes, plasma cells and macrophages. Note that in BDT group (**Fig. 1A**) inflammatory cells are present mainly in the inner portion of the capsule (asterisks), adjacent to the material. **Figs. 1D-1F** – The capsules show inflammatory cells (arrows) situated mainly next to opening of the implanted tubes (I) and around of the blood vessels (BV); fibroblasts (Fb) are also observed. GC, giant cell. HE. x465.

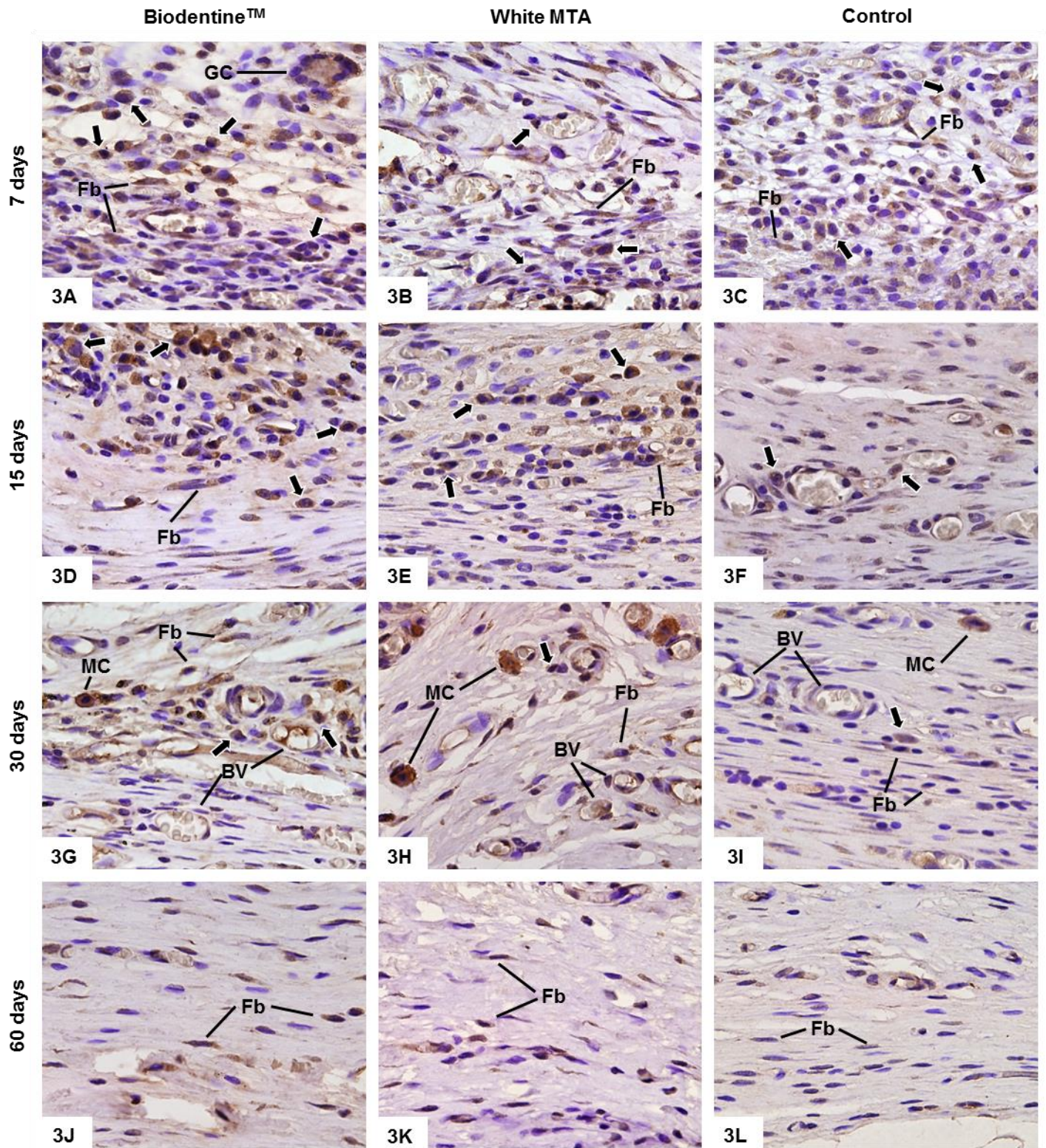


Figures 2A-2F – Light micrographs of sections showing portions of capsules of BDT (**Figs. 2A** and **2D**), MTA (**Figs. 2B** and **2E**) and CG (**Figs. 2C** and **2F**) groups at 30 days (**Figs. 2A-2C**) and 60 days (**Figs. 2D-2F**). **Figs. 2A-2C** – Few inflammatory cells (arrows) are observed in close juxtaposition to the material (**Fig. 2A**) and adjacent to the blood vessels (BV). Several fibroblasts (Fb) are present among collagen fibers (CF). **Figs. 2D-2F** – The capsules exhibit scarce inflammatory cells (arrows) and several fibroblasts (Fb) among thick bundles of collagen fibers (CF). MC, mast cells. I, opening of the implanted tubes. HE. x465.

3.4.2 IL-6 immunohistochemistry

Sections of the capsules submitted to immunohistochemistry IL-6 detection exhibited positive immunolabeling in the cytoplasm of some cells, characterized by brown/yellow stain, in all periods. A strong immunoreaction was observed in the cytoplasm of lymphocytes, plasma cells, macrophages and mast cells; a weak immunoreaction was also observed in the cytoplasm of multinucleated giant cells and some fibroblasts (Figures 3A-3L). According to Table 1, the highest number of IL-6 immunolabeled cells was observed at 7 days, in all groups (Fig. 3A-3C); a gradual and significant decrease in the number of labeled cells was found over time. At 7 and 15 days, the number of immunopositive cells was statistically higher in the BDT group than MTA and CG groups. On the other hand, no differences were detected between BDT and MTA groups at 30 days. After 60 days, no statistically significant difference was found among all groups.

A statistically significant correlation ($r = 0.921$, $p \leq 0.01$) was detected between IC and IL-6-immunoexpression in all groups. Furthermore, this analysis revealed a parallelism in the significant reduction of these parameters over time.



Figures 3A-3L – Light micrographs of sections showing portions of capsules of BDT (**Figs. 3A, 3D, 3G and 3J**), MTA (**Figs. 3B, 3E, 3H and 3K**) and CG (**Figs. 3C, 3F, 3I and 3L**) groups. The sections were submitted to immunohistochemistry for IL-6 detection (brown-yellow color) and counterstained with hematoxylin. **Figs. 3A-3F** (7 and 15 days) – Several inflammatory cells (arrows) exhibit cytoplasm strongly immunolabeled in the capsules; IL-6-positive immunolabeling is also observed in some fibroblasts (Fb) and giant cell (GC). Note that scarce cells with immunopositive cytoplasm (arrows) are present in the capsule of the CG at 15 days (**Fig. 3F**). **Figs. 3G-3I** (30 days) – Strong immunoreaction is observed in lymphocytes and plasma cells (arrows) located adjacent to the blood vessels (BV); note a conspicuous immunolabeling in the mast cells cytoplasm (MC). Positive immunoreaction is observed in some fibroblasts (Fb). **Figs. 3J-3L** (60 days) – Scarce fibroblasts (Fb) with immunolabeled cytoplasm are present in the capsules. x350.

Table 1 – Numerical density of IC and IL-6 immunolabeled cells in the capsules of BDT, MTA and CG groups at 7, 15, 30 and 60 days

Periods		BDT	MTA	CG
7 days	IC	1519.26 ± 111.77 ^{a,1}	782.96 ± 84.40 ^{b,1}	580.74 ± 59.63 ^{c,1}
	IL-6	651.11 ± 16.85 ^{a,1}	468.89 ± 18.26 ^{b,1}	322.22 ± 20.79 ^{c,1}
15 days	IC	789.63 ± 104.87 ^{a,2}	529.63 ± 49.00 ^{b,2}	506.67 ± 35.27 ^{b,2}
	IL-6	480.00 ± 16.48 ^{a,2}	197.78 ± 16.48 ^{b,2}	144.45 ± 11.11 ^{c,2}
30 days	IC	562.96 ± 50.38 ^{a,3}	411.11 ± 65.84 ^{b,3}	239.26 ± 38.72 ^{c,3}
	IL-6	142.22 ± 14.49 ^{a,3}	128.89 ± 12.67 ^{a,3}	62.22 ± 9.94 ^{b,3}
60 days	IC	220.00 ± 29.35 ^{a,4}	202.96 ± 22.13 ^{a,4}	118.52 ± 8.69 ^{b,4}
	IL-6	55.56 ± 7.86 ^{a,4}	51.11 ± 9.94 ^{a,4}	46.67 ± 9.30 ^{a,3}

Numerical values represent mean ± standard deviation.

The comparison among groups in the same period is indicated by superscript letters in the lines; same letters = no statistically significant difference.

The comparison among periods is indicated by superscript number in the columns; same numbers = no statistically significant difference.

Tukey test ($p \leq 0.05$).

3.5 Discussion

Our morphological findings indicate that Biodentine™ exhibits biocompatibility since the moderate inflammatory reaction initially promoted in the subcutaneous was replaced by capsule containing thick collagen fibers bundles and fibroblasts. Moreover, our quantitative analysis revealed a gradual and significant reduction in the immunoexpression for IL-6, a proinflammatory cytokine, reinforcing therefore the idea that Biodentine™ is a biocompatible material.

Considering that tricalcium silicate is the main constituent of Biodentine™, as well as of MTA (17, 23), the reaction of these materials releases Ca^{2+} which precipitate as calcium hydroxide (24) and therefore may promote initially a superficial necrosis (25). Moreover, OH^- are probably released during the reaction of MTA and Biodentine™ providing to the microenvironment a pH around 8 (26) and 12 (27), respectively, at 7 days. Soon after implantation, the substances released induce clustering of interstitial fluids and proteins from blood vessels on biomaterial surface. In addition, injured and necrotic host cells as well as endothelial cells produce cytokines and growth factors recruiting the inflammatory and immune cells (28). The pH seems to exert an important role in the inflammatory process progression since the alkaline pH stimulates the recruitment and potentiation of neutrophils as well as differentiation of plasma cells (3). Thus it is possible that the elevated pH promoted by Biodentine™ may be, at least in part, responsible by the highest number of IC observed in BDT group in initial periods.

The progression and type of inflammatory infiltrate is directly associated to the degree of host response to substances released by materials. Immune cells produce and release several cytokines and growth factors which exert an active role in the complex and coordinate cascade of cellular and molecular events involved in the

installation and progression of the inflammatory process (28, 29). Among these cytokines, IL-6 is a proinflammatory cytokine that seems to play an active participation in the immune response and, consequently, this molecule has been associated with inflammatory diseases (30) such as rheumatoid arthritis, periodontal diseases and endodontic lesions (22). Recently, our group also observed an evident association between IL-6 immunoreactivity and decreased of inflammatory process in the capsules adjacent to calcium silicate-based cements containing ZrO₂ implanted in rat subcutaneous (9). In the present study, our findings revealed IL-6 immunolabeled cells in the capsules in all periods. However, the pattern of IL-6 immunolabeling varied among the groups and over time. It has been reported that IL-6 secretion suppress the recruitment of neutrophils whilst induces the migration and differentiation of lymphocytes and monocytes (21). In our results, the capsules exhibited mainly lymphocytes and plasma cells characterizing a chronic inflammatory process (29); moreover, these cells exhibited an evident immunolabeling reinforcing the idea that IL-6 may be involved in the transition from acute to chronic inflammatory reaction (21). The higher immunoreactivity for IL-6 in the capsules of BDT group, at 7 and 15 days, indicates that Biodentine™ initially promotes a more intense reaction in comparison to MTA. It is conceivable to suggest that this cytokine may constitute one of the molecules involved in inflammatory reaction induced by both materials in rat subcutaneous. Moreover, the significant correlation between IL-6 immunoreactivity and IC indicates that the accentuated immunolabeling may be responsible for the high number of IC observed in BDT group. In fact, the reduction in IL-6 immunoreactivity occurred prior to significant decreasing in IC number reinforcing, therefore, the idea that IL-6 is a potent mediator of the inflammatory process (21, 22, 30).

It is possible that the higher inflammatory reaction observed in the initial periods in BDT group may be explained due to different compositions of both calcium silicate-based cements. Among them, CaCl_2 presents in Biodentine™ liquid to reduce setting time (17), when added to MTA reduces cell viability and cell attachment in comparison to pure MTA, although this association was not considered cytotoxic (31). Furthermore, calcium carbonate is added to Biodentine™ powder (19), acting as a nucleation site to calcium silicate hydrates (16). This addition may be responsible for higher pH (27) and higher Ca^{2+} release (32) than MTA. High pH promotes IC recruitment (33, 34) as well as subtle alterations in the amount of Ca^{2+} concentrations induces both proliferation and apoptosis in T-lymphocytes (35). Considering that at 7 days scarce neutrophils were seen in the capsules of BDT and MTA groups, it is possible that the high Ca^{2+} released could have stimulate the recruitment of lymphocytes and monocytes reducing, therefore, the acute phase of the inflammatory reaction. Some in vivo studies have reported that Biodentine™ when used in pulp capping promotes mild inflammatory reaction (13-15).

Despite the accentuated inflammatory reaction initially induced by Biodentine™, from the 30 days significant differences were not observed in the IL-6 immunoexpression in BDT and MTA groups, indicating that the irritant potential of Biodentine™ was significantly reduced. This hypothesis is reinforced since significant reduction in the number of IC was accompanied by formation of collagen fibers bundles in the capsules at 60 days. Therefore, our findings indicate that Biodentine™ implanted in rat subcutaneous is a biocompatible material. However, further studies are necessary to investigate the reparative potential and if Biodentine™ induces mineralized tissues formation.

3.6 Acknowledgments

The authors would like to thank Mr. Pedro Sérgio Simões and Mr. Luis Antonio Potenza for kind help and technical assistance. This research was supported by FUNDUNESP (Proc. nº 01054/11-DFP) and CNPq (Brazil). We thank to FAPEAM (Brazil) for the fellowship grant awarded to Tiago S. Fonseca.

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

3.7 References

1. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, et al. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005;31:97-100.
2. Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, et al. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J* 2011;44:100-10.
3. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, Silva GF, et al. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: Quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mat Res B Appl Biomater* 2012;100:1773-81.
4. Katsamakis S, Slot DE, van der Sluis LW, van der Weijden F. Histological responses of the periodontium to MTA: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2013;40:334-44.
5. 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. *J Endod* 2007;33:295-8.

6. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod* 2006;32:569-72.
7. Grazziotin-Soares R, Nekoofar MH, Davies TE, et al. Effect of bismuth oxide on white mineral trioxide aggregate: chemical characterization and physical properties. *Int Endod J* 2013 Aug 8. <http://dx.doi.org/10.1111/iej.12181>. [Epub ahead to print].
8. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, et al. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2004;37:699-704.
9. Silva GF, Bosso R, Ferino RV, et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mat Res A* 2014 Feb 4. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.35099>. [Epub ahead of print].
10. Sawyer AN, Nikonov SY, Pancio AK, et al. Effects of calcium silicate-based materials on the flexural properties of dentin. *J Endod* 2012;38:680-3.
11. Laurent P, Camps J, De Meo M, et al. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. *Dent Mater* 2008;24:1486-94.
12. Koubi G, Colon P, Franquin JC, et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clin Oral Investig* 2013;17:243-9.
13. Tran XV, Gorin C, Willig C, et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res* 2012;91:1166-71.
14. Shayegan A, Jurysta C, Atash R, et al. Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. *Pediatr Dent* 2012;34:e202-8.

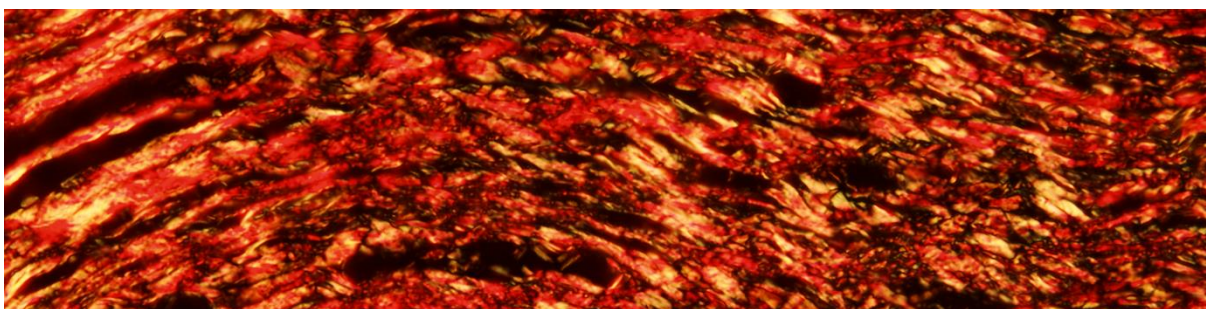
15. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2013;39:743-7.
16. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater* 2013;29:e20-28.
17. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater* 2013;29:580-93.
18. Han L, Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int Endod J* 2011;44:1081-7.
19. Camilleri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *Int Endod J* 2012;45:737-43.
20. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008;29:2941-53.
21. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:878-88.
22. Wisithphrom K, Windsor LJ. The effects of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, interleukin-6, and transforming growth factor-beta1 on pulp fibroblast mediated collagen degradation. *J Endod* 2006;32:853-61.
23. 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. *Int Endod J* 2012;45:326-36.

-
24. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 2007;40:462-70.
 25. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010;36:190-202.
 26. Tanomaru-Filho M, Chaves-Faleiros FB, Sacaki JN, et al. 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.
 27. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J* 2013;46:632-41.
 28. Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials* 2011;32:6692-709.
 29. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 2008;20:86-100.
 30. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol* 2010;22:347-52.
 31. Kang JY, Lee BN, Son HJ, et al. Biocompatibility of mineral trioxide aggregate mixed with hydration accelerators. *J Endod* 2013;39:497-500.
 32. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 2013;46:808-14.
 33. Vosoughosseini S, Lotfi M, Shahi S, et al. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. *J Endod* 2008;34:715-7.

34. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, et al. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. *J Endod* 2010;36:899-903.
35. Schwarz EC, Kummerow C, Wenning AS, et al. Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. *Eur J Immunol* 2007;37:2723-33.

4 Capítulo 2*

A participação dos mastócitos e do FGF-1 na resposta a Biodentine™ e MTA Angelus implantados em subcutâneo de ratos



* Diretrizes do periódico "Journal of Biomedical Materials Research. Part B: Applied Biomaterials"

4.1 Resumo

Nosso propósito foi avaliar a reação induzida por Biodentine™ (BDT) e MTA implantados em subcutâneo de ratos, com ênfase no processo de substituição da reação inflamatória por uma cápsula colágena, investigando a participação de FGF-1 e mastócitos. Tubos de polietileno preenchidos com os materiais foram implantados no subcutâneo de 60 ratos distribuídos em 3 grupos (n=20/grupo): BDT, MTA e GC (controle, tubos vazios). Após 7, 15, 30 e 60 dias, os implantes e tecidos adjacentes foram processados para parafina. Cortes longitudinais das cápsulas foram corados com tricrômico de Masson, Picrosirius ou submetidos ao Alcian Blue (pH 2,5). Reação imuno-histoquímica para FGF-1 foi realizada. O número de células imunopositivas e de mastócitos e a porcentagem de colágeno birrefringente nas cápsulas foram obtidos. A imunoexpressão para FGF-1 foi observada em células inflamatórias e fibroblastos em todos os grupos e períodos. O número de células imunopositivas foi significativamente maior aos 7 dias. O número de mastócitos e o percentual de colágeno birrefringente aumentaram significativamente no decorrer dos períodos. Aos 60 dias, o número de células imunopositivas e de mastócitos foram maiores no grupo BDT em comparação ao MTA. A porcentagem de colágeno no grupo BDT foi menor comparada ao MTA; no entanto, as cápsulas do grupo BDT apresentaram típicos feixes de fibras colágenas e raras células inflamatórias, indicando que Biodentine™ é biocompatível. A significativa correlação entre mastócitos e colágeno indica que estas células devem ter uma participação ativa na dinâmica de substituição do processo inflamatório inicial por cápsulas de colágeno.

Palavras-chave: Biodentine™, Mineral Trióxido Agregado, biocompatibilidade, imuno-histoquímica, FGF-1

4.2 Introdução

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) é um cimento reparador à base de silicato de cálcio indicado para o selamento de perfurações dentais^{1,2}, retrobturação em cirurgias parestodônticas³ e proteção pulpar⁴. O MTA possui propriedades adequadas ao seu uso clínico^{5,6} e é biocompatível^{1,7,8}. Entretanto, apresenta elevado tempo de presa, alto custo e dificuldade de manipulação e inserção em cavidades⁵. Assim, o Biodentine™ (Septodont® Inc., Saint Maur des Fossés, França) é um biomaterial reparador também à base de silicato de cálcio o qual foi lançado no mercado com indicações semelhantes ao MTA⁹⁻¹¹, além de sua indicação como material restaurador.¹⁰ O principal componente do pó é o silicato tricálcico, com alto teor de pureza, enquanto o líquido possui solução aquosa de cloreto de cálcio, para acelerar o tempo de presa, e policarboxilato, o qual proporciona boa consistência e fluidez ao material.¹²

Os cimentos reparadores permanecem em contato com os tecidos periodontais ou com o tecido pulpar; assim, faz-se necessário entender a dinâmica estabelecida entre os biomateriais e o organismo. A sequência de eventos inflamatórios induzidos pelos cimentos à base de silicato de cálcio é relativamente bem conhecida^{1,4,7,8,13}; no entanto, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na sequência de eventos de substituição do processo inflamatório por um tecido conjuntivo frouxo ou denso que caracterize o reparo tecidual ainda não estão bem compreendidos.

A resposta inicial dos tecidos a biomateriais implantados é a instalação de um processo inflamatório, o qual induz a liberação de mediadores químicos como quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, responsáveis pelo recrutamento de leucócitos que modulam o processo de reparo tecidual.¹⁴ Assim, a resposta do

hospedeiro às substâncias liberadas pelos materiais determina a intensidade do processo inflamatório e o seu tipo, bem como a sua extensão e duração.¹⁵ A regressão do processo inflamatório e a formação de uma cápsula fibrosa adjacente aos materiais é um dos indícios de sua biocompatibilidade.¹⁶

O fator 1 de crescimento de fibroblastos (FGF-1) é um fator de crescimento expresso por diversos tipos de células, especialmente fibroblastos; é um fator angiogênico e mitogênico e, conseqüentemente, importante no processo de reparação tecidual.¹⁷ Além disso, o FGF-1 também está associado a áreas de inflamação crônica.¹⁸ Em relação à resposta celular, há fortes evidências de que os mastócitos estejam envolvidos com os processos inflamatório e de reparação¹⁹, uma vez que produzem e liberam diversos mediadores²⁰, tais como interleucina-6 (IL-6), prostaglandinas, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), além de metaloproteinases da matriz (MMPs).²¹

No presente estudo, nosso propósito foi avaliar a reação induzida por BiodentineTM e MTA Branco implantados em subcutâneo de ratos com ênfase no processo de substituição da reação inflamatória por uma cápsula de colágeno, investigando a participação do FGF-1 bem como dos mastócitos neste processo. Assim, reação imuno-histoquímica para detecção do FGF-1 foi realizada e o número de células imunopositivas foi estimado. Além disso, foram estimados o número de mastócitos e o conteúdo de colágeno birrefringente nas cápsulas.

4.3 Material e método

4.3.1 Animais

O protocolo da presente pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP (Processo CEUA nº 15/2012, em Anexo).

Foram utilizados 60 ratos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*) adultos jovens, pesando em média 220 gramas, adquiridos do biotério do Campus de Araraquara (UNESP). Todos os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), o qual apresenta temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55\pm 10\%$) controladas e fotoperíodo de 12 horas. Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno forradas com maravalha e receberam ração granulada (Nutrilabor; Guabi, Campinas, SP, Brasil) e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos equitativamente em três grupos, de acordo com os materiais implantados no subcutâneo: BDT (Biodentine™; Septodont® Inc., Saint Maur des Fossés, França), MTA (Mineral Trióxido Agregado Branco; Angelus Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil) e GC (grupo controle, tubos de polietileno vazios). Os cimentos foram manipulados segundo as recomendações dos fabricantes. Os implantes permaneceram no subcutâneo por 7, 15, 30 ou 60 dias, totalizando 5 animais por grupo em cada período.

4.3.2 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com 0,08 mL/100 g (80 mg/kg) de peso corporal de cloridrato de cetamina a 10% (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil), associada a 0,04 mL/100 g (4 mg/kg) de peso corporal

de cloridrato de xilazina a 2% (União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, SP, Brasil), administrada com seringa e agulha de insulina por via intraperitoneal.

Após a sedação, posicionado o animal em decúbito ventral, realizou-se a tricotomia na região dorsal, antissepsia com solução de iodo a 5% e incisão de 20 mm com uma lâmina de bisturi nº 15 (Fibra Cirúrgica, Joinville, SC, Brasil) em sentido crânio-caudal. O tecido foi divulsionado com tesoura de ponta romba, originando uma bolsa no subcutâneo onde foi inserido um tubo de polietileno (Embramed Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) medindo 10 mm de comprimento x 1,5 mm de diâmetro, previamente esterilizado em óxido de etileno. Os tubos foram preenchidos com BDT ou MTA e, no grupo controle (GC), não foram preenchidos. As incisões foram suturadas em pontos simples utilizando-se fio de seda 4-0 (Ethicon Inc., São José dos Campos, SP, Brasil).

Decorridos os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados com sobredose anestésica para a remoção dos implantes com os tecidos circundantes.

4.3.3 Processamento histológico

Os tubos de polietileno contendo os tecidos circunjacentes foram fixados em solução de formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído) tamponado com fosfato de sódio 0,1 M com pH 7,2, durante 48 horas. Após a fixação, as peças foram desidratadas, diafanizadas, embebidas em parafina líquida (60 °C) e incluídas em parafina. Os espécimes foram incluídos de maneira a obter cortes longitudinais em relação ao longo eixo dos tubos de polietileno. Com um micrótomo rotatório

foram obtidos, a partir dos blocos, cortes longitudinais com 6 µm de espessura, os quais foram aderidos a lâminas de vidro e corados com tricrômico de Masson ou Alcian Blue ou Sirius Red. No mínimo 3 cortes não seriados, com intervalo não inferior a 100 µm, foram aderidos a lâminas previamente tratadas com silano (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA), para a realização das reações imuno-histoquímicas para detecção de FGF-1.

4.3.4 Análise morfológica dos implantes

A partir dos cortes corados com tricrômico de Masson, foi realizada a análise descritiva da cápsula de tecido conjuntivo adjacente aos implantes. Nesta análise, considerou-se a presença ou a ausência de processo inflamatório, o tipo de células inflamatórias, presença de células gigantes multinucleadas, vasos sanguíneos, fibroblastos e presença de fibras colágenas.

4.3.5 Reação imuno-histoquímica para detecção de FGF-1

Após desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001 M com pH 6,0 e submetidos ao tratamento com micro-ondas por 20 minutos a 90-94 °C para recuperação antigênica. Após o resfriamento, as lâminas foram imersas em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3%. Os cortes foram lavados e, então, incubados *overnight* em anticorpo primário anti-FGF-1 monoclonal produzido em camundongo (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA), na diluição 1:150.

Subsequentemente às lavagens em tampão Tris-HCl 0,05 M, os cortes foram incubados em anticorpo secundário de coelho/camundongo/cabra anti-IgG

biotinilado (LSAB, Dako Inc., Carpinteria, CA, EUA), por 20 minutos. Após lavagens em tampão Tris-HCl 0,05 M, os cortes foram incubados com o complexo HRP (System-HRP, Dako Inc., Carpinteria, CA, EUA), por 20 minutos. Após lavagens, a atividade da peroxidase foi revelada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (Betazoid DAB, Biocare Medical Inc., Concord, CA, EUA) durante 3 minutos e, subsequentemente, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Carazzi, desidratados, diafanizados e montados em meio resinoso para análise microscópica. Como controle negativo, alguns cortes foram submetidos a todas as etapas exceto a incubação com anticorpo primário, onde foram incubados com soro não imune.

A fim de verificar se houve diferenças entre os grupos e períodos, o número de células imunopositivas foi estimado nas cápsulas dos 5 implantes de cada grupo/período. Com uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão), uma área padrão de 0,09 mm² da cápsula de cada implante foi capturada. O número de células imunopositivas foi computado com auxílio de um programa de análise de imagens (Image Pro-Express 6.0, Olympus, Tóquio, Japão). Assim, o número de células imunopositivas/mm² de cápsula foi obtido para cada implante; posteriormente, calculou-se a média para cada grupo em cada período.

4.3.6 Densidade numérica de mastócitos Alcian Blue-positivos nas cápsulas/mm²

Os mastócitos nas cápsulas foram quantificados em cortes submetidos à reação histoquímica Alcian Blue (AB). De cada implante, 2 cortes não seriados com distância mínima de 100 µm foram desparafinados, hidratados e tratados com ácido

acético a 3%. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de Alcian Blue 8GX (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) a 1% com pH ajustado para 2,5, durante 30 minutos. Subsequentemente, os cortes foram lavados em água corrente e a coloração nuclear foi realizada por imersão em hematoxilina de Carazzi e montados em meio resinoso para análise em microscópio de luz.

O número de mastócitos AB-positivos nas cápsulas foi computado em 345x usando um sistema de análise de imagens (Image Pro-Express 6.0, Olympus, Tóquio, Japão). Em cada corte, foram capturadas 2 áreas padronizadas (aproximadamente 0,36 mm² cada) das cápsulas; considerando que foram usados 2 cortes de cada implante, o número de mastócitos AB-positivos foi estimado numa área total de 1,44 mm² de cápsula/implante em cada implante nos diferentes períodos.

4.3.7 Mensuração do colágeno birrefringente

A quantidade de colágeno nas cápsulas foi estimada a partir de cortes corados com solução a 0,1% de Sirius Red (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) e analisados com filtros de polarização acoplados ao microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão). Foram utilizados 2 cortes por implante, com intervalo mínimo de 100 µm, em todos os períodos. Em cada corte, uma imagem da cápsula foi capturada com auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) e objetiva de 40x; esta imagem com área de aproximadamente 0,09 mm², usada em todos os cortes, foi considerada a área padrão. Desta maneira, o colágeno foi mensurado numa área de 0,18 mm² de cada implante. Todas as imagens foram capturadas com parâmetros padronizados de intensidade de luz, abertura do

diafragma do condensador, altura do condensador, objetiva, angulação do polarizador e brilho da imagem.

A quantidade de colágeno foi estimada usando metodologia previamente descrita.^{22,23} Com um processador de imagens (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), as cores proporcionadas pela birrefringência das imagens das cápsulas foram isoladas utilizando-se o histograma de matiz disponível na guia “Color Threshold”. As imagens foram convertidas para preto e branco, de modo que cada pixel não preto tornou-se branco e cada pixel preto permaneceu preto. Em seguida, a porcentagem ocupada por cada cor foi calculada a partir do número de pixels em cada faixa de matiz. Para esta mensuração, manipulou-se o histograma de matiz para selecionar cada comprimento de onda²⁴, ou seja, vermelho/alaranjado (matizes 2 a 38 e 230 a 256), amarelo (matiz 39 a 51) e verde (matiz 52 a 128). O número de pixels de cada frequência de cor foi expresso como uma porcentagem do total de colágeno birrefringente daquele comprimento de onda no total da imagem. Deste modo, os dados representam, em porcentagem, a soma dos matizes nos 2 cortes de cada implante.

4.3.8 Análise estatística

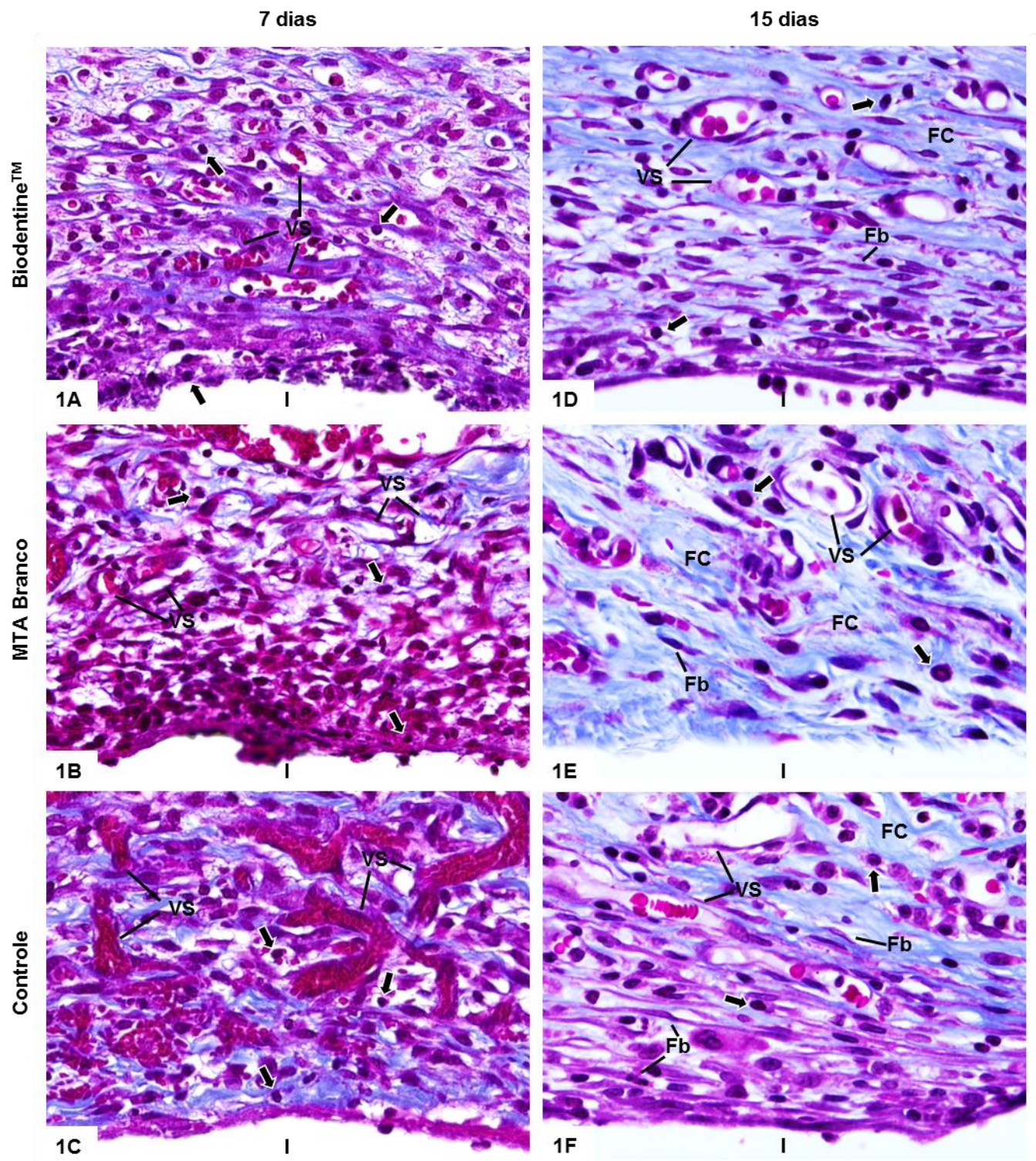
Os parâmetros referentes à densidade numérica de mastócitos, células imunopositivas ao FGF-1 e quantidade de colágeno birrefringente nas cápsulas foram submetidos ao programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA, EUA). Aplicou-se o teste paramétrico ANOVA para verificar a normalidade dos dados; em sequência, o teste Tukey foi utilizado para comparar os grupos, com nível de significância $p \leq 0,05$. A correlação de Pearson foi aplicada para verificar

associação entre a porcentagem de fibras colágenas e a quantidade de células imunopositivas ao FGF-1 e entre a porcentagem de fibras colágenas e a quantidade de mastócitos, com nível de significância $p \leq 0,01$.

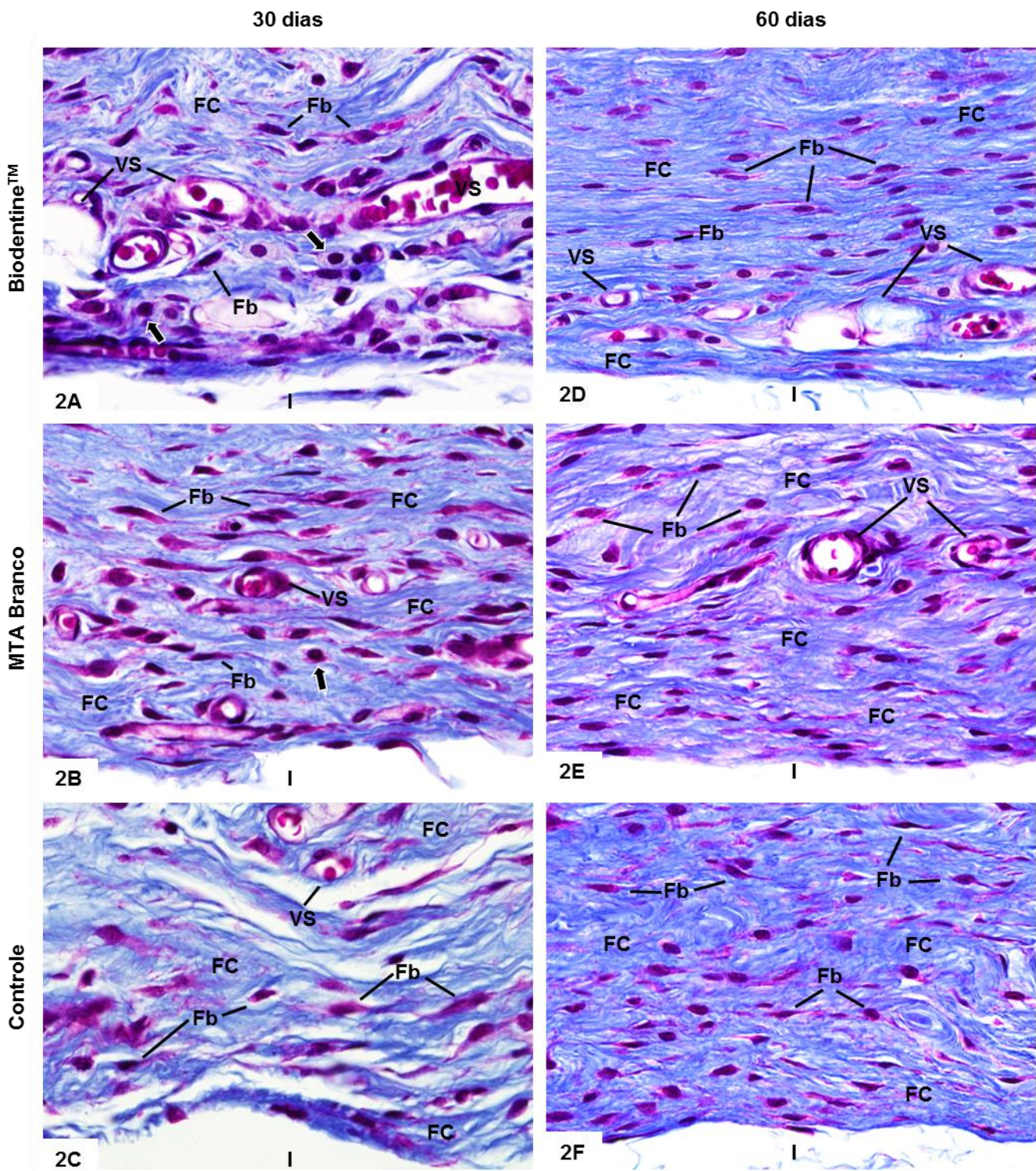
4.4 Resultado

4.4.1 Análise morfológica

Aos 7 dias, as cápsulas envolvendo os implantes apresentaram-se constituídas por um tecido conjuntivo contendo inúmeros vasos sanguíneos com amplo diâmetro e ingurgitados, diversos linfócitos e plasmócitos, alguns macrófagos e poucos neutrófilos. As cápsulas continham um evidente predomínio de células, na sua maior parte células inflamatórias, em relação aos componentes da matriz extracelular, em todos os grupos (Figs. 1A-1C). Aos 15 dias, as cápsulas adjacentes aos implantes exibiram fibras colágenas entre fibroblastos; linfócitos, plasmócitos e macrófagos apresentaram-se dispersos por toda a cápsula (Figs. 1D-1F). Aos 30 e 60 dias (Figs. 2A-2F), diversos fibroblastos dispostos entre os feixes de fibras colágenas foram observados nas cápsulas; escassas células inflamatórias foram observadas, principalmente, aos 60 dias. Além disso, um aparente aumento no conteúdo de colágeno no período de 60 dias foi notado (Figs. 2D-2F).



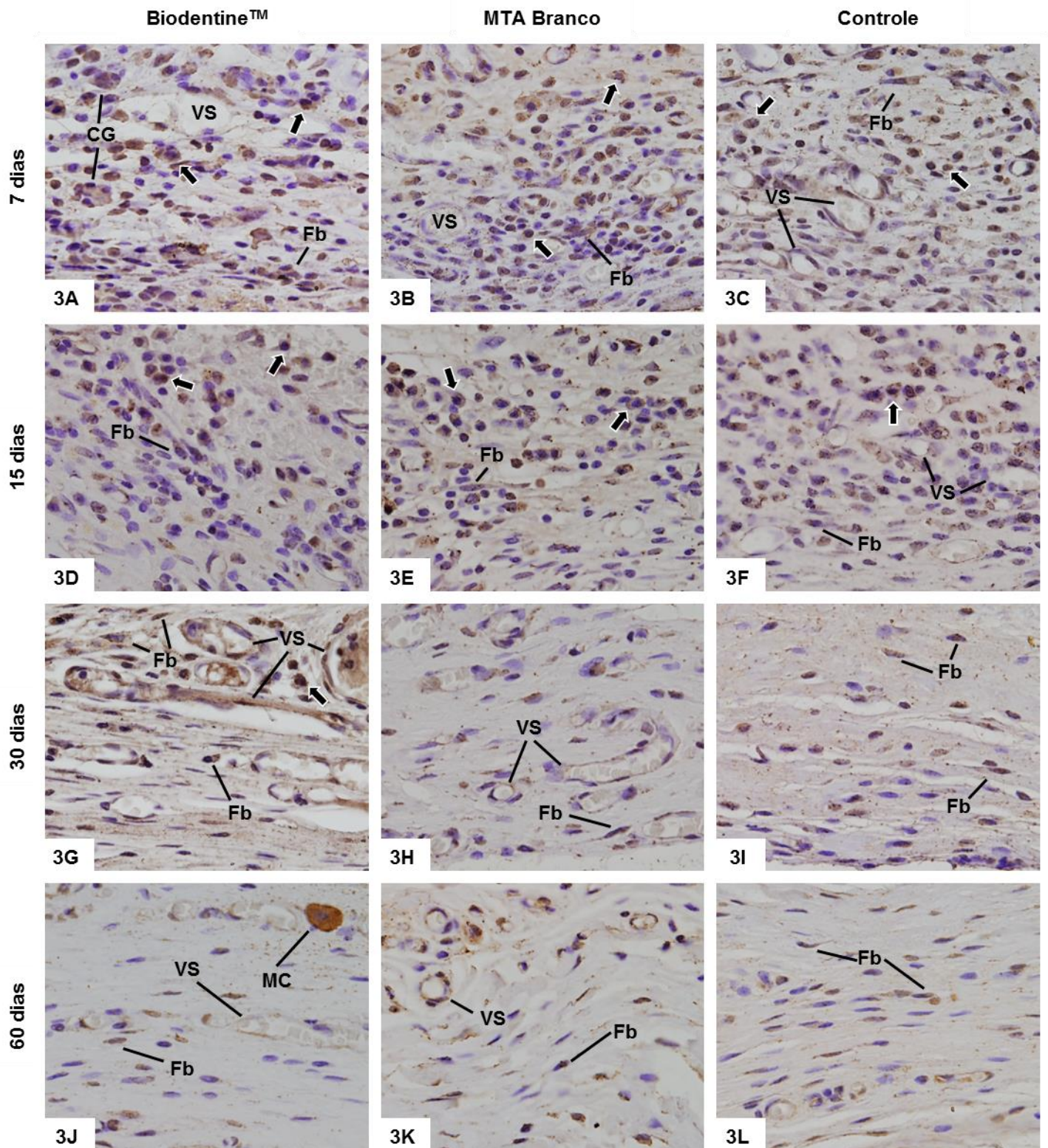
Figuras 1A-1F – Fotomicrografias de cortes mostrando porções de cápsulas dos grupos BDT (**Figs. 1A e 1D**), MTA (**Figs. 1B e 1E**) e GC (**Figs. 1C e 1F**) nos períodos de 7 dias (**Figs. 1A-1C**) e 15 dias (**Figs. 1D-1F**). **Figs. 1A-1C** – as cápsulas exibem diversas células inflamatórias (setas), principalmente linfócitos e plasmócitos, dispersas por toda extensão das cápsulas entre os perfis de vasos sanguíneos (VS) ingurgitados e com amplo diâmetro. **Figs. 1D-1F** – as cápsulas contêm fibroblastos (Fb) e somente algumas células inflamatórias (setas); fibras colágenas delgadas (FC) estão presentes entre as células e os vasos sanguíneos (VS). (I), tubos de polietileno. Tricrômico de Masson. x465.



Figuras 2A-2F – Fotomicrografias de cortes mostrando porções de cápsulas dos grupos BDT (**Figs. 2A e 2D**), MTA (**Figs. 2B e 2E**) e GC (**Figs. 2C e 2F**) nos períodos de 30 dias (**Figs. 2A-2C**) e 60 dias (**Figs. 2D-2F**). **Figs. 2A-2C** – As cápsulas mostram numerosos fibroblastos (Fb) situados entre feixes de fibras colágenas (FC). Algumas células inflamatórias (setas) são observadas, principalmente, próximas aos vasos sanguíneos (VS). **Figs. 2D-2F** – Diversos fibroblastos (Fb) situam-se entre espessos feixes de fibras colágenas (FC); escassas células inflamatórias (setas) e poucos vasos sanguíneos (VC) são vistos. I, tubos de polietileno. Tricrômico de Masson. x465.

4.4.2 Densidade numérica de células imunomarcadas para FGF-1

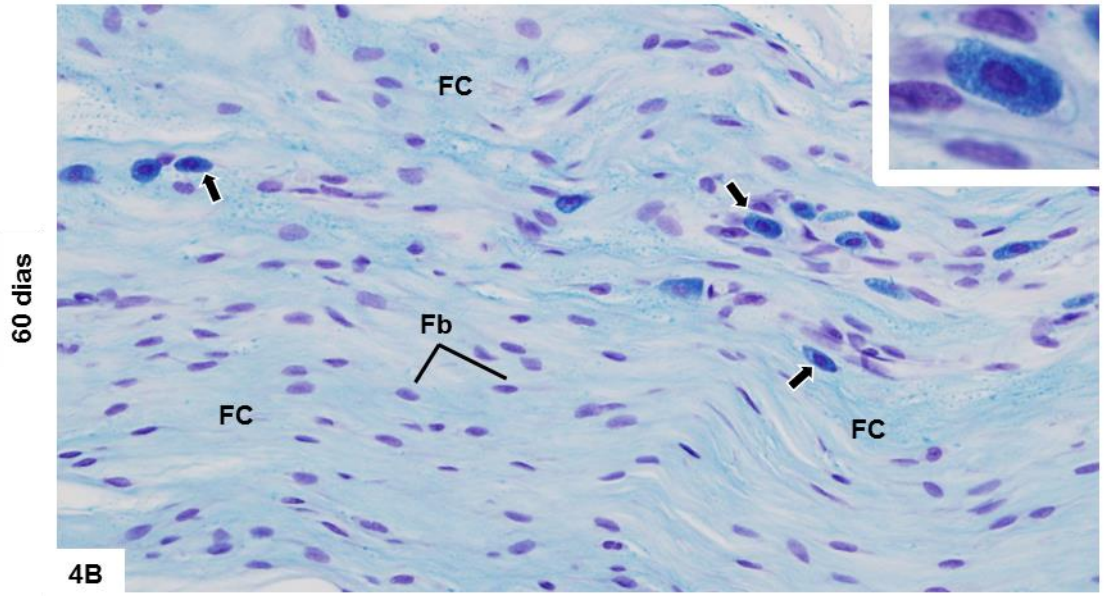
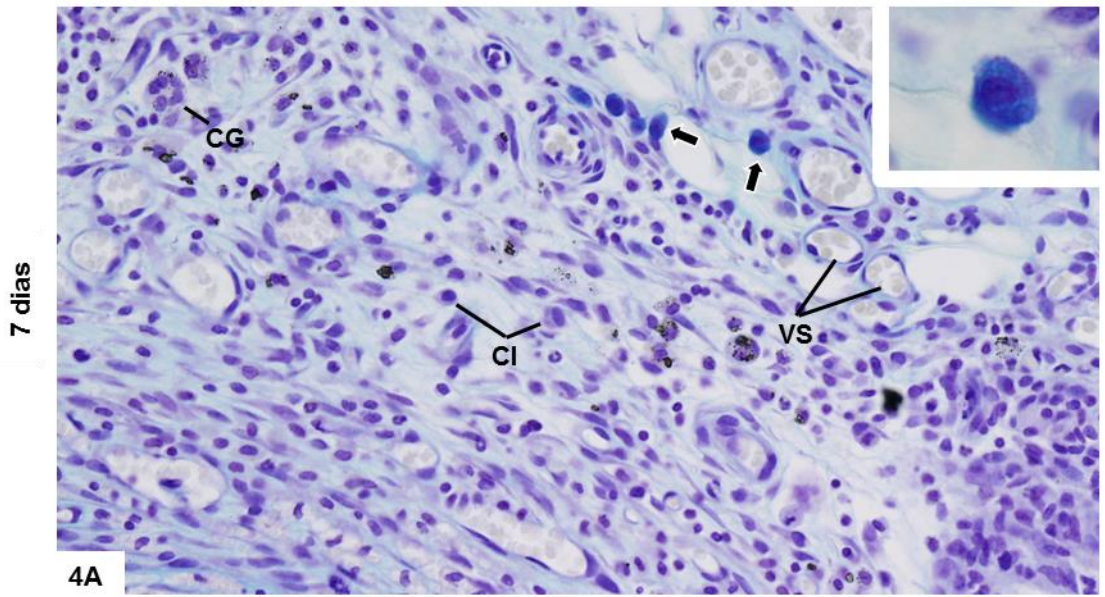
A reação imuno-histoquímica para detecção de FGF-1 revelou células com marcação citoplasmática (em castanho) nas cápsulas de todos os grupos e períodos. A imunomarcação foi observada no citoplasma das células inflamatórias e células gigantes multinucleadas bem como em alguns fibroblastos (Figs. 3A-3L); uma evidente imunomarcação foi frequentemente observada nos mastócitos (Fig. 3J). Conforme Tabela 1, o número de células imunomarcadas ao FGF-1 foi significativamente maior nas cápsulas de todos os grupos aos 7 dias. As cápsulas do GC exibiram valores significativamente maiores em comparação aos demais grupos, nos períodos de 7 e 15 dias. Em contraposição, valores significativamente maiores foram observados em BDT aos 30 e 60 dias. Nestes períodos, diferenças significantes não foram observadas entre os grupos MTA e GC.



Figuras 3A-3L – Fotomicrografias de cortes mostrando porções de cápsulas dos grupos BDT (**Figs. 3A, 3D, 3G e 3J**), MTA (**Figs. 3B, 3E, 3H e 3K**) e GC (**Figs. 3C, 3F, 3I e 3L**) nos períodos de 7 (**Figs. 3A-3C**), 15 (**Figs. 3D-3F**), 30 (**Figs. 3G-3I**) e 60 dias (**Figs. 3J-3L**). Os cortes foram submetidos à reação imuno-histoquímica para detecção de FGF-1 (em castanho) e contracolorados com hematoxilina. **Figs. 3A-3F** – Diversas células inflamatórias (setas) e alguns fibroblastos (Fb) exibem imunomarcagem citoplasmática. Células gigantes multinucleadas (CG) exibem também imunopositividade (**Fig. 3A**). **Figs. 3G-3L** – Aos 30 e 60 dias, as cápsulas exibem poucas células imunopositivas; dentre elas, algumas células inflamatórias (setas) e fibroblastos (Fb). MC, mastócito; VS, vasos sanguíneos. x465.

4.4.3 Densidade numérica de mastócitos

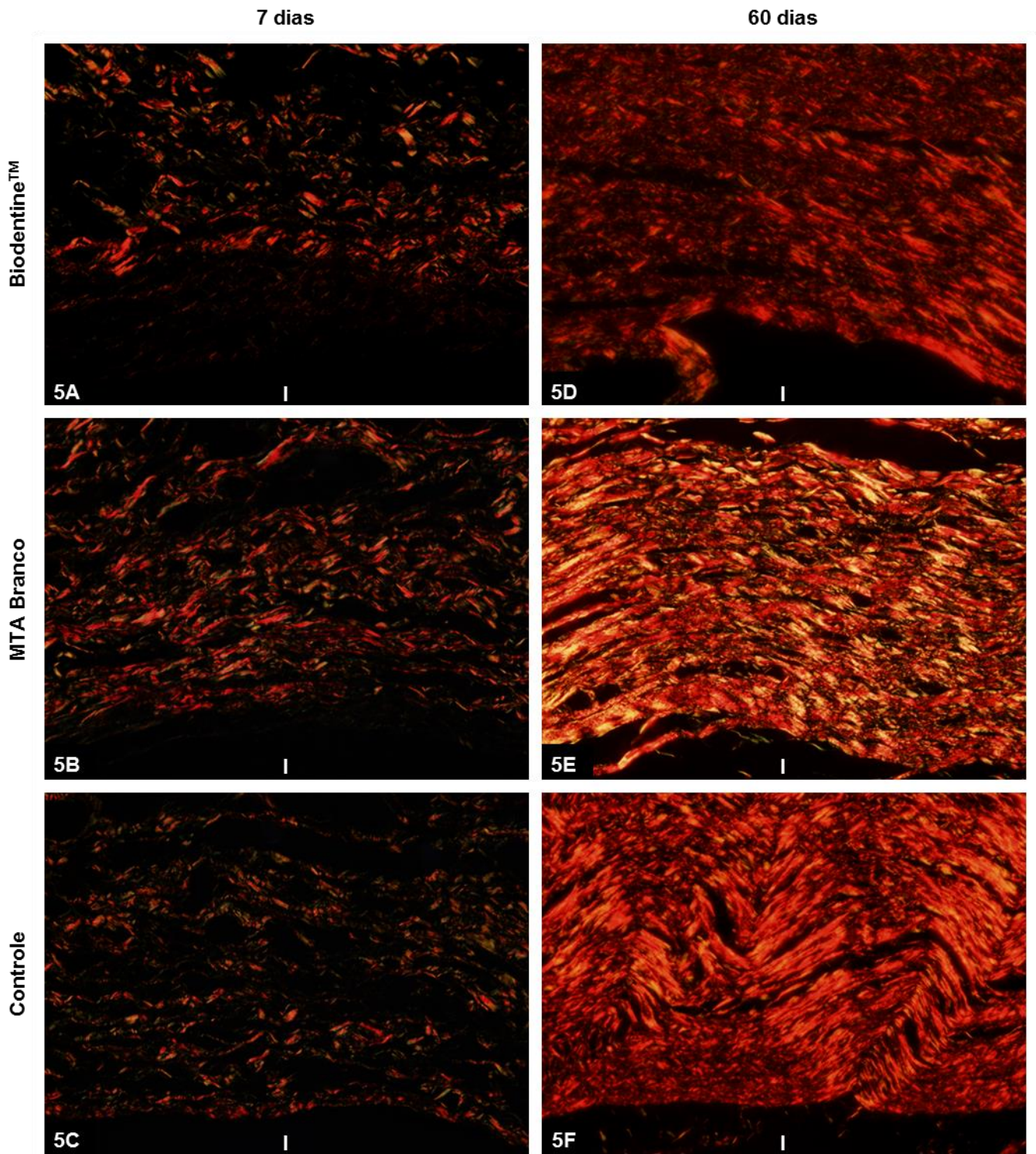
A análise dos cortes submetidos ao AB revelou a presença de células globosas/ovoides exibindo diversos grânulos citoplasmáticos fortemente positivos ao AB, características típicas de mastócitos. Estas células foram encontradas nas cápsulas de todos os grupos e períodos. Nos períodos iniciais, foram usualmente observadas entre as células inflamatórias e próximas aos vasos sanguíneos; no entanto, nos períodos de 30 e 60 dias, foram observadas entre os feixes de fibras colágenas (Figs. 4A e 4B). Um gradual e significativo aumento no número de mastócitos foi observado nas cápsulas de todos os grupos. Nos períodos de 7, 15 e 30 dias, diferenças estatisticamente significantes não foram observadas entre os grupos. Aos 60 dias, no entanto, um valor significativamente maior de mastócitos foi encontrado nas cápsulas do grupo BDT (Tabela 1).



Figuras 4A-4B – Fotomicrografias de cortes mostrando porções de cápsulas do grupo BDT nos períodos de 7 (**Fig. 4A**) e 60 dias (**Fig. 4B**) submetidos ao método histoquímico Alcian Blue (pH 2,5) e contracolorados com hematoxilina. **Fig. 4A** – Mastócitos (setas) com formato globoso/ovoide e exibindo citoplasma fortemente AB positivo (em azul turquesa) são observados próximos aos vasos sanguíneos (VS), entre as células inflamatórias (CI). **Fig. 4B** – Mastócitos (setas) exibindo citoplasma positivo ao AB são observados entre os fibroblastos (Fb) e fibras colágenas (FC). Os *insets* mostram o citoplasma dos mastócitos preenchidos por inúmeros grânulos AB positivos. CG, célula gigante multinucleada. x345; x1.310 (*insets*).

4.4.4 Mensuração do colágeno birrefringente

Aos 7 dias, as cápsulas exibiram poucas e finas fibras colágenas birrefringentes (Figs. 5A-5C). Em contraposição, fibras colágenas espessas e fortemente birrefringentes foram observadas no período de 60 dias (Fig. 5D-5F); neste período, a birrefringência na cápsula do grupo BDT (Fig. 5D) é aparentemente menor que nos demais grupos (Figs. 5E e 5F). A análise semi-quantitativa (Tabela 1) revelou que o percentual de colágeno birrefringente, em todos os grupos, foi significativamente maior aos 60 dias. As cápsulas do grupo BDT exibiram menor percentual de colágeno birrefringente em comparação ao grupo MTA, com exceção do período de 15 dias; neste período, diferenças estatisticamente significantes não foram detectadas entre os grupos.



Figuras 5A-5F – Fotomicrografias de cortes mostrando porções de cápsulas dos grupos BDT (**Figs. 5A e 5D**), MTA (**Figs. 5B e 5E**) e GC (**Figs. 5C e 5F**). Os cortes foram corados com Picrosirius e analisados em microscópio com luz polarizada. **Figs. 5A-5C** – Aos 7 dias, delgadas fibras colágenas birrefringentes apresentam-se dispersas nas cápsulas. **Figs. 5D-5F** – Aos 60 dias, as cápsulas exibem espessos feixes de colágeno birrefringente; note acentuada birrefringência nas cápsulas dos grupos MTA (**Fig. 5E**) e GC (**Fig. 5F**) em comparação ao grupo BDT (**Fig. 5D**). I, tubos de polietileno. x250.

4.4.5 Análises de correlação

O teste de Pearson revelou um coeficiente de correlação produto-momento forte e negativo ($r = -0,833$; $p \leq 0,01$) entre o número de células imunopositivas ao FGF-1 e a porcentagem de colágeno birrefringente. Esta correlação indica fortemente que estes parâmetros são inversamente proporcionais; assim, paralelamente à redução da imunoexpressão de FGF-1, ocorre um aumento no percentual de colágeno. Por outro lado, a análise do número de mastócitos e o percentual de colágeno mostrou um forte e positivo coeficiente de correlação produto-momento ($r = 0,679$; $p \leq 0,01$) entre estes parâmetros. Assim, a porcentagem de colágeno aumento paralelamente ao número de mastócitos nas cápsulas.

Tabela 1 – Número de células positivas ao FGF-1 e de mastócitos (MC) por mm² e porcentagem de colágeno birrefringente (Col) nas cápsulas dos grupos BDT, MTA e GC após 7, 15, 30 e 60 dias

Tempo		BDT	MTA	CG
7 dias	FGF-1	604,44 ± 23,04 ^{a,1}	455,56 ± 23,57 ^{b,1}	846,67 ± 35,49 ^{c,1}
	MC	4,58 ± 4,46 ^{a,1}	4,31 ± 3,62 ^{a,1}	2,50 ± 2,49 ^{a,1}
	Col	3,82 ± 0,69 ^{a-b,1}	7,64 ± 1,86 ^{a,1}	2,45 ± 0,85 ^{b,1}
15 dias	FGF-1	357,78 ± 25,34 ^{a,2}	208,89 ± 21,37 ^{b,2}	520,00 ± 39,60 ^{c,2}
	MC	15,69 ± 3,76 ^{a,2}	15,14 ± 6,50 ^{a,2}	13,75 ± 4,67 ^{a,2}
	Col	8,97 ± 1,67 ^{a,2}	11,77 ± 2,54 ^{a,1}	8,76 ± 3,97 ^{a,2}
30 dias	FGF-1	246,67 ± 12,17 ^{a,3}	140,00 ± 16,85 ^{b,3}	142,22 ± 9,30 ^{b,3}
	MC	24,44 ± 7,16 ^{a,2}	23,75 ± 7,72 ^{a,2-3}	26,53 ± 6,20 ^{a,3}
	Col	11,83 ± 1,48 ^{a,3}	24,08 ± 2,10 ^{b,2}	29,75 ± 4,31 ^{c,3}
60 dias	FGF-1	177,78 ± 20,79 ^{a,4}	82,22 ± 12,67 ^{b,4}	93,33 ± 12,67 ^{b,4}
	MC	49,03 ± 4,62 ^{a,3}	29,03 ± 3,49 ^{b,3}	35,42 ± 4,66 ^{b,4}
	Col	19,39 ± 1,90 ^{a,4}	31,85 ± 3,76 ^{b,3}	30,02 ± 1,97 ^{b,3}

Valores numéricos representam média ± desvio padrão.

A comparação entre grupos de um mesmo período é representada nas linhas por letras sobrescritas; mesma letra = não há diferença estatisticamente significativa.

A comparação entre períodos de um mesmo grupo é representada nas colunas por números sobrescritos; mesmo número = não há diferença estatisticamente significativa.

Teste Tukey ($p \leq 0,05$)

4.5 Discussão

Nossos resultados indicam que o Biodentine™ e o MTA possibilitam que mecanismos celulares e moleculares envolvidos com a proliferação de fibroblastos e a formação de colágeno modulem a substituição do processo inflamatório, inicialmente formado, por uma cápsula de tecido conjuntivo denso. Nossos resultados também indicam fortemente que o FGF-1, um fator mitogênico, deve estimular a proliferação de fibroblastos e, conseqüentemente, deve exercer um papel importante na involução do processo inflamatório e na formação de fibras colágenas. Além disso, o aumento significativo e gradativo no número de mastócitos nas cápsulas sugere que estas células devem ter uma participação na remodelação das cápsulas que circundam os materiais implantados no subcutâneo.

A evidente reação inflamatória nos períodos iniciais pode ter sido causada, além do próprio ato cirúrgico para implantação, pela liberação de íons cálcio e pelo pH alcalino decorrentes da reação dos materiais implantados. Biodentine™ proporciona um pH ao redor de 12 ao microambiente²⁵ e libera íons cálcio em quantidades superiores ao MTA.¹¹ O pH alcalino induz o recrutamento de células inflamatórias^{7,26}, enquanto alterações na concentração de cálcio podem induzir tanto a proliferação como a apoptose de linfócitos T.²⁷ Assim, é possível que, nos períodos iniciais, a alta quantidade de íons cálcio tenha promovido o recrutamento predominantemente de linfócitos, como foi observado nas cápsulas dos grupos BDT e MTA aos 7 dias.

A regressão do processo inflamatório concomitantemente à proliferação de fibroblastos foi evidente nas cápsulas adjacentes aos materiais à base de silicato de cálcio. Um aumento no conteúdo de colágeno foi também claramente observado ao longo do tempo. A análise ao microscópio de luz polarizada de cortes submetidos ao

método Picrosirius facilitou esta observação, pois o corante Sirius Red incrementa a birrefringência natural de fibras colágenas, uma vez que as moléculas de colágeno ricas em aminoácidos básicos reagem fortemente com corantes ácidos²⁸, tal como o Sirius Red. A análise quantitativa do colágeno birrefringente mostrou um aumento significativo no conteúdo de colágeno reforçando a ideia de que tanto Biodentine™ quanto MTA induzem a formação de uma cápsula de tecido conjuntivo denso ao longo do tempo e, portanto, são biocompatíveis.

Considerando que o FGF-1 possui alto potencial angiogênico e vasculogênico^{17,29,30}, o alto valor observado na imunoexpressão para FGF-1 aos 7 dias deve explicar, pelo menos em parte, a evidente vascularização observada nas cápsulas nos períodos iniciais. A proliferação de vasos sanguíneos constitui um evento importante no processo de formação do tecido de granulação.^{31,32} Diversos fatores atuam sobre os vasos sanguíneos interferindo tanto na sua permeabilidade como na diapedese de leucócitos que migram para o tecido conjuntivo, onde desempenham suas funções.³²⁻³⁴ Nossos achados revelaram que tanto as células inflamatórias (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) como alguns fibroblastos foram positivos ao FGF-1, como já relatado.^{17,35} Além de interferir na angiogênese, o FGF-1 desempenha um papel mitogênico.¹⁷ Considerando que os maiores valores de células imunopositivas ao FGF-1 foram observados aos 7 dias, é possível que este fator possa ter estimulado a proliferação de fibroblastos, explicando a evidente presença destas células no período de 15 dias; esta ideia é reforçada pelo significativo aumento de colágeno também observado aos 15 dias.

A análise morfológica revelou a presença de mastócitos nas cápsulas, principalmente, nos períodos de 30 e 60 dias. A identificação destas células foi confirmada pelo método histoquímico Alcian Blue (AB) em pH 2,5, o qual é um

corante básico catiônico bivalente que se liga aos grupos carboxila e sulfato éster.³⁶ Dessa maneira, como os grânulos dos mastócitos apresentam grande quantidade de glicosaminoglicanos sulfatados, dentre eles a heparina e o condroitin sulfato, estes reagem intensamente com o AB.^{36,37} Há fortes evidências de que os mastócitos participam do processo de cicatrização^{19,38,39} bem como do processo de reparo ósseo⁴⁰ produzindo e liberando diferentes mediadores. Dentre eles, os mastócitos liberam a histamina, a qual participa no estabelecimento e progressão da reação inflamatória.²⁰ Dessa maneira, o baixo número de mastócitos nas cápsulas observado no período de 7 dias é condizente com o moderado processo inflamatório. Por outro lado, os mastócitos podem também liberar a triptase, a qual estimula a proliferação de fibroblastos e a formação de componentes da matriz extracelular.^{38,41} Adicionalmente, no presente estudo, os mastócitos exibiram forte imunoexpressão para o FGF-1, um fator mitogênico. Assim, é possível que este fator seja liberado e, conseqüentemente, atue na complexa cascata que envolve o processo de remodelação das cápsulas formadas em resposta aos implantes no subcutâneo.

Um experimento com camundongos *Knockout* para mastócitos demonstrou ausência de cápsulas fibrosas circundando materiais implantados em subcutâneo¹⁶ indicando, portanto, que estas células têm um importante papel na formação do colágeno. No presente estudo, o aumento significativo e gradativo no número de mastócitos acompanhado pelo aumento significativo de colágeno no decorrer dos períodos reforça a ideia de que os mastócitos, além de exercerem um papel importante na modulação do processo inflamatório, devem participar nos mecanismos envolvidos com a formação do colágeno. Assim, embora no grupo BDT aos 60 dias o porcentual de colágeno tenha sido significativamente menor em

relação aos demais grupos, o número significativamente maior de mastócitos sugere que os feixes de colágeno estão em formação.

O aumento na porcentagem de fibras colágenas birrefringentes em íntimo contato com os materiais implantados, associado à ausência de processo inflamatório, indica que os materiais são biocompatíveis. Nossos resultados mostraram que o FGF-1 e os mastócitos têm uma participação no processo de remodelação das cápsulas provavelmente estimulando a proliferação de fibroblastos e, conseqüentemente, a produção de colágeno. No entanto, sabe-se que os mastócitos produzem e liberam diversas citocinas, fatores de crescimento e enzimas, dentre elas as MMPs, as quais exercem um papel importante no processo de remodelação dos componentes da matriz extracelular do tecido conjuntivo. Assim, futuros estudos são necessários para melhor compreender a participação dos mastócitos na formação e remodelação das cápsulas em resposta aos implantes no subcutâneo.

4.6 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Sr. Pedro Sérgio Simões e ao Sr. Luis Antonio Potenza pelo apoio e assistência no laboratório da Disciplina de Histologia e Embriologia. Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM (Brasil) pela bolsa concedida a Tiago S. Fonseca.

Os autores negam quaisquer conflitos de interesses.

4.7 Referências

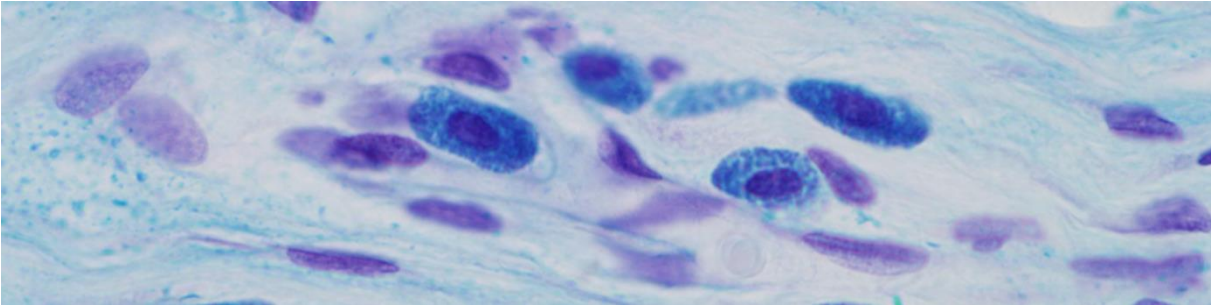
1. Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J* 2011;44:100-110.
2. Katsamakis S, Slot DE, van der Sluis LW, van der Weijden F. Histological responses of the periodontium to MTA: a systematic review. *J Clin Periodontol* 2013;40:334-344.
3. Tanomaru-Filho M, Chaves-Faleiros FB, Sacaki 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;35:1418-1421.
4. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, Kaczmarek W, Buczkowska-Radlińska J. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2013;39:743-747.
5. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater* 2008;24:149-164.
6. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* 2010;36:400-413.
7. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Mokhtari H, Roshangar L, Abasi MM, Sattari S, Abdolrahimi M. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. *J Endod* 2010;36:899-903.

8. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, 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;100:1773-1781.
9. Biodentine scientific file. Active Biosilicate Technology™, Septodont. Saint-Maur-des-Fossés Cedex, France: R&D Department; 2010. www.septodont.fr
10. 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. *Dent Mater* 2008;24:1486-1494.
11. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 2013;46:808-814.
12. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater* 2013;29:580-593.
13. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005;31:97-100.
14. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008;29:2941-2953.
15. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology* 2008;20:86-100.
16. Thevenot PT, Baker DW, Weng H, Sun MW, Tang L. The pivotal role of fibrocytes and mast cells in mediating fibrotic reactions to biomaterials. *Biomaterials* 2011;32:8394-8403.

17. Zakrzewska M, Marcinkowska E, Wiedlocha A. FGF-1: from biology through engineering to potential medical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2008;45:91-135.
18. Malemud CJ. Growth hormone, VEGF and FGF: involvement in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 2007;375:10-19.
19. Ng MF. The role of mast cells in wound healing. *Int Wound J* 2010;7:55-61.
20. Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:21-33.
21. Cerri PS, Pereira-Junior JA, Biselli NB, Sasso-Cerri E. Mast cells and MMP-9 in the lamina propria during eruption of rat molars: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Anat* 2010;217:116-125.
22. Manni ML, Czajka CA, Oury TD, Gilbert TW. Extracellular matrix powder protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Tissue Eng Part A* 2011;17:2795-2804.
23. Koshimizu JY, Beltrame FL, de Pizzol JP Jr., Cerri PS, Caneguim BH, Sasso-Cerri E. NF- κ B overexpression and decreased immunoexpression of AR in the muscular layer is related to structural damages and apoptosis in cimetidine-treated rat vas deferens. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;11:29.
24. Rich L, Whittaker P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz J Morphol Sci* 2005;22:97-104.
25. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J* 2013;46:632-641.

26. Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Saghiri MA, Zand V, Rahimi S, Ranjkesh B. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. *J Endod* 2008;34:715-717.
27. Schwarz EC, Kummerow C, Wenning AS, Wagner K, Sappok A, Wagershauser K, Griesemer D, Strauss B, Wolfs MJ, Quintana A, Hoth M. Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. *Eur J Immunol* 2007;37:2723-2733.
28. Zhang JY, Dong Q, Li TJ. Differences in collagen fibres in the capsule walls of parakeratinized and orthokeratinized odontogenic cysts. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2011;40:1296-1300.
29. Uriel S, Brey EM, Greisler HP. Sustained low levels of fibroblast growth factor-1 promote persistent microvascular network formation. *Am J Surg* 2006;192:604-609.
30. Moya ML, Garfinkel MR, Liu X, Lucas S, Opara EC, Greisler HP, Brey HM. Fibroblast growth factor-1 (FGF-1) loaded microbeads enhance local capillary neovascularization. *J Surg Res* 2010;160:208-212.
31. Tsirogianni AK, Moutsopoulos NM, Moutsopoulos HM. Wound healing: immunological aspects. *Injury* 2006;37:S5-12.
32. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 2005;15:599-607.
33. Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G, Laurent GJ. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:5-17.
34. Marton IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod* 2014;40:155-163.

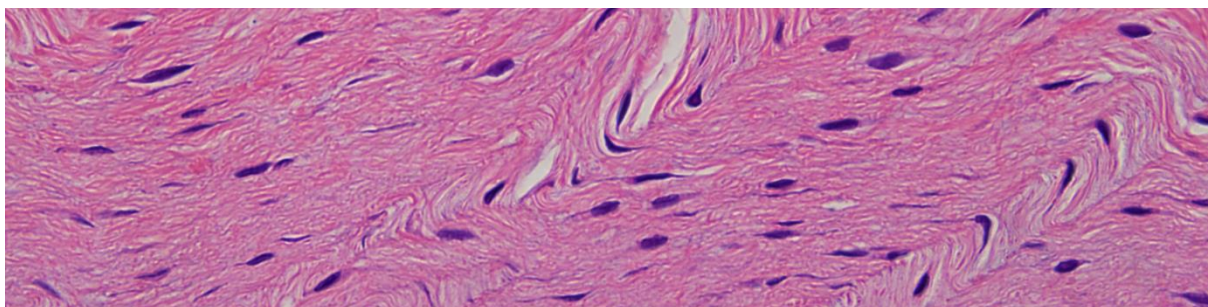
35. Rossini M, Cheunschon B, Donnert E, Ma LJ, Thomas JW, Neilson EG, Fogo AB. Immunolocalization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), its receptor (FGFR-1), and fibroblast-specific protein-1 (FSP-1) in inflammatory renal disease. *Kidney Int* 2005;68:2621-2628.
36. Scott JE. Alcian blue. Now you see it, now you don't. *Eur J Oral Sci* 1996;104:2-9.
37. Harem MK, Liman N. Histochemical method for demonstrating quail mast cell types simultaneously. *Biotech Histochem* 2009;84:275-282.
38. Hermes B, Welker P, Feldmann-Boddeker I, Kruger-Krasagakis S, Hartmann K, Zuberbier T, Henz BM. Expression of mast cell growth modulating and chemotactic factors and their receptors in human cutaneous scars. *J Invest Dermatol* 2001;116:387-393.
39. Wulff BC, Wilgus TA. Mast cell activity in the healing wound: more than meets the eye? *Exp Dermatol* 2013;22:507-510.
40. Arias-Gallo J, Chamorro-Pons M, Avendano C, Gimenez-Gallego G. Influence of acidic fibroblast growth factor on bone regeneration in experimental cranial defects using spongostan and Bio-Oss as protein carriers. *J Craniofac Surg* 2013;24:1507-1514.
41. Dražić R, Sopta J, Minić AJ. Mast cells in periapical lesions: potential role in their pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 2010;39:257-262.



5 Conclusão

-
- A redução gradativa e significativa do processo inflamatório promovido por Biodentine™ e MTA Angelus Branco indica que estes materiais são biocompatíveis;
 - A IL-6, citocina pró-inflamatória, participa da cascata de sinalização envolvida na resposta inflamatória inicialmente induzida por ambos os materiais;
 - Biodentine™ induz uma resposta inflamatória inicial mais intensa em comparação ao MTA;
 - O FGF-1, fator mitogênico, exerce um possível papel modulador no processo inflamatório, além de estimular a proliferação de fibroblastos em resposta aos implantes em subcutâneo;
 - Embora ambos os materiais induzam a formação de cápsulas de colágeno ao redor dos implantes, estas se formam mais rapidamente em resposta ao MTA;
 - A forte correlação entre o número de mastócitos e o aumento de colágeno nas cápsulas indica que estas células devem exercer um papel importante na modulação da formação de colágeno em resposta aos implantes em subcutâneo.

Referências*



* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver.
Disponível no site: <<http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/manualfoar.pdf>>

1. Alhadainy HA. Root perforations: a review of literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 78(3):368-74.
2. Arias-Gallo J, Chamorro-Pons M, Avendano C, Gimenez-Gallego G. Influence of acidic fibroblast growth factor on bone regeneration in experimental cranial defects using spongostan and Bio-Oss as protein carriers. *J Craniofac Surg.* 2013; 24(5): 1507-14.
3. Atmeh AR, Chong EZ, Richard G, Festy F, Watson TF. Dentin-cement interfacial interaction: calcium silicates and polyalkenoates. *J Dent Res.* 2012; 91(5): 454-9.
4. Bhaskar SN, Rappaport HM. Histologic evaluation of endodontic procedures in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1971; 31(4): 526-35.
5. Browne RM. Animal tests for biocompatibility of dental materials: relevance, advantages and limitations. *J Dent.* 1994; 22(Suppl 2): S21-4.
6. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2007; 40(6): 462-70.
7. Camilleri J. Investigation of Biodentine as dentine replacement material. *J Dent.* 2013; 41(7): 600-10.
8. Camilleri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *Int Endod J.* 2012; 45(8): 737-43.
9. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater.* 2005; 21(4): 297-303.
10. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2004; 37(10): 699-704.

11. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater.* 2013; 29(5): 580-93.
12. Chang SW. Chemical characteristics of mineral trioxide aggregate and its hydration reaction. *Restor Dent Endod.* 2012; 37(4): 188-93.
13. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod.* 2007; 33(3): 295-8.
14. Cornelio ALG, Salles LP, Campos-da-Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod.* 2011; 37(2): 203-10.
15. Formosa LM, Mallia B, Bull T, Camilleri J. The microstructure and surface morphology of radiopaque tricalcium silicate cement exposed to different curing conditions. *Dent Mater.* 2012; 28(5): 584-95.
16. 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. *Int Endod J.* 2012; 45(4): 326-36.
17. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater.* 2013; 29(2): e20-8.
18. 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. *J Endod.* 2013; 39(3): 380-4.
19. Guttuso J. Histopathologic study of rat connective tissue responses to endodontic materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1963; 16(6): 713-27.

20. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J.* 2013; 46(9): 808-14.
21. Han L, Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int Endod J.* 2011; 44(12): 1081-7.
22. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Bernabé PFE, Dezan-Jr E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999; 25(3): 161-6.
23. Húngaro-Duarte MA, El-Kadre GDO, Vivan RR, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Moraes IG. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod.* 2009; 35(5): 737-40.
24. Katsamakis S, Slot DE, van der Sluis LW, van der Weijden F. Histological responses of the periodontium to MTA: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2013; 40(4): 334-44.
25. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod.* 2006; 32(6): 569-72.
26. Komabayashi T, Spangberg LS. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyzer. *J Endod.* 2008; 34(1): 94-8.
27. Koubi G, Colon P, Franquin JC, Hartmann A, Richard G, Faure MO, et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(1): 243-9.
28. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2012; 45(5): 439-48.

29. 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. *Dent Mater.* 2008; 24(11): 1486-94.
30. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod.* 1993; 19(11): 541-4.
31. Leiendecker AP, Qi YP, Sawyer AN, Niu LN, Agee KA, Loushine RJ, et al. Effects of calcium silicate-based materials on collagen matrix integrity of mineralized dentin. *J Endod.* 2012; 38(6): 829-33.
32. Malemud CJ. Growth hormone, VEGF and FGF: involvement in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta.* 2007; 375(1-2):10-9.
33. Martin LR, Gilbert B, Dickerson AW 2nd. Management of endodontic perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982; 54(6): 668-77.
34. Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MAH, Grizzo LT, Rabelo Buzalaf MA, et al. pH, calcium ion release, and setting time of an experimental mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. *J Endod.* 2011; 37(6): 844-6.
35. Mente J, Hage N, Pfefferle T, Koch MJ, Geletneky B, Dreyhaupt J, et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate: repair of root perforations. *J Endod.* 2010; 36(2): 208-13.
36. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013; 39(6): 743-7.
37. Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 1981; 7(8): 355-67.

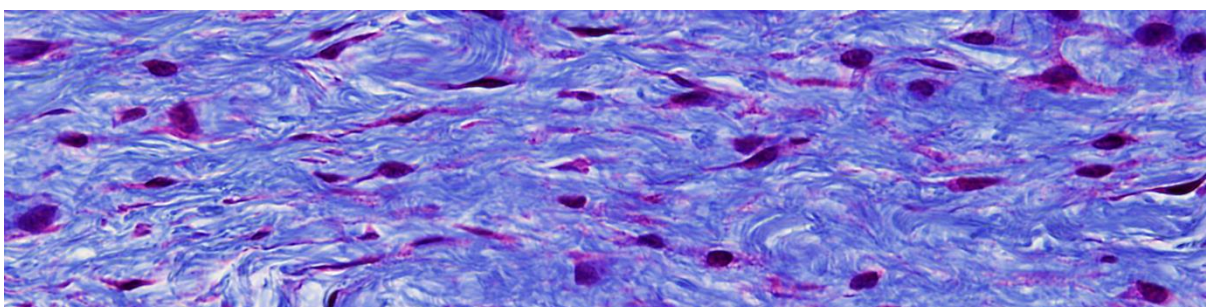
38. Pairokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review – Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010; 36(1): 16-27.
39. Pairokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review – Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.* 2010; 36(3): 400-13.
40. Raskin A, Eschrich G, Dejou J, About I. In vitro microleakage of Biodentine as a dentin substitute compared to Fuji II LC in cervical lining restorations. *J Adhes Dent.* 2012; 14(6): 535-42.
41. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater.* 2008; 24(2): 149-64.
42. Rossini M, Cheunsuchon B, Donnert E, Ma LJ, Thomas JW, Neilson EG, et al. Immunolocalization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), its receptor (FGFR-1), and fibroblast-specific protein-1 (FSP-1) in inflammatory renal disease. *Kidney Int.* 2005; 68(6): 2621-8.
43. Samiee M, Eghbal MJ, Pairokh M, Abbas FM, Asgary S. Repair of furcal perforation using a new endodontic cement. *Clin Oral Investig.* 2010; 14(6): 653-8.
44. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2005; 31(2): 97-100.
45. Sawyer AN, Nikonov SY, Pancio AK, Niu LN, Agee KA, Loushine RJ, et al. Effects of calcium silicate-based materials on the flexural properties of dentin. *J Endod.* 2012; 38(5): 680-3.

46. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1813(5): 878-88.
47. Seltzer S, Sinai I, August D. Periodontal effects of root perforations before and during endodontic procedures. *J Dent Res*. 1970; 49(2): 332-9.
48. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Mokhtari H, Roshangar L, Abasi MM, et al. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. *J Endod*. 2010; 36(5): 899-903.
49. Shayegan A, Jurysta C, Atash R, Petein M, Abbeele AV. Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. *Pediatr Dent*. 2012; 34(7): e202-8.
50. Silva GF, Bosso R, Ferino RV, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res A*. 2014 Feb 4. doi: 10.1002/jbm.a.35099.
51. Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J*. 2011; 44(2): 100-10.
52. Silva MJB, Vieira LQ, Sobrinho AP. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105(5): e70-6.
53. Sinai IH. Endodontic perforations: their prognosis and treatment. *J Am Dent Assoc*. 1977; 95(1): 90-5.
54. Tanomaru-Filho M, Chaves-Faleiros FB, Sacaki 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(10): 1418-21.

-
55. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review – Part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 2010; 36(2): 190-202.
 56. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966; 21(3): 379-87.
 57. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. II. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1967; 24(5): 674-83.
 58. Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res.* 2012; 91(12): 1166-71.
 59. Uriel S, Brey EM, Greisler HP. Sustained low levels of fibroblast growth factor-1 promote persistent microvascular network formation. *Am J Surg.* 2006; 192(5): 604-9.
 60. Valles M, Mercade M, Duran-Sindreu F, Bourdelande JL, Roig M. Influence of light and oxygen on the color stability of five calcium silicate-based materials. *J Endod.* 2013; 39(4): 525-8.
 61. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, 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.
 62. Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Saghiri MA, et al. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. *J Endod.* 2008; 34(6): 715-7.
 63. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* 2008; 29(20): 2941-53.

64. Yildirim T, Gencoglu N, Firat I, Perk C, Guzel O. Histologic study of furcation perforations treated with MTA or Super EBA in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100(1): 120-4.
65. Zakrzewska M, Marcinkowska E, Wiedlocha A. FGF-1: from biology through engineering to potential medical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008; 45(1): 91-135.
66. Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Hakkinen L, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod.* 2013; 39(4): 478-83.

* Anexo



* Documento de proibidade junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FOAr/UNESP)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



DECLARAÇÃO

DECLARO, para os devidos fins, que a CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade de Odontologia, recebeu o projeto **"AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA REAÇÃO PROVOCADA POR BIODENTINE™ E MTA BRANCO EM SUBCUTÂNEO E NO PERIODONTO SUBJACENTE A PERFURAÇÕES DE FURCA EM MOLARES DE RATOS"** (Processo CEUA nº 15/2012), apresentado pelo Pesquisador Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI. O referido projeto deu entrada nesta Comissão em 29/06/2012, não apresenta pendências até o momento, e seu relatório final deverá ser entregue em JUNHO/2014.

Araraquara, 07 de fevereiro de 2014.

Elisa Maria Ap. Giro
Profa. Dra. **ELISA MARIA APARECIDA GIRO**
1º Coordenador Substituto da CEUA

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 14 de março de 2017
(Direitos de publicação reservados ao autor)
Araraquara, 14 de março de 2014

Tiago Silva da Fonseca