



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Mateus Machado Delfino

**Reação tecidual provocada pelos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex:
análises morfológica e imuno-histoquímica**

Araraquara

2018



UNESP – Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Mateus Machado Delfino

**Reação tecidual provocada pelos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex:
análises morfológica e imuno-histoquímica**

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

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

Araraquara

2018

Delfino, Mateus Machado

Reação tecidual provocada pelos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex: análises morfológica e imuno-histoquímica / Mateus Machado Delfino. – Araraquara: [s.n.], 2018
75 f.; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

1. Teste de materiais 2. Endodontia 3. Histologia I. Título

Mateus Machado Delfino

**Reação tecidual provocada pelos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex:
análises morfológica e imuno-histoquímica**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

2º Examinador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

3º Examinador: Prof. Dr. Walter Antônio de Almeida

Araraquara, 21 de março de 2018.

DADOS CURRICULARES

Mateus Machado Delfino

NASCIMENTO: 06 de dezembro de 1993 – São José do Rio Preto – São Paulo

FILIAÇÃO: José Antônio Delfino

Silvana Cláudio Machado Delfino

2012-2015: Graduação em Odontologia pelo Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, Barretos-SP.

2016-2017: Especialização em Endodontia pela Faculdade do Centro Oeste Paulista - FACOP, Bauru-SP.

2016-2018: Mestrado em Odontologia, área de concentração em Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, Araraquara-SP.

AGRADECIMENTOS

Talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer a todos que me apoiaram, ajudaram e colaboraram para esta conquista, com o devido merecimento. Nunca estamos sozinhos na nossa caminhada do dia a dia, sempre precisamos de um ombro amigo, um amparo, um porto seguro, que nos conforte nos momentos difíceis e que possa celebrar nossas vitórias, sem sombra de dúvidas, não somos nada sem nossa família. Agradeço imensamente aos meus pais por todo apoio e confiança depositada em mim.

Ao Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, por ter me recebido inicialmente na Faculdade de Odontologia de Araraquara, pela colaboração e atenção no decorrer desta pesquisa e por todos “puxões de orelha” nas disciplinas cursadas, sem dúvida todos os conselhos me ajudaram a crescer e evoluir profissionalmente.

A Prof. Dr^a Juliane Maria Guerreiro-Tanomaru, que desde o início não mediu esforços, ajudando na manipulação dos materiais e também durante os procedimentos cirúrgicos, onde sempre esteve me apoiando, buscando sempre o melhor.

Aos técnicos Pedro Sérgio Simões e Luis Antonio Potenza por todo auxílio e colaboração nas atividades desenvolvidas no laboratório de Histologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela concessão de auxílio financeiro em forma de bolsa de estudo.

Aos meus amigos da Pós-Graduação e do laboratório de Histologia e Embriologia que me acolheram com muito carinho. Obrigado, Tiago, Fabiane, Roberto, José Paulo e Flávia pela convivência, companheirismo e por todo ensinamento transmitido por vocês, aprendi e continuo aprendendo muito com vocês, afinal, eu sou o caçula do laboratório, o filho mais novo do Prof. Paulo e também o mais querido.

A Prof. Dr^a Estela Sasso-Cerri, pela atenção e essencial colaboração no desenvolvimento deste projeto.

E por fim, gostaria de fazer um agradecimento especial ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri, exemplo de ser humano e profissional, um professor que sem nenhuma dúvida sempre serei grato e irei lembrar com imenso carinho e alegria. Obrigado por toda sua dedicação, esforço, ética e amor pela pesquisa e pelos seus alunos. Precisamos cada vez mais de profissionais como o senhor, que é um exemplo no qual possamos nos espelhar e quem sabe um dia conseguir realizar metade do lindo trabalho desenvolvido pelo senhor. Obrigado por todos os conselhos, risadas, cafés compartilhados e por tudo que me ensinou e que continuará ensinando no Doutorado. Sem sua orientação e ajuda, nada disso ser tornaria possível. Muito obrigado!

Delfino MM. Reação tecidual provocada pelos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex: análises morfológica e imuno-histoquímica [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Modificações nos cimentos endodônticos tem sido frequentemente realizada a fim da obtenção de um material biocompatível e que favoreça a reparação dos tecidos periodontais. Assim, o GuttaFlow bioseal (GFB) foi lançado no mercado a partir de uma modificação do cimento à base de silicone GuttaFlow; no GFB foi adicionado ao cimento partículas de vidro cerâmico bioativo. Por outro lado, o MTA Fillapex (MTAF), um cimento à base de silicato tricálcico, também teve a substituição do agente radiopacificador óxido de bismuto pelo tungstato de cálcio. O nosso propósito foi avaliar a biocompatibilidade dos cimentos GFB e o MTAF (contendo tungstato de cálcio), em subcutâneo de ratos. Tubos de polietileno foram preenchidos com os respectivos materiais GFB (n=20), MTAF (n=20) e Endofill (EF; n=20) e implantados no subcutâneo de ratos. No grupo controle GC (n=20), foram implantados tubos vazios. Após 7, 15, 30 e 60 dias, os tubos implantados com os tecidos circundantes foram removidos e incluídos em parafina. O número de células inflamatórias (CI) e a espessura das cápsulas foram obtidos a partir de cortes corados com HE. Alguns cortes foram corados com tricrômico de Masson para verificar a formação de colágeno nas cápsulas enquanto o método de von Kossa foi realizado para detectar depósitos de cálcio. A interleucina-6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória, e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foram detectados por meio de reações imuno-histoquímicas. O número de células IL-6-imunopositivas foi estimado nas cápsulas. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). De 7 para 60 dias, todos os grupos apresentaram significativa redução no número de CI, células IL-6-imunopositivas e na espessura das cápsulas, além de aparente diminuição na imunoexpressão para VEGF. Em todos os períodos, os menores valores destes parâmetros foram observados nas cápsulas do GC. Aos 7, 15 e 30 dias, o número de CI foi significativamente menor no GFB em comparação aos MTAF ($p < 0,0001$) e EF ($p < 0,0001$), enquanto que, aos 60 dias, significantes diferenças não foram detectadas entre os grupos GFB e MTAF ($p = 0,58$). Em todos os períodos, o número de células imunopositivas à IL-6 e a espessura das cápsulas foram significativamente menores no GFB em comparação ao MTAF ($p < 0,0001$). No entanto, os valores de CI, células IL-6-imunopositivas e a espessura das cápsulas foram menores significativamente no grupo MTAF em comparação ao EF ($p < 0,0001$), em todos os períodos. Aos 60 dias, as cápsulas de GFB e MTAF mostraram poucas CI entre os fibroblastos e feixes de fibras colágenas. Estruturas positivas ao von Kossa foram observadas nas cápsulas de GFB e MTAF. Portanto, nossos resultados mostraram que a reação imuno-inflamatória induzida pelos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex regridem com o decorrer do tempo, possibilitando ao hospedeiro, a formação de cápsulas de colágeno, indicando que estes cimentos são biocompatíveis, enquanto no Endofill não houve reparo ao decorrer do tempo. Além disso, nossos achados sugerem que o GuttaFlow bioseal e o MTA Fillapex apresentam potencial bioativo.

Palavras-chave: Teste de materiais. Endodontia. Histologia.

Delfino MM. Tissue reaction promoted by GuttaFlow bioseal and MTA Fillapex sealers: morphological and immunohistochemical analyses [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

Endodontic cements have been often modified in attempt to obtain biocompatible materials, which are able to promote the repair of periodontal tissues. GuttaFlow bioseal (GFB) was launched on the market from a modification of GuttaFlow silicone cement, containing bioactive glass ceramic. In the MTA Fillapex (MTAF), a tricalcium silicate-based material, the bismuth oxide radiopacifying agent was replaced by calcium tungstate. The purpose of this study was to evaluate the tissue reactions promoted by GFB and MTAF in comparison with Endofill (EF), a zinc oxide eugenol-based root-filling material, which has a long clinical track record. Polyethylene tubes filled with GFB (n=20), MTAF (n=20) or EF (n=20) were implanted into rat subcutaneous. In the control group (CG; n=20), empty tubes were implanted. After 7, 15, 30 and 60 days, the implanted tubes surrounded by connective tissue were fixed and embedded in paraffin. The number of inflammatory cells (IC) and the capsule thickness were obtained in the HE-stained sections. Some sections were stained with Masson's trichrome for the collagen evaluation while the von Kossa method was performed for detection of calcium deposits. Interleukin-6 (IL-6), a pro-inflammatory cytokine, and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by immunohistochemical reactions. The number of IL-6-immunopositive cells was estimated in the capsules. Data were analyzed by two-way ANOVA and Tukey post-test ($p \leq 0.05$). From 7 to 60 days, all groups showed a significant reduction in the capsule thickness, in the number of IC and IL-6-immunopositive cells as well as an apparent decrease in the VEGF immunoreexpression. In all periods, the lowest values of these parameters were observed in the CG group. At 7, 15 and 30 days, the number of IC was reduced significantly in the GFB in comparison with MTAF ($p < 0.0001$) and EF ($p < 0.0001$). At 60 days, significant differences were not detected between the GFB and MTAF groups ($p = 0.58$). In all periods, the number of IL-6-immunopositive cells and the capsule thickness were significantly lower in GFB than MTAF ($p < 0.0001$). However, the values of IC, IL-6-immunopositive cells and capsule thickness were significantly lower in MTAF in comparison to EF ($p < 0.0001$), in all periods. At 60 days, the thin capsules of GFB and MTAF exhibited few IC among fibroblasts and collagen fibers bundles. In addition, von Kossa-positive structures were observed in the capsules of GFB and MTAF, in all periods. Therefore, the regression of the immune-inflammatory response associated to the formation of collagen-rich capsules indicates that GuttaFlow and MTAF are biocompatible while the tissue damaged by Endofill was not recovered over time. In addition, our findings suggest that GuttaFlow bioseal and MTA Fillapex exhibit bioactive.

Keywords: Materials testing. Endodontics. Histology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3 PROPOSIÇÃO.....	18
4 MATERIAL E MÉTODO.....	19
4.1 Animais.....	19
4.2 Procedimentos Cirúrgicos.....	21
4.3 Processamento Histológico.....	25
4.4 Métodos de Análise.....	27
4.4.1 Descrição morfológica.....	27
4.4.2 Densidade numérica de células inflamatórias.....	28
4.4.3 Espessura das cápsulas adjacentes aos implantes.....	30
4.4.4 Detecção imuno-histoquímica de IL-6.....	31
4.4.5 Detecção imuno-histoquímica de VEGF.....	32
4.4.6 Reação histoquímica de von Kossa.....	33
4.5 Análise Estatística.....	34
5 RESULTADOS.....	35
5.1 Análise Morfológica.....	35
5.2 Densidade Numérica de Células Inflamatórias.....	37
5.3 Espessura das Cápsulas Adjacentes aos Implantes.....	38
5.4 Detecção Imuno-Histoquímica para Il-6 e Densidade Numérica de Células Imunopositivas.....	47
5.5 Resultados da Reação Imuno-Histoquímica para Detecção de VEGF.....	50
5.6 Reação Histoquímica de von Kossa.....	53
6 DISCUSSÃO.....	58
7 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

O sucesso no tratamento endodôntico depende da obturação adequada do sistema de canais radiculares com um material estável e com propriedades físico-químicas e biocompatibilidade, uma vez que estes materiais podem ter contato direto com os tecidos periapicais^{3,37,32}. A biocompatibilidade é uma das características mais importantes dos cimentos endodônticos, pois os materiais liberam substâncias que interagem com os tecidos perirradiculares, promovendo uma resposta que interfere com a reparação dos tecidos periodontais e, portanto, influenciando o prognóstico do tratamento^{51,88}.

O cimento de óxido de zinco e eugenol é um cimento utilizado há muitos anos em Endodontia⁹⁵. De fato, o óxido de zinco e eugenol é o mais comum dos componentes dos materiais de preenchimento de canais, porém não apresenta biocompatibilidade quando os resultados em tecidos subcutâneos são comparados^{68,95,76}. Estudos atribuem a baixa tolerância tecidual, devido ao eugenol e sua liberação lenta e prolongada. Estudos sobre cimentos à base de óxido de zinco e eugenol atribuem a baixa tolerância tecidual, devido ao eugenol e sua liberação lenta e prolongada. Além disso, os íons de zinco causam uma atividade deletéria secundária, levando a um quadro de inflamação crônica^{26,71,8,76}. O cimento Endofill apresentou maior citotoxicidade quando adicionado a cultura de células de fibroblastos em comparação com os cimentos AH Plus, Sealapex e MTA Fillapex. O intenso efeito tóxico causado pelo Endofill foi confirmado por meio da avaliação morfológica, na qual induziu reação inflamatória intensa e persistente^{95,76}.

Na busca por materiais menos irritantes aos tecidos perirradiculares e que promovam uma melhor reparação, diversas pesquisas têm procurado o melhor cimento biologicamente compatível aos tecidos periapicais^{8,32}. Os cimentos à base de silicato tricálcico e silicone foram desenvolvidos a fim de aprimorar as características físicas dos cimentos endodônticos, como a porosidade, o escoamento e a adesão às paredes do canal radicular⁵. Cimentos de silicato de cálcio possuem comportamento bioativo, são biointerativos, capazes de liberarem íons para nucleação dos depósitos de apatita na superfície em um curto período de indução, sendo fundamentais para induzir a remineralização^{35,36}.

O MTA Fillapex surgiu numa tentativa de combinar as propriedades físico-químicas de um cimento endodôntico, com as propriedades do MTA (mineral trióxido agregado), conhecido por sua biocompatibilidade e bom selamento^{79,89}. De acordo com o fabricante, o novo MTA Fillapex apresenta em sua composição salicilato de resina, tungstato de cálcio,

resinas diluídas, resina natural, resina nanoparticulada, sílica nanoparticulada e MTA. No entanto, tem sido sugerido que este cimento não apresenta boa resposta quando avaliado *in vitro* e reação tecidual quando implantado no subcutâneo de ratos^{107,60,94,12}. A nova fórmula deste cimento, apresenta a troca do radiopacificador, sendo o óxido de bismuto substituído pelo tungstato de cálcio, devido ao escurecimento coronário, provocado pelo radiopacificador. O novo MTA Fillapex apresenta propriedades físico-químicas satisfatórias, tais como tempo de presa, escoamento, radiopacidade e pH alcalino⁵⁹.

GuttaFlow bioseal, é um cimento bioativo, a base de silicone, que associa gutta-percha em pó, polidimetilsiloxano, catalisador de platina, dióxido de zircônio, prata (conservante), corante e vidro cerâmico bioativo. Este cimento foi lançado no mercado na tentativa de oferecer melhores propriedades físicas e biológicas. O GuttaFlow bioseal foi desenvolvido para melhorar a bioatividade de GuttaFlow favorecendo a regeneração de tecidos periodontais da região do periápice. O GuttaFlow bioseal apresenta pouca solubilidade e porosidade, capacidade de alcalinização em comparação a outros cimentos endodônticos^{2,36,17,93}. De acordo com o fabricante, ao entrar em contato com fluidos periapicais, o material bioativo disponibiliza alguns constituintes tais como cálcio e silicatos que apresentam um papel importante no processo de reparação¹⁸. Portanto, a resposta tecidual dos cimentos endodônticos é um dos parâmetros para o sucesso endodôntico. Devido as alterações na composição do GuttaFlow bioseal, com o acréscimo do vidro bioativo e no MTA Fillapex, onde o radiopacificador foi alterado, torna-se oportuno investigar a reação tecidual provocada por estes cimentos no tecido subcutâneo de ratos, devido estes materiais serem novos e não existir estudos *in vivo* do Guttaflow bioseal e do novo MTA Fillapex.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A primeira base científica para a Endodontia clínica moderna foi estabelecida por Davis em 1922. Ele foi o primeiro a sugerir que o tratamento cuidadoso dos tecidos periapicais, é a chave para o sucesso do tratamento endodôntico (Ricucci, Langeland⁷³, 1998). É reconhecido que os cimentos extravasados além da constrição apical, entram em contato com os tecidos periapicais, podendo agredi-los (Poggio et al⁶⁹., 2017).

Aos cimentos endodônticos, são exigidas algumas propriedades para que sejam eficazes no selamento e finalização do tratamento do canal, como selamento de túbulos dentinários e ramificações do canal principal (Guinesi et al⁴¹., 2014), ação bactericida e/ou bacteriostática (Faria-Júnior et al³¹., 2013; Oliveira, Duque⁶⁵, 2013), selamento dos espaços vazios para evitar drenagem de exsudato (Zhou et al¹⁰⁵., 2013; Siew et al⁸⁴., 2015), biocompatibilidade e capacidade de estimular o reparo periapical (Yesilsoy et al¹⁰³., 1988; Leonardo et al⁵⁴., 1998; Leonardo et al⁵⁵., 1999; da Silva et al²⁰., 2011; Bin et al¹⁰., 2012; Kala et al⁴⁷., 2015). A citotoxicidade é um dos aspectos da biocompatibilidade durante a seleção de um cimento endodôntico (Mandal et al⁵⁸., 2014). Para encontrar um selador ideal, muitos materiais foram desenvolvidos com base em ionômero de vidro, óxido de zinco e eugenol, hidróxido de cálcio, resina epóxi, biocerâmicos, agregado trióxido mineral (MTA) e à base de silicone (Scelza et al⁷⁹., 2012; Faroni et al³⁰., 2013; Zhou et al¹⁰⁵., 2013; Baldasso⁵, 2014; Mandal et al⁵⁸., 2014; Kilkis et al⁴⁹., 2015).

A fórmula do cimento tipo Grossman, conhecida comercialmente no Brasil como Endofill (Endofill²⁹, 2016), constitui-se num dos cimentos mais comumente utilizados (Leonardo et al⁵⁴., 1998; Yigiti et al¹⁰⁴., 2012). A popularidade deste cimento resulta do seu baixo custo e de suas propriedades físicas e químicas satisfatórias (Leonardo et al⁵⁴., 1998; Baldasso et al⁶., 2016). Dentre as propriedades físicas e químicas satisfatórias, incluem a sua boa capacidade seladora, baixa permeabilidade, estabilidade dimensional, adesividade adequada, baixa solubilidade e baixa desintegração (Leonardo et al⁵⁴., 1998). Dessa maneira, durante várias décadas, os cimentos mais utilizados foram aqueles cuja sua base é constituída de óxido de zinco e eugenol. No entanto, o cimento tipo Grossman é um material irritante ao tecido conjuntivo, gerando uma resposta inflamatória exacerbada (Leonardo et al⁵⁴., 1998; Tanomaru-Filho et al⁹¹., 1998; Shvero et al⁸³., 2013).

A composição do Endofill é basicamente a mesma do tradicional cimento tipo Grossman, contendo em seu pó óxido de zinco, resina hidrogenada, subcarbonato de bismuto, sulfato de bário e borato de sódio. O líquido é constituído de eugenol e óleo de

amêndoas doces (Endofill²⁹, 2016). Em relação as suas propriedades, o cimento Endofill possui escoamento de 41mm, solubilidade de 4,34% e porosidade de 1,8%. De acordo com o fabricante, o tempo de trabalho a 37°C é de aproximadamente 20 minutos (Scelza et al⁷⁹., 2012; Endofill²⁹, 2016).

Na última década, o MTA, material a base de silicato de cálcio, tornou-se popular na Endodontia (da Silva et al²¹., 2016). O MTA possui propriedades biológicas e físico-químicas adequadas, excelente biocompatibilidade, bioatividade e é um ótimo osteocondutor (Vitti et al⁹⁸., 2013; Collado-González et al¹⁷., 2017), sendo considerado um material próximo ao ideal quando refere-se a termos de biocompatibilidade (Bin et al¹⁰., 2012; Marins et al⁵⁹., 2017). O MTA é um pó composto principalmente por silicato tricálcico (66,1%), silicato dicálcio, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, dióxido de silício e óxido de alumínio, e também contém 14% de óxido de bismuto (Bi₂O₃), utilizado como agente radiopacificador (Camilleri et al¹⁵., 2009; Camilleri et al¹⁶., 2013). O pH alcalino (10,2-12,5) atua sobre as estruturas proteicas de alguns micro-organismos, promovendo danos a integridade da membrana. Além disso, o pH altamente elevado, quando em contato com tecido conjuntivo, ativa e estimula a expressão da fosfatase alcalina, favorecendo a formação e deposição de tecido mineralizado, além de favorecer a formação de um tecido conjuntivo fibroso (Bin et al¹⁰., 2012; Silva et al⁸⁵., 2013).

Devido as vantagens do MTA, como biocompatibilidade, baixa citotoxicidade, baixa microinfiltração e a capacidade de tomar presa na presença de sangue ou umidade, este material tem sido amplamente utilizado em Endodontia para o selamento de perfurações, em casos de dentes com rizogênese incompleta, capeamento pulpar, pulpotomia e como material retrobturador em cirurgia parendodôntica (Holland et al⁴⁶., 1999; Tanomaru-Filho et al⁹²., 2009; Bin et al¹⁰., 2012; Silva et al⁸⁵., 2013; Faraoni et al³⁰., 2013; da Silva et al²¹., 2016). Entretanto, apesar de suas características favoráveis, o MTA não exibe propriedades físicas compatíveis para ser utilizado com um cimento obturador no tratamento endodôntico, devido ao seu tempo de trabalho, tempo de inserção e manipulação difícil (Massi et al.,⁶² 2011; Viola et al⁹⁷., 2012; Bin et al¹⁰., 2012; Marques et al⁶⁰., 2013; Silva et al⁸⁵., 2013; Silva et al⁸⁶., 2014; Faraoni et al³⁰., 2013). As excelentes propriedades do MTA promoveram uma corrida para desenvolver novos cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio (Collado-González et al¹⁷., 2017). Com isso, novos cimentos endodônticos a base de MTA têm sido desenvolvidos, para serem utilizados na obturação dos canais radiculares.

Nos últimos anos, foi lançado no mercado o MTA Fillapex (Angelus, Londrina, PR, Brasil) como um cimento obturador, composto por MTA, resina salicilato, resina natural, óxido de bismuto e sílica. Dentre as suas propriedades físicas, este cimento apresenta tempo de trabalho de 35 minutos, capacidade de fluxo de 27,66mm, presa final após 18-20 horas, densidade óptica 77% e solubilidade de 20-30% (Gomes-Filho et al⁴⁰., 2012; Silva et al⁸⁵., 2013; Vitti et al⁹⁸., 2013). No entanto, os resultados relacionados com a resposta biológica do MTA Fillapex são conflitantes (Vitti et al⁹⁸., 2013). A alta fluidez, solubidade e escoamento podem comprometer seu desempenho clínico, aumentando a chance de extravasamento do material para os tecidos periapicais, durante a obturação e liberação química das resinas presentes em sua composição, o que pode interferir na biocompatibilidade do material (Faraoni et al³⁰., 2013).

Recentemente a empresa Angelus lançou um novo MTA Fillapex (Angelus, Londrina, PR, Brasil), composto de duas pastas. Após a manipulação, este cimento consiste em MTA, resina salicilato, resina natural, resina diluente, tungstato de cálcio e sílica nanoparticulada. Na nova composição do MTA Fillapex, o radiopacificador foi alterado, sendo óxido de bismuto substituído pelo tungstato de cálcio, na tentativa de melhorar suas propriedades físico-químicas e também prevenir o escurecimento da coroa (Marins et al⁵⁹., 2017; MTA Fillapex,⁶³ 2017).

Entre os cimentos à base de silicone, GuttaFlow foi desenvolvido para melhorar as características físicas, tais como porosidade, fluxo e adesão às paredes do canal radicular (Baldasso⁶, 2016), superando as desvantagens da técnica de obturação com guta-percha aquecida (Nawal et al⁶⁴., 2011; Scelza et al⁷⁹., 2012; Kala et al⁴⁷., 2015; Silva et al⁸⁷., 2015; Waistein et al¹⁰⁰., 2016), apresenta uma técnica de obturação não aquecida, combinando cimento e guta percha em um só produto (Herbet et al⁴⁵., 2009; Nawal et al⁶⁴., 2011).

Em 2004, o cimento endodôntico GuttaFlow, cuja base é de silicone, foi introduzido no mercado. Este cimento contém guta-percha em pó, uma matriz de polidimetilsiloxano, óleo de silicone, óleo de parafina, agente catalítico de platina, dióxido de zircônio, nanopartículas de prata e corante (Zielinsk et al¹⁰⁶., 2008; Gencoglu et al³⁷., 2009; Daming et al²²., 2011; Willershausen et al¹⁰¹., 2011). As nanopartículas de prata foram agregadas com o intuito de proporcionarem um efeito antimicrobiano e conservar o material (Gencoglu et al³⁷., 2009; Willershausen et al¹⁰¹., 2011). O GuttaFlow apresenta propriedades físicas e químicas adequadas, que permitem um bom selamento e biocompatibilidade favorável aos tecidos periapicais (Zoufan et al¹⁰⁸., 2011; Wastein et al¹⁰⁰., 2016). Sua baixa toxicidade tem

sido demonstrada e comparada com a de diferentes cimentos endodônticos, incluindo AH Plus, Endo Rez, Apexit, Epiphany e Acroseal (Savariz et al⁷⁷., 2010). A ausência de eugenol é uma das características do material que apresenta radiopacidade semelhante aos cimentos a base de resina (Savariz et al⁷⁷., 2010), dentro do recomendado pela ADA e sua fluidez permite o preenchimento de canais laterais e de túbulos dentinários. Este cimento apresenta uma dilatação em torno de 0,2%, evitando microinfiltrações; o tempo de trabalho deste cimento é de no tempo máximo de 10 a 15 min, sendo que o calor diminui o tempo de presa que é de 25 a 30 min. Em relação à solubilidade do GuttaFlow, a partir do contato com os fluidos periapicais, apresenta-se virtualmente igual a zero em relação aos cimentos mais utilizados, resultando em um preenchimento dimensional estável (Elayouti et al²⁸., 2005; Bouillaguet et al¹³., 2008; Zielinsk et al¹⁰⁶., 2008; Vasiliadis et al⁹⁶., 2010; Kangarlou et al⁴⁸., 2012; Baldasso et al⁶., 2016; Coltene¹⁸, 2017).

GuttaFlow 2 é uma nova formulação de GuttaFlow, difere basicamente na forma da partícula de prata usada (Wastein et al¹⁰⁰., 2016; Baldasso et al⁶., 2016; Collado-González et al¹⁷., 2017); este cimento à base de silicone contém gutta-percha, em forma de pó com um tamanho de partícula inferior a 30 µm (Ozcan et al⁶⁷., 2017). O GuttaFlow 2 é composto por uma mistura de gutta-percha pó, polidimetilsiloxano, catalisador de platina, dióxido de zinco-titânio, e micro-prata. Evidências apontam para uma melhor biocompatibilidade do GuttaFlow 2 (Accardo et al¹., 2014) e menor citotoxicidade em culturas de fibroblastos gengivais do que o AH Plus (Mandal et al⁵⁸., 2014).

Uma terceira formulação do GuttaFlow foi lançada em 2015, denominada GuttaFlow bioseal (Baldasso⁵, 2014; Camargo et al¹⁴., 2017). O GuttaFlow bioseal, assim como o sistema GuttaFlow 2, também combina gutta-percha de fluxo livre com um selante apropriado à temperatura ambiente. Isto resulta em um material com excelentes propriedades de fluidez e um tempo de trabalho de 10-15 minutos. O GuttaFlow bioseal contém gutta-percha em pó, polidimetilsiloxano, catalisador de platina, dióxido de zircônio, prata (conservante), corante e vidro cerâmico bioativo (sílica, óxido de cálcio, óxido de sódio, óxido de fósforo, silicatos) (Giannoudis et al³⁹., 2005; Baldasso et al⁶., 2016). A diferença na composição do GuttaFlow bioseal em relação ao seu antecessor, GuttaFlow 2, é o acréscimo de vidro cerâmico bioativo, o que segundo o fabricante, induz o reparo periapical e a formação de tecido mineralizado (Coltene¹⁸, 2017).

Os cimentos endodônticos permanecem em íntimo contato com os tecidos periapicais, isso exige que estes materiais sejam biocompatíveis, favorecendo o reparo

tecidual. Para que um novo cimento endodôntico seja vantajoso em relação aos já estabelecidos no mercado, é necessário que seja realizado um conjunto de análises que permita identificar suas características físicas, químicas, sua citotoxicidade e biocompatibilidade (Blackman et al¹¹., 1989; Ranade et al⁷¹., 2003; Baldasso⁵, 2014). Um dos métodos utilizados para avaliar a biocompatibilidade de cimentos é a implantação do material no subcutâneo de ratos. A resposta biológica pode ser investigada por meio da avaliação histopatológica da cápsula que se forma em resposta aos materiais, por meio de análises morfológica e quantitativa do tecido circundante ao implante (Economides et al²⁶., 1995; Ranade et al⁷¹., 2003). Considerando que a resposta tecidual aos materiais compreende uma cascata de eventos celulares e moleculares, a detecção imuno-histoquímica tem sido utilizada para melhor caracterizar a resposta tecidual. Dentre os diversos fatores e citocinas envolvidas neste processo, podemos citar o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e a interleucina-6 (IL6) (Simsek et al⁸⁸., 2015).

Na reação inflamatória, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos, favorecendo a diapedese dos leucócitos para o tecido conjuntivo. Além disso, o VEGF estimula a proliferação de células endoteliais bem como a sua sobrevivência, particularmente durante o desenvolvimento embrionário (Dimmeler et al²⁵., 2000) e, portanto, induz a angiogênese (Wang et al⁹⁹., 1998; Yang et al¹⁰²., 2012). A angiogênese consiste em um processo de neoformação vascular a partir de uma rede de vasos capilares pré-existent, de fundamental importância para a cicatrização, regeneração e reparação de tecidos (Reyes-Carmona et al⁷²., 2011).

Os leucócitos no tecido conjuntivo são responsáveis pela produção e liberação de diversas citocinas que atuam como moduladores essenciais da resposta do sistema imunológico (Rincon et al⁷⁴., 2012). As citocinas regulam a proliferação e a diferenciação celular, dependendo do tipo e das células alvo envolvidas na resposta do hospedeiro; além disso, diversas vezes as citocinas apresentam atividades sobrepostas. Dentre as citocinas, a interleucina-6 (IL-6) tem sido associada com a instalação do processo inflamatório (Li et al⁵⁶., 2001; Longhini et al⁵⁷., 2014; Silva et al⁸⁶., 2014; Silva et al⁸⁷., 2015; da Fonseca et al¹⁹., 2016; de Oliveira et al²⁴., 2017) e, portanto, tem sido apontada como um dos possíveis alvos da intervenção terapêutica (Scheller et al⁸⁰., 2011). A IL-6 é uma citocina multifuncional que desempenha um papel importante nas respostas imunes, com atividades biológicas que incluem a regulação da resposta imunitária, hematopoese, oncogênese e no processo inflamatório (Lee et al⁵³., 2002; Kishimoto et al⁵⁰., 2010; Azuma et al⁴., 2014).

Frente a uma lesão tecidual, a IL-6 é a uma das interleucinas que participa da resposta mediada pelo hospedeiro, estando envolvida na patogênese de várias doenças inflamatórias (Barkhordar et al⁷., 1999). Esta citocina é produzida por neutrófilos, monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a micro-organismos (Florencio-Silva et al³⁴., 2015; de Oliveira et al²⁴., 2017), substâncias liberadas por materiais odontológicos (Silva et al⁸⁶., 2014; Silva et al⁸⁷., 2015; da Fonseca et al¹⁹., 2016; Saraiva et al⁷⁶., 2018) e também à estimulação por outras citocinas, como a interleucina-1 (IL-1) e fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Souza et al⁹⁰., 2008; Hashizume et al⁴⁴., 2011). A IL-6 possui várias propriedades pró-inflamatórias, tais como a produção de quimosinas e moléculas de adesão aos linfócitos, indução de proteínas de fase aguda em células de fígado e aumento de neutrófilos no sangue (Souza et al⁹⁰., 2008; Hashizume et al⁴⁴., 2011).

Considerando que os cimentos endodônticos, particularmente nos períodos iniciais, liberam diferentes substâncias que devem interferir na resposta do hospedeiro levando a uma reação inflamatória crônica ou a regressão desta reação, o nosso propósito foi avaliar a reação tecidual promovida pelo GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex, com ênfase no processo inflamatório e na detecção imuno-histoquímica da IL-6 e do VEGF. Além disso, um possível papel bioativo dos cimentos foi investigado por meio do método de von Kossa que detecta a presença de cálcio.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi analisar a reação tecidual promovida pelos cimentos Guttaflow Bioseal e MTA Fillapex implantados no subcutâneo de ratos, a fim de analisar a sua biocompatibilidade. A resposta biológica deste material foi comparada a do cimento Endofill. Os nossos objetivos específicos foram:

- Avaliar e caracterizar morfolologicamente das cápsulas formadas em resposta aos implantes, por meio de análises realizadas ao microscópio de luz;
- Analisar comparativamente a resposta inflamatória promovidas pelos cimentos Guttaflow bioseal, MTA Fillapex e Endofill;
- Avaliar comparativamente a imunexpressão à IL-6 e ao VEGF nas cápsulas formadas em resposta aos materiais implantados;
- Avaliar comparativamente o potencial bioativo dos materiais implantados no subcutâneo.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

O protocolo da presente pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP (Processo CEUA nº 16/2016, ANEXO A).

No presente estudo, foram utilizados 80 (oitenta) ratos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*) adultos jovens, machos, pesando em média 220 gramas, provenientes do biotério de Criação da Faculdade de Odontologia do Campus de Araraquara (UNESP). Todos os animais foram mantidos no Biotério do Subsolo do Prédio de Biomorfologias da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr/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 acondicionados em gaiolas de polietileno forradas com maravalha e receberam ração granulada (Nutrilabor; Guabi, Campinas, SP, Brasil) e água *ad libitum*. A maravalha das gaiolas foi trocada, no mínimo, três vezes por semana; a limpeza das gaiolas e bebedouro também foi realizada, a fim de manter a higiene do seu ambiente e, portanto, evitando desconforto aos animais.

Os animais foram distribuídos equitativamente em quatro grupos, de acordo com os materiais implantados no subcutâneo: GFB (Grupo GuttaFlow bioseal, Coltene, Langenau, Alemanha); MTAF (Grupo MTA Fillapex, Angelus Indústria de produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil), EF (Grupo EndoFill, Dentsply Industria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) e GC (Grupo Controle – tubo de polietileno vazio). Os dados e procedência dos materiais estão descritos no Quadro 1 e ilustrados nas Figuras 1A-1C.

Quadro 1 – Nome do material e procedência comercial, composição e forma de manipulação dos produtos avaliados

MATERIAL/ PROCEDÊNCIA	COMPOSIÇÃO		FORMA DE MANIPULAÇÃO
GuttaFlow bioseal, Coltene, Langenau, Alemanha	Gutta-percha em pó, polidimetilsiloxano, catalisador de platina, dióxido de zircônio, prata (conservante), corante e vidro bioativo		Seringa automix na qual os materiais são misturados em proporções iguais (1:1) na ponta misturadora
MTA Fillapex, Angelus Indústria de produtos Odontológicos S/A, Londrina – PR – Brasil	Pasta Base: resina salicilato, resina natural, tungstato de cálcio, sílica nanoparticulada, pigmentos	Pasta catalisadora: resina diluente, mineral trióxido agregado, sílica nanoparticulada, pigmentos	Dosar quantidades iguais (1:1) das pastas e espatular por 30 segundos para homogeneizar a mistura
EndoFill, Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis – RJ – Brasil	Pó: Óxido de zinco, resina hidrogenada, subcarbonato de bismuto, sulfato de bário, borato de sódio	Líquido: Eugenol, óleo de amêndoas doces	Pó: 1g; líquido 220µl. O pó foi adicionado ao líquido até atingir a consistência que, ao levantar a espátula, forma um fio de cimento que se rompe ao atingir 2cm de comprimento

Fonte: Elaboração própria.

Figura 1 – Ilustração dos cimentos endodônticos avaliados



Fotos dos cimentos que foram manipulados e implantados no subcutâneo dorsal dos ratos. **Figura 1A** - MTA Fillapex (Angelus, Londrina, PR, Brasil). **Figura 1B** - Endofill (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil). **Figura 1C**- GuttaFlow bioseal (Coltene, Langenau, Alemanha).

4.2 Procedimentos Cirúrgicos

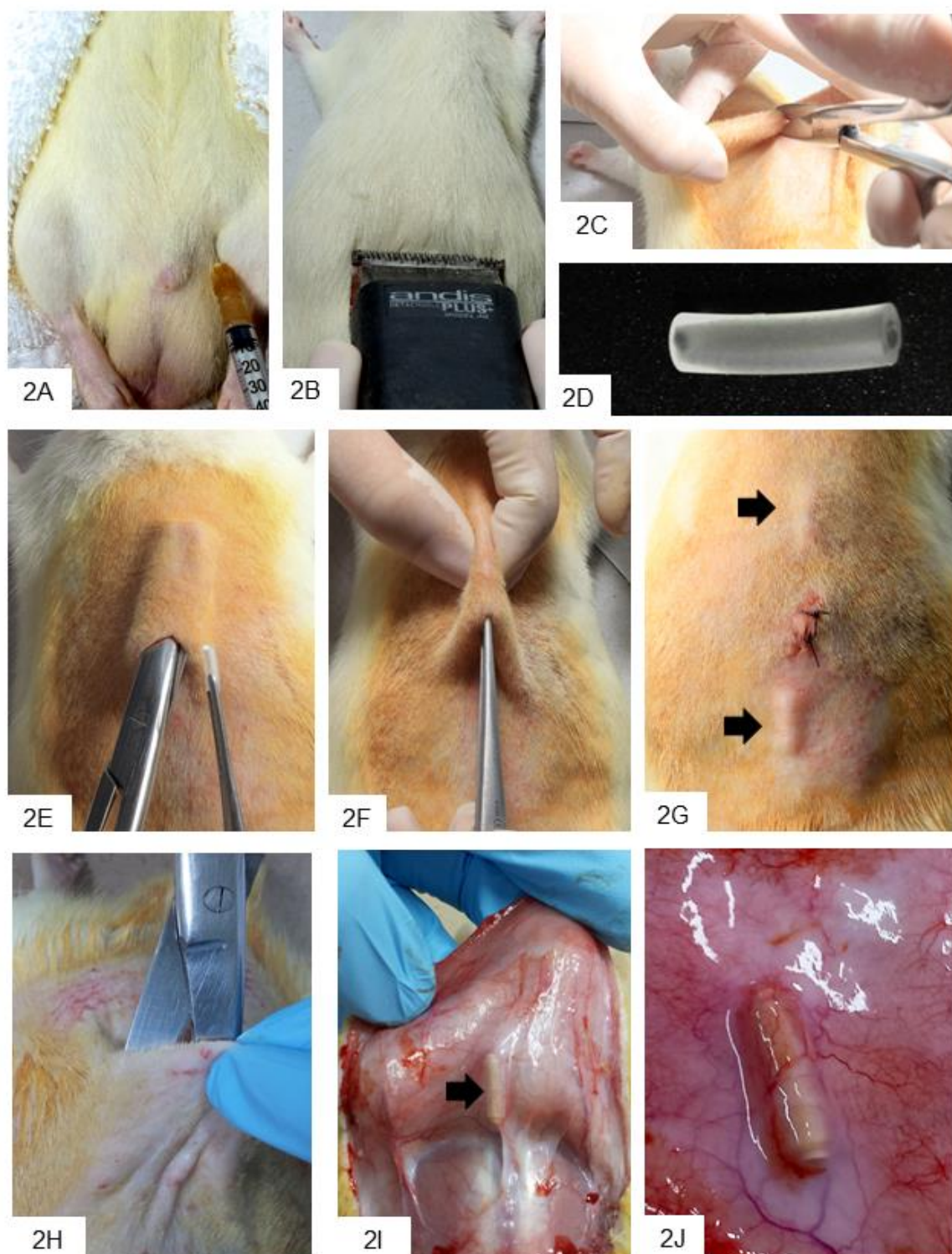
Os ratos foram anestesiados com 0,08 mL/100 g de peso corporal de Cloridrato de Cetamina a 10% (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil), associada a 0,04 mL/100 g de peso corporal de Cloridrato de Xilazina a 2% (União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, SP, Brasil), administrada com seringa e agulha de insulina por via intraperitoneal (Figura 2A).

Os materiais foram manipulados e inseridos em tubos de polietileno (Embramed Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) medindo 10 mm de comprimento x 1,5 mm de diâmetro, previamente esterilizados em óxido de etileno^{52,97}. Após a tricotomia e assepsia com solução de iodo a 5% da região dorsal do animal, realizou-se uma incisão de 2 cm, no sentido crânio-caudal (Figuras 2B-2C). Os tecidos foram divulsionados e os tubos preenchidos com um dos materiais ou os tubos vazios foram implantados na bolsa criada no subcutâneo (Figuras 2E-2F); em cada animal foram implantados 2 tubos do mesmo grupo. Foram realizados 10 implantes para cada material por período experimental. Portanto, a colocação de 2 implantes (do mesmo grupo) em cada animal teve como objetivo obter uma amostra de 5 implantes/grupo em cada período, evitando a repetição do experimento devido a possíveis perdas dos implantes durante a remoção dos implantes ou durante o processamento laboratorial.

Após a colocação dos tubos de polietileno na bolsa criada no subcutâneo dorsal, o local da incisão foi suturado em pontos simples utilizando fio de seda (Seda 4-0, Ethicon, São José dos Campos, SP-Brasil) (Figura 2G). Os animais foram acondicionados em gaiolas, devidamente identificados de acordo com o grupo e período, e foram observados até a recuperação da anestesia. Para minimizar o desconforto pós-operatório dos animais, administrou-se dipirona sódica (EMS S/A, Hortolândia, São Paulo, Brasil), na dosagem de 0,03 mg para cada 100 g de peso corporal nos três primeiros dias após a cirurgia. Os animais foram observados diariamente para verificar a ingestão de ração e água, além de qualquer indício de alteração de comportamento (irritabilidade e postura nas gaiolas) que poderia refletir possível desconforto/dor dos animais.

Decorridos os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, os animais foram eutanasiados com sobredose de Cloridrato de Cetamina (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e Cloridrato de Xilazina (União Química Farmacêutica Nacional S/A, São

Paulo, SP, Brasil) para a remoção dos implantes com os tecidos circundantes (Figuras 2A-2J).

Figura 2 - Sequência dos procedimentos cirúrgicos

Fonte: Elaboração própria.

Figuras 2A-2J - Sequência cirúrgica de inserção e remoção dos implantes no subcutâneo. **Figura 2A**- administração da anestesia por via intraperitoneal, após contenção do animal. **Figuras 2B-2C** – Após a anestesia, realizou-se tricotomia (Fig. 2B) e com uma tesoura foi realizada uma incisão no sentido crânio caudal. **Figura 2D** - Tubo de polietileno. **Figura 2E** - Divulsão dos tecidos com tesoura de ponta romba. **Figura 2F** - Inserção do tubo de polietileno no subcutâneo. **Figura 2G** - Sutura com fio de seda. As setas indicam o local dos implantes no subcutâneo. **Figura 2H-2J** - Após anestesia, tricotomia, antissepsia com solução de iodo a 5%, com uma tesoura realizou-se a incisão da pele para localização e remoção do implante e tecidos adjacentes para o processamento histológico. Em **2I**, a seta indica o tubo de polietileno envolvido pela cápsula. A **Figura 2J** ilustra a porção da pele removida contendo o implante no subcutâneo.

4.3 Processamento Histológico

As etapas do processamento histológico foram resumidamente descritas num diagrama que pode ser observado na Figura 3. Os implantes envolvidos pelos tecidos adjacentes foram removidos e imediatamente imersos 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 lavadas em água corrente durante 4 horas e posteriormente, foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70° GL, 80° GL, 90° GL e 100° GL). Após a diafanização, os espécimes foram embebidos em parafina líquida (60°C) por aproximadamente 4 horas (3 trocas de parafina) e incluídos em parafina. Os espécimes (implantes + tecidos adjacentes) foram incluídos de maneira a obter cortes longitudinais em relação aos tubos de polietileno. Após confecção dos blocos de parafina contendo os espécimes, com auxílio de um estilete e de uma lâmina de bisturi nº 15 (Embramac, Itajaí, SC, Brasil) o tubo de polietileno (Embramed Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) foi cuidadosamente removido e inserido parafina no seu espaço.

Com um micrótomo rotativo (Leica, modelo Microm HM 325, Wetzlar, Alemanha), foram obtidos a partir dos blocos, 40 cortes longitudinais com 6 µm de espessura de cada implante, sendo que foram colocados 2 cortes em cada lâmina de vidro (Exacta, Ind. e Comércio de Produtos Científicos Perfecta Ltda, São Paulo, Brasil). Cortes não seriados, com distância mínima de 100µm e corados com HE (hematoxilina de Carazzi e eosina) foram usados para análise morfológica e obtenção do número de células inflamatórias. Alguns cortes foram também corados com tricrômico de Masson para verificar a presença de colágeno nas cápsulas. De todos os espécimes, vinte e quatro cortes não seriados das cápsulas envolvendo os implantes foram aderidos a lâminas de vidro previamente tratadas com silano a 4% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) para a realização das reações imuno-histoquímica para detecção de interleucina-6 (IL-6) e do VEGF.

Para a descrição das alterações morfológicas e captura das imagens, foi utilizada uma câmera de captura (DP-71 Olympus, Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus, modelo BX-51, Japão).

Figura 3- Fluxograma do processamento histológico

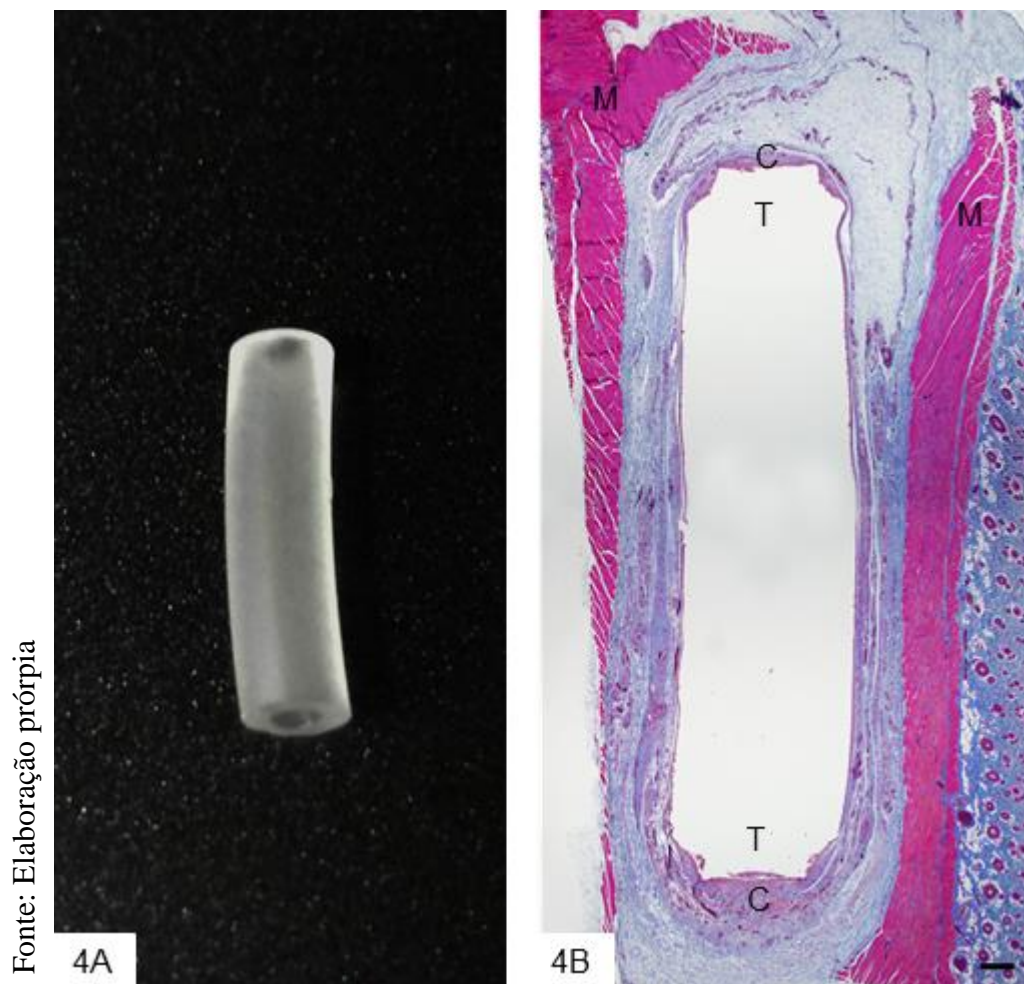


4.4 Métodos de Análise

4.4.1 Descrição morfológica

A partir dos cortes corados com HE e tricrômico de Masson, foi realizada a descrição morfológica das cápsulas adjacentes aos implantes, ou seja, na abertura dos tubos, a fim de avaliar a reação tecidual induzida pelos cimentos endodônticos (Figuras 4 e 5). Nesta análise, foi considerada a presença ou não de processo inflamatório, bem como a sua extensão; considerou-se também o tipo de células inflamatórias, presença de células gigantes multinucleadas, vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas.

Figura 4- Tubo de polietileno implantado no subcutâneo dos animais.

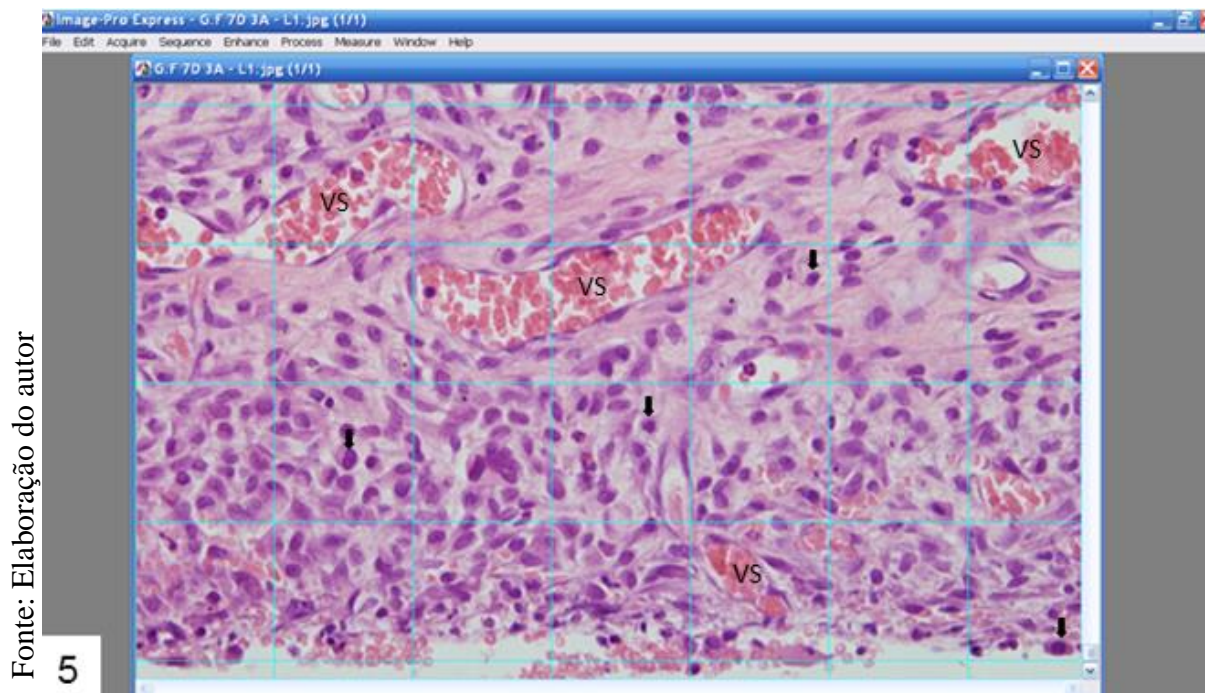


A Figura 4A mostra o aspecto macroscópico do tubo de polietileno previamente cortado e esterilizado. Figura 4B – corte longitudinal mostrando o espaço ocupado pelo tubo de polietileno (T) e os tecidos adjacentes. (C) cápsulas nas extremidades do implante que constituí a região avaliada. M, tecido muscular. Tricrômico de Masson. Barra: 500µm.

4.4.2 Densidade numérica de células inflamatórias

A fim de comparar a intensidade da reação inflamatória promovida pelos materiais foi obtido o número de células inflamatórias por mm^2 nas cápsulas adjacentes às extremidades dos tubos implantados. A quantificação foi obtida a partir de 3 cortes não seriados (intervalo mínimo de $100\ \mu\text{m}$) de cada espécime, em todos os grupos e períodos ($n=5/\text{grupo}$ em cada período).

Com auxílio de uma câmera (DP-71, Olympus – Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus, modelo BX-51, Japão), foi capturada uma imagem da porção central da cápsula adjacente aos materiais implantados; esta imagem foi obtida com a objetiva de 40x. Posteriormente, com o programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus – Japão), a imagem foi aberta e o número de células inflamatórias foi computado numa área teste de aproximadamente $0,09\text{mm}^2$ da cápsula (Figura 5). O valor total de células inflamatórias em cada animal (obtido a partir das áreas dos três cortes/implante) foi dividido pela área total ($0,27\text{mm}^2$) obtendo-se, assim, um valor de células inflamatórias/ mm^2 . Ao final, estabeleceu-se uma média para cada grupo e em cada período. A análise foi realizada por um examinador calibrado e “cego” aos grupos experimentais.

Figura 5- Imagem ilustrativa do método quantitativo

“Print screen” de uma fotomicrografia capturada com a câmera DP-71 acoplada ao microscópio Olympus. Com o auxílio do programa de análise de imagens (Image-Pro Express, Olympus), a fotomicrografia foi aberta e, após calibração, uma grade reticular contendo 30 intersecções/pontos (sistema teste) foi sobreposta à imagem; esta grade foi usada somente para auxiliar como uma “guia” durante a contagem das células. Para a identificação das células inflamatórias e demais estruturas a imagem foi ampliada. Setas, células inflamatórias, VS, vasos sanguíneos. Coloração HE.

4.4.3 Espessura das cápsulas adjacentes aos implantes

A fim de avaliar a extensão da reação inflamatória promovida pelos materiais foi estimada a espessura (em μm) nas cápsulas adjacentes às extremidades dos tubos implantados. A mensuração foi obtida a partir de 3 cortes não seriados (intervalo mínimo de 100 μm) de cada espécime, em todos os grupos e períodos (n=5/grupo em cada período) por um único avaliador calibrado.

Com auxílio de uma câmera (DP-71, Olympus – Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus, modelo BX-51, Japão), foi capturada uma imagem da porção central da cápsula adjacente aos materiais implantados; esta imagem foi obtida com a objetiva de 4x. Posteriormente, com o programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus – Japão), a imagem foi aberta e, após a calibração do programa, a espessura das cápsulas foi estimada na sua porção média traçando-se uma linha a partir de sua superfície mais interna, adjacente ao material, até o seu limite com os tecidos adjacentes, ou seja, tecidos conjuntivo frouxo e/ou muscular. O valor total da espessura das cápsulas em cada animal foi obtido a partir do valor médio obtido nas medidas dos três cortes/implante obtendo-se, assim, um valor da espessura em μm . Ao final, estabeleceu-se uma média para cada grupo e em cada período.

4.4.4 Detecção imuno-histoquímica de IL-6

A reação imuno-histoquímica para a detecção de IL-6 foi realizada com o anticorpo primário monoclonal anti-IL-6 produzido em camundongo (Abcam, cód. Ab 9324, Cambridge Science, UK). Após desparafinização e hidratação, foi realizada a recuperação antigênica; para isso, 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 94-98°C. Após o resfriamento, procedeu-se as lavagens com PBS 0,01 M (pH 7,2) e o tratamento durante 20 minutos com peróxido de hidrogênio a 5%, para o bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados novamente e, então, incubados com albumina do soro bovino a 2% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA), por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* em câmara úmida a 4°C com anticorpo primário anti-IL-6 produzido em camundongo, na diluição 1:800.

Subsequentemente às lavagens em tampão PBS 0,01 M, os cortes foram incubados em anticorpo secundário de coelho/camundongo anti-IgG biotilado (Biotinylated LINK Universal, Dako LSAB + System-HRP, K0675; Dako Inc., Carpinteria, CA, Estados Unidos) por 40 minutos. Após lavagens em tampão, os cortes foram incubados com o complexo Streptavidin-HRP (Dako LSAB + System-HRP, K0675; Dako Inc.) por 40 minutos. Subsequentemente às lavagens em tampão, a atividade da peroxidase foi revelada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (ImmPACT™ DAB Vector, Burlingame, CA, Estados Unidos) durante 4 minutos. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Carazzi, desidratados, diafanizados e montados para análise ao microscópio de luz. Como controle negativo, no passo da incubação com o anticorpo primário os cortes foram incubados com soro não imune; as demais etapas foram realizadas sem qualquer modificação.

Com o objetivo de verificar se houve diferenças entre os grupos e períodos, o número de células imunopositivas para IL-6 foi estimado nas cápsulas dos implantes de cada grupo/período. Com auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão), uma área padrão de 0,09mm² da cápsula adjacente à abertura do tubo implantado foi capturada, em aumento de 40x. O número de células imunopositivas à IL-6 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.

4.4.5 Detecção imuno-histoquímica de VEGF

A reação imuno-histoquímica para a detecção do VEGF foi realizada com o anticorpo primário monoclonal anti-VEGF produzido em coelho (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, cód. sc – 7269, CA, Estados Unidos). Após desparafinização e hidratação, foi realizado a recuperação antigênica; para isso, 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 94-98°C. Após o resfriamento, procedeu-se as lavagens com PBS 0,01 M (pH 7,2) e o tratamento durante 20 minutos com peróxido de hidrogênio a 5%, para o bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados novamente e, então, incubados com albumina do soro bovino a 2% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA), por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* em câmara úmida a 4°C com anticorpo primário anti-VEGF produzido em camundongo, na diluição 1:100. Subsequentemente às lavagens em tampão PBS 0,01 M, os cortes foram incubados em anticorpo secundário anti-IgG biotilado de coelho (ImmunoCruz™ LSAB Staining System SC-2051; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, Estados Unidos) por 40 minutos. Após lavagens, os cortes foram incubados com o complexo HRP-avidina (ImmunoCruz™ LSAB Staining System SC-2051, Santa Cruz) durante 40 minutos e, após as lavagens, a atividade da peroxidase foi revelada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (ImmPACT™ DAB Vector, Burlingame, CA, Estados Unidos) durante 3 minutos. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Carazzi, desidratados, diafanizados e montados para análise ao microscópio de luz. Como controle negativo, no passo da incubação com o anticorpo primário os cortes foram incubados com soro não imune de coelho; as demais etapas foram realizadas sem qualquer modificação.

4.4.6 Reação histoquímica de von Kossa

O método de von Kossa^{70,75} foi utilizado para avaliar a possível deposição de cálcio nas cápsulas adjacentes às extremidades dos tubos implantados. Este método foi realizado nos espécimes de todos os grupos e períodos. Os cortes desparafinizados foram incubados em solução aquosa contendo 5% de nitrato de prata, sob a ação de uma lâmpada incandescente (100 watts), durante 1 hora. Após a incubação, os cortes foram lavados rapidamente em água destilada e, subsequentemente, os cortes foram imersos em 5% de hipossulfito de sódio por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados rapidamente em água corrente e durante 5 minutos em água destilada. Após a lavagem, os cortes foram submetidos ao método do picrosírius-red. Subsequentemente, os cortes foram lavados, desidratados e montados em meio resinoso (PermOUNT[®], Fisher Scientific, New Jersey, USA) para análise ao microscópio de luz.

4.5 Análise Estatística

Os resultados quantitativos obtidos e as possíveis diferenças entre os grupos foram submetidos ao teste de normalidade e, posteriormente, avaliados pelo two-way ANOVA seguido pelo teste de TUKEY com o auxílio do programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA, USA). Sendo considerado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise Morfológica

No período de 7 dias, os cortes corados com HE revelaram que os implantes de todos os grupos se apresentaram envolvidos por cápsulas exibindo diversas células inflamatórias (Figuras 6A-6H). No grupo GFB (Figura 6A), as cápsulas apresentaram-se relativamente delgadas em comparação aos grupos MTAF e EF (Figuras 6B e 6C); no grupo EF, a espessa cápsula adjacente à abertura dos tubos de polietileno mostrava evidente processo inflamatório (Figura 6C). No grupo GC, os limites entre cápsula e tecidos adjacentes estava quase que indistinguível (Figura 6D). Nos grupos GFB, GMTAF e EF, as cápsulas exibiram evidente presença de células inflamatórias, principalmente linfócitos e macrófagos, entre uma profusa rede de vasos sanguíneos (Figuras 6E-6G) em comparação ao grupo GC (Figura 6H). Ocasionalmente células gigantes multinucleadas foram também observadas (Figuras 6E e 6H).

Uma redução gradativa no processo inflamatório foi observada nas cápsulas de todos os grupos com o decorrer do tempo. Assim, fibroblastos já foram observados entre as células inflamatórias nas cápsulas de todos os grupos, nos períodos de 15 e 30 dias (Figuras 7A-7H). Aos 30 dias, as cápsulas do GFB apresentaram uma evidente redução da reação inflamatória acompanhada pela presença significativa de fibroblastos (Figura 7E) em comparação aos grupos MTAF (Figura 7F) e EF (Figura 7G). Neste período, as cápsulas do GC continham poucas células inflamatórias, caracterizando um processo inflamatório leve/suave (Figura 7H).

Aos 60 dias (Figuras 8A-8D), todos os grupos apresentaram cápsulas delgadas em comparação aos 7 dias (Figuras 6A-6D); no entanto, as cápsulas do grupo EF (Figura 8C) apresentaram-se evidentemente mais espessas em comparação aos demais grupos (Figuras 8A, 8B e 8D). O grupo GFB exibiu cápsulas com presença predominante de fibroblastos dispostos entre as fibras de colágeno e poucas células inflamatórias (Figura 8E). No MTAF as células inflamatórias foram observadas, principalmente, na superfície das cápsulas adjacente aos cimentos (Figura 8F). Em contraposição, inúmeras células inflamatórias estavam presentes nas cápsulas do EF (Figura 8G). No grupo GC, fibroblastos entre fibras colágenas representaram os principais constituintes das cápsulas (Figura 8H).

Os cortes corados com tricrômico de Masson evidenciaram as significativas diferenças nos constituintes das cápsulas, particularmente no que se refere a matriz extracelular, com o decorrer do período. Aos 7 dias, o tecido conjuntivo das cápsulas continha predominantemente células, sendo a maioria células inflamatórias, e a presença de poucas e finas fibras colágenas (Figuras 9A-9D). Evidentes alterações foram observadas nas cápsulas aos 60 dias, tanto na quantidade e tipo de células bem como na matriz extracelular (Figuras 9E-9H). Nos grupos GFB (Figura 9E) e GC (Figura 9H), as cápsulas exibiram nítidos feixes de fibras colágenas (em azul) entre diversos fibroblastos; no grupo MTAF, algumas células inflamatórias ainda persistiam entre os feixes de fibras colágenas e fibroblastos (Figura 9F). Em contraposição, as cápsulas do EF ainda mostraram um predomínio de células inflamatórias em comparação aos demais componentes (Figura 9G).

5.2 Densidade Numérica de Células Inflamatórias

Conforme a Tabela 1, o número de células inflamatórias/mm² foi significativamente maior nas cápsulas de todos os grupos aos 7 dias. Com o decorrer do tempo, uma redução significativa nos valores foi observada em todos os grupos.

A análise deste parâmetro entre os grupos num mesmo período revelou que o número de células inflamatórias foi significativamente menor nas cápsulas do GFB em comparação aos grupos MTAF ($p < 0,0001$) e EF ($p < 0,0001$), aos 7, 15 e 30 dias. Aos 60 dias, diferenças significantes no número de células inflamatórias não foram observadas entre as cápsulas do GFB e MTAF ($p = 0,58$). Em todos os períodos, os valores obtidos no grupo EF foram maiores significativamente ($p < 0,0001$) em comparação aos grupos GFB e MTF. O número de células inflamatórias foi significativamente menor ($p < 0,0001$) no grupo GC em comparação aos demais grupos, em todos os períodos.

Tabela 1– Densidade numérica de células inflamatórias nas cápsulas adjacentes aos implantes dos grupos GuttaFlow bioseal (GFB), MTA Fillapex (MTAF), Endofill (EF) e Controle (GC) após 7, 15, 30 e 60 dias

Períodos	GFB	MTAF	EF	GC
7 dias	1.052 ± 86 ^{a:1}	1.256 ± 128 ^{b:1}	2.171 ± 11 ^{c:1}	697 ± 32 ^{d:1}
15 dias	673 ± 10 ^{a:2}	906 ± 14 ^{b:2}	1.673 ± 24 ^{c:2}	307 ± 12 ^{d:2}
30 dias	533 ± 36 ^{a:3}	745 ± 48 ^{b:3}	1.465 ± 110 ^{c:3}	213 ± 19 ^{d:3}
60 dias	280 ± 19 ^{a:4}	321 ± 10 ^{a:4}	904 ± 12 ^{b:4}	94 ± 3 ^{c:4}

Valores numéricos representam média ± desvio padrão. A comparação entre os grupos no mesmo período é indicada por letras sobrescritas nas linhas; letras iguais = sem diferença estatística significativa. A comparação entre os períodos é indicada por números sobrescritos nas colunas; números iguais = sem diferença estatística significativa. Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.3 Espessura das Cápsulas Adjacentes aos Implantes

De acordo com a Tabela 2, a espessura das cápsulas de todos os grupos reduziu significativamente ($p \leq 0,0001$) ao decorrer do tempo. Em todos os períodos, a espessura das cápsulas do grupo GC foi significativamente menor em comparação aos demais grupos enquanto que o grupo EF apresentou valores significativamente maiores. A espessura das cápsulas do grupo GFB foi menor significativamente ($p \leq 0,0001$) em comparação ao grupo MTAF, em todos os períodos.

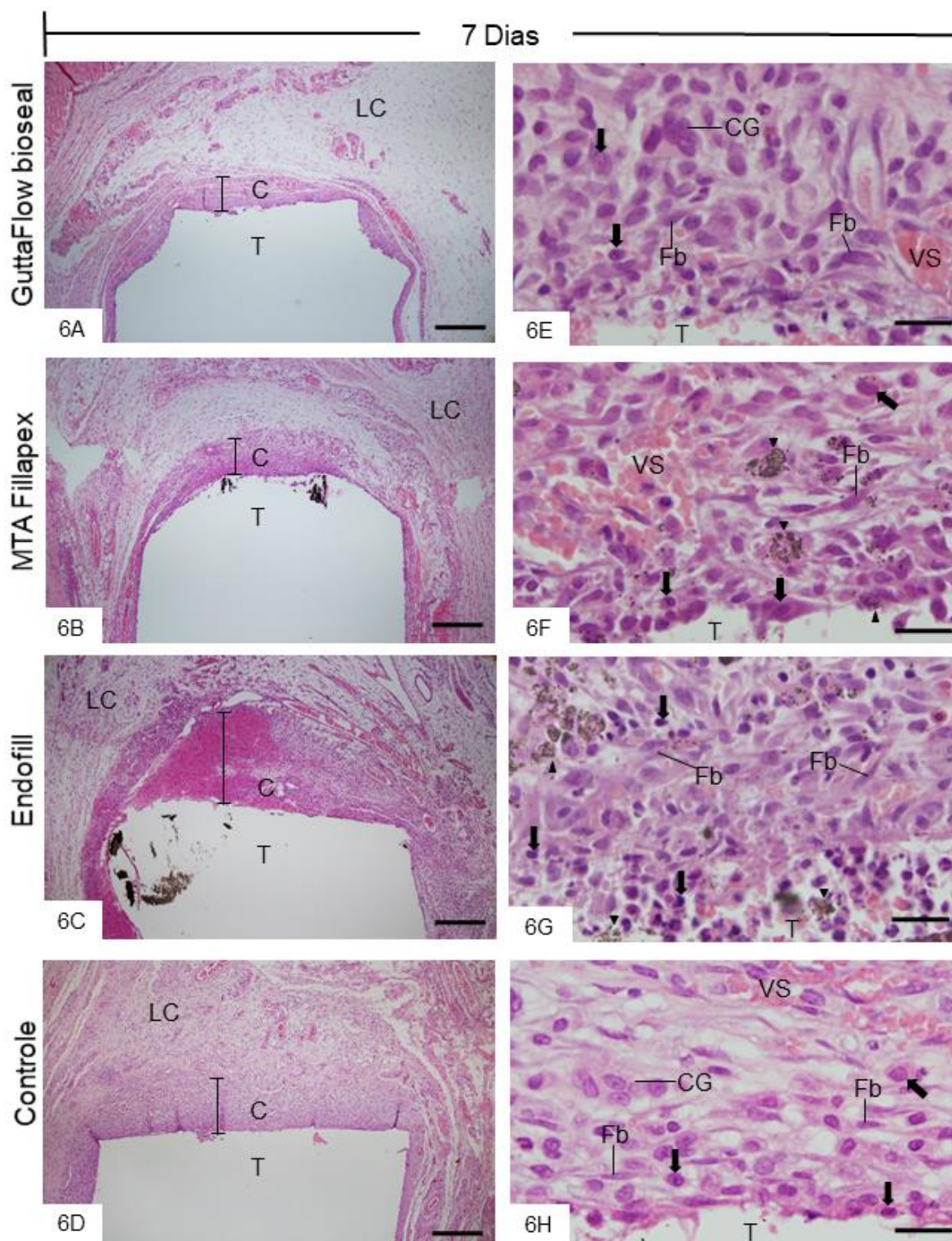
Tabela 2 – Espessura das cápsulas (em μm) adjacentes aos implantes dos grupos GuttaFlow bioseal (GFB), MTA Fillapex (MTAF), Endofill (EF) e Controle (GC) após 7, 15, 30 e 60 dias.

Períodos	GFB	MTAF	EF	GC
7 dias	353 \pm 4 ^{a;1}	427 \pm 12 ^{b;1}	614 \pm 59 ^{c;1}	266 \pm 10 ^{d;1}
15 dias	235 \pm 8 ^{a;2}	360 \pm 7 ^{b;2}	486 \pm 5 ^{c;2}	179 \pm 11 ^{d;2}
30 dias	177 \pm 2 ^{a;3}	245 \pm 5 ^{b;3}	280 \pm 4 ^{c;3}	108 \pm 4 ^{d;3}
60 dias	126 \pm 0,5 ^{a;4}	204 \pm 2 ^{b;4}	234 \pm 3 ^{c;4}	80 \pm 2 ^{d;4}

Valores numéricos representam média \pm desvio padrão. A comparação entre os grupos no mesmo período é indicado por letras sobrescritas nas linhas; letras iguais = sem diferença estatística significativa. A comparação entre os períodos é indicada por números sobrescritos nas colunas; números iguais = sem diferença estatística significativa. Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

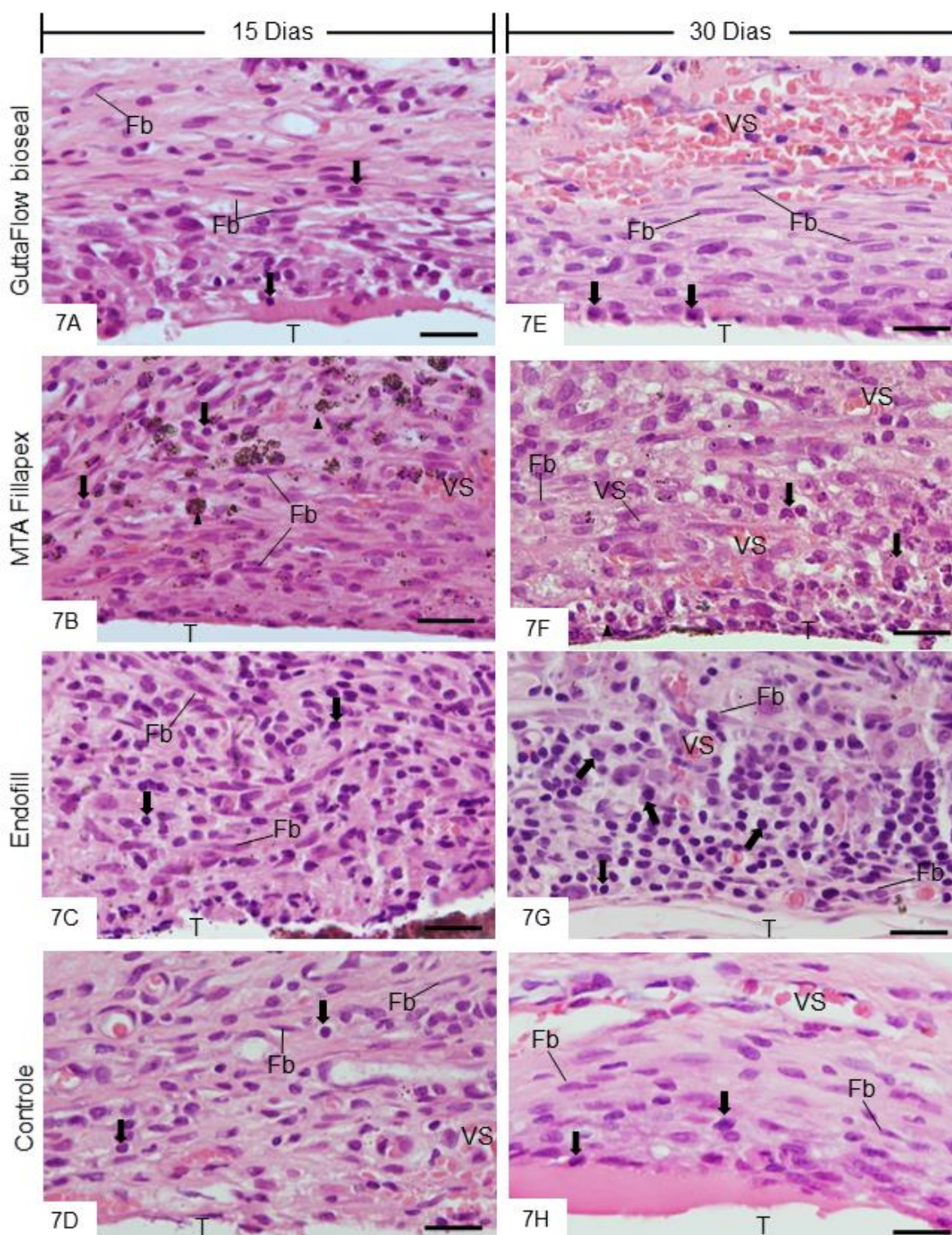
Figura 6 – Prancha H.E 7 dias



Fonte: Elaboração própria.

Fotomicrografias mostrando porções de cortes das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 7 dias. **Figuras 6A-6D** – visão geral mostrando parte dos tecidos que envolvem os tubos implantados (T). Note que as cápsulas (C), adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T), estão representadas por uma faixa relativamente espessa contendo diversas células inflamatórias. Os tecidos adjacentes às cápsulas apresentam-se, aparentemente, íntegros. LC, tecido conjuntivo frouxo. Barras: 500 μm . **Figuras 6E-6H** – as fotomicrografias mostram a porção mais interna das cápsulas, ou seja, em justaposição à abertura dos tubos de polietileno (T). As cápsulas adjacentes aos cimentos (Figuras 6E-6G) exibem diversas células inflamatórias (setas), principalmente linfócitos, plasmócitos e macrófagos. No grupo controle (Figura 6H), as células inflamatórias (setas) estão dispersas pela cápsula, além da presença evidente de fibroblastos (Fb). Fb, fibroblastos; CG, célula gigante multinucleada; VS, vasos sanguíneos; cabeça de seta, partículas de cimento. Barras: 20 μm . HE.

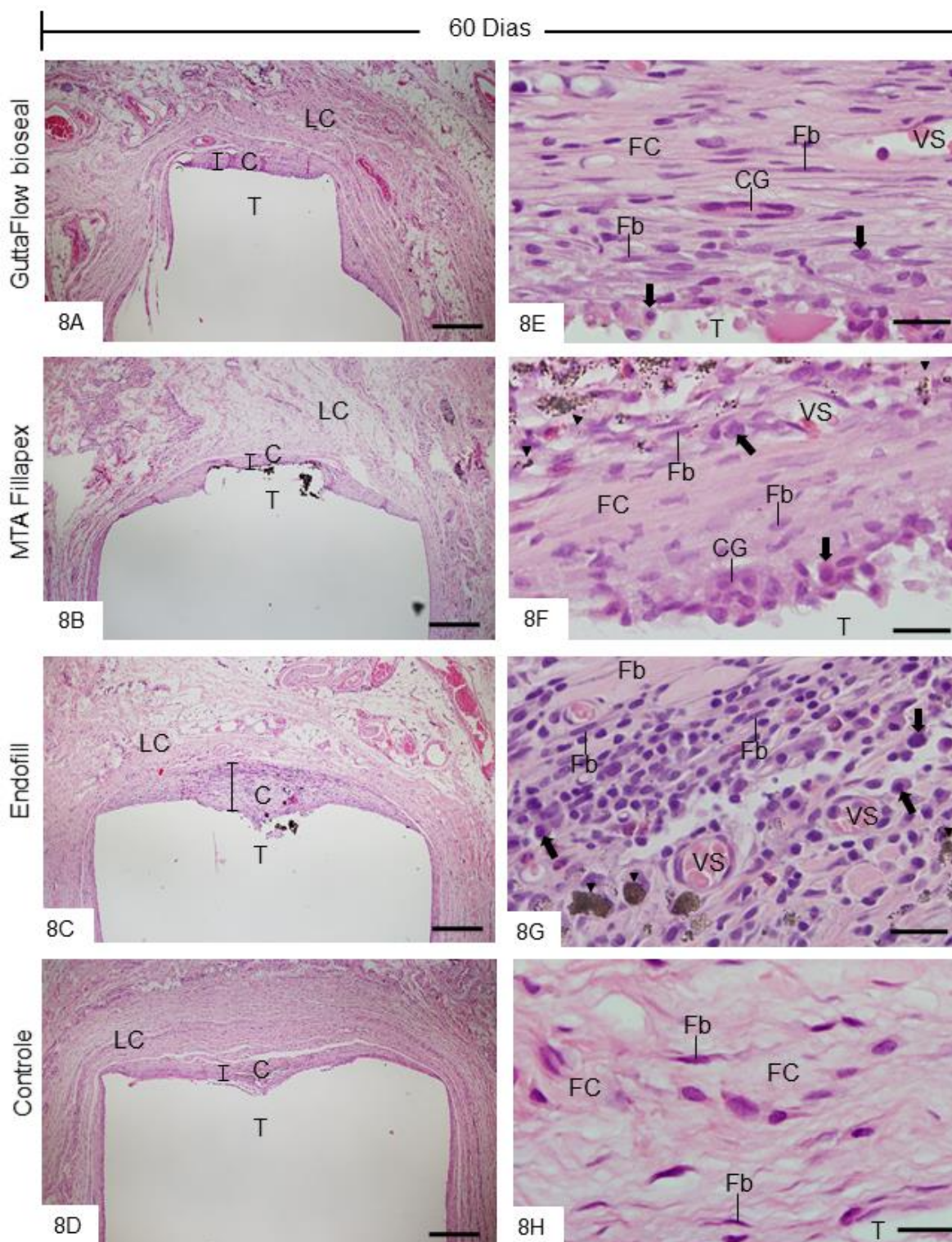
Figura 7 – Prancha H.E 15 e 30 dias



Fonte: Elaboração própria.

Fotomicrografias mostrando a porção mais interna das cápsulas após 15 (**Figuras 7A-7D**) e 30 (**Figuras 7E-7H**) dias ao implante. As cápsulas exibem células inflamatórias (setas), fibroblastos (Fb) e vasos sanguíneos (VS). Note que aos 30 dias, a cápsula do GFB (Figura 7E) exibe fibroblastos dispostos entre as fibras colágenas semelhantemente ao grupo controle (Figura 7H) enquanto que inúmeras células inflamatórias (setas) estão presentes na cápsula do Endofill (Figura 7G). Cabeça de seta, partículas de material. Barras: 20 μm . HE.

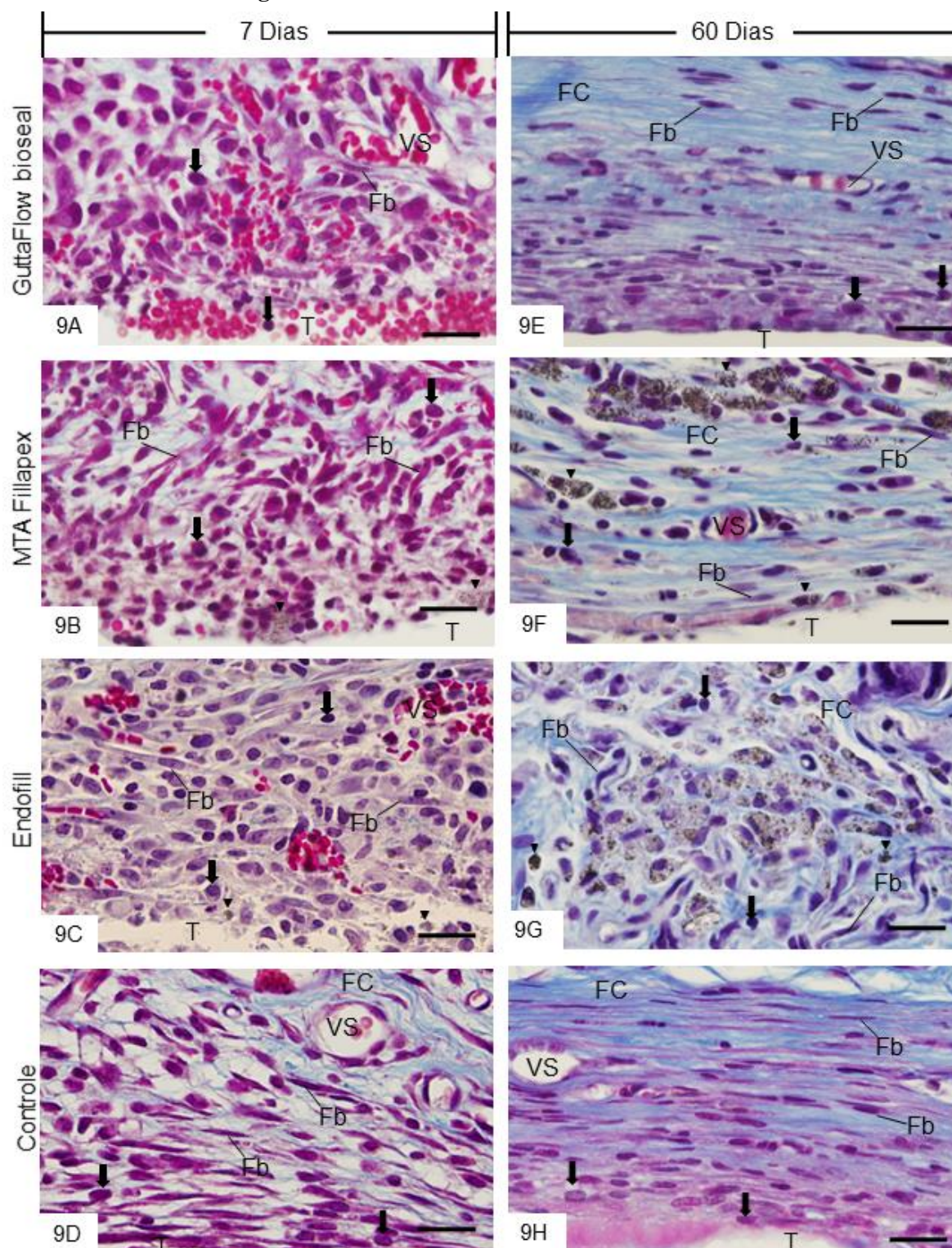
Figura 8 – Prancha H.E 60 dias



Fonte: Elaboração própria.

Fotomicrografias mostrando porções de cortes das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 60 dias. **Figuras 8A-8D** – visão geral mostrando parte dos tecidos que envolvem os tubos implantados (T). As cápsulas (C), adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T), estão representadas por uma faixa delgada de tecido conjuntivo, com exceção da cápsula do Endofill (Figura 8C). LC, tecido conjuntivo adjacente às cápsulas. Barras: 500 μm . **Figuras 8E-8H** – as fotomicrografias mostram a porção mais interna das cápsulas - em justaposição à abertura dos tubos de polietileno (T). As cápsulas adjacentes aos cimentos GFB (Figura 8E) e MTAF (Figura 8F) contêm poucas células inflamatórias (setas) entre fibroblastos (Fb) e fibras colágenas (FC) enquanto que no Endofill (Figura 8G) inúmeras células inflamatórias (setas) ainda são observadas. No grupo controle (Figura 8H), a cápsula apresenta fibroblastos (Fb) entre feixes de fibras colágenas (FC). CG, célula gigante multinucleada; VS, vasos sanguíneos; cabeça de seta, partículas de cimento. Barras: 20 μm . HE.

Figura 9 – Prancha Tricrômico de Masson 7 e 60 dias



Fonte: Elaboração própria.

Fotomicrografias mostrando porções de cortes das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 7 (**Figuras 9A-9D**) e 60 (**Figuras 9E-9H**) dias. Os cortes foram corados com tricrômico de Masson. **Figuras 9A-9D** - células inflamatórias (setas), principalmente linfócitos, plasmócitos e macrófagos, são observadas por toda a extensão das cápsulas. Diversos perfis de vasos sanguíneos (VS) também são observados. Fibroblastos (Fb). Barras: 500 μm . **Figuras 9E-9H** – predomínio de fibroblastos (Fb) entre os feixes de colágeno (FC) nas cápsulas dos grupos GFB e GC; no grupo MTAF (Figura 9G), algumas células inflamatórias (setas) estão presentes entre as fibras colágenas (FC) e fibroblastos (Fb). A cápsula do grupo EF (Figura 9G) exibe diversas células inflamatórias (setas); algumas células parecem exibir partículas de cimento aparentemente no seu citoplasma (cabeças de seta). VS, vaso sanguíneo. Barras: 20 μm . Tricrômico de Masson.

5.4 Detecção Imuno-Histoquímica para IL-6 e Densidade Numérica de Células Imunopositivas

Os cortes das cápsulas de todos os grupos submetidos à reação imuno-histoquímica para IL-6 mostraram células inflamatórias e alguns fibroblastos exibindo citoplasma imunopositivo (em castanho), em todos os períodos. No entanto, uma acentuada imunopositividade foi observada nas cápsulas de todos os grupos aos 7 dias (Figuras 10A-10D) em comparação ao período de 60 dias (Figuras 10E-10H). Além disso, no período de 60 dias, escassas células inflamatórias e poucos fibroblastos imunomarcados estavam presentes entre os feixes de fibras colágenas nas cápsulas de todos os grupos, com exceção do Endofill. As cápsulas do Endofill exibiram diversas células inflamatórias imunopositivas por toda a sua extensão (Figura 10G).

De acordo com a Tabela 3, o número de células imunopositivas foi menor significativamente ($p \leq 0,001$) nas cápsulas do grupo GFB em comparação ao grupo MTAF, em todos os períodos. Em todos os períodos, o número de células imunomarcadas foi maior significativamente ($p \leq 0,001$) nas cápsulas do EF em comparação aos demais grupos enquanto que os menores valores foram observados nas cápsulas do grupo GC. Em todos os grupos, o número de células imunomarcadas nas cápsulas reduziu significativamente de 7 para 60 dias.

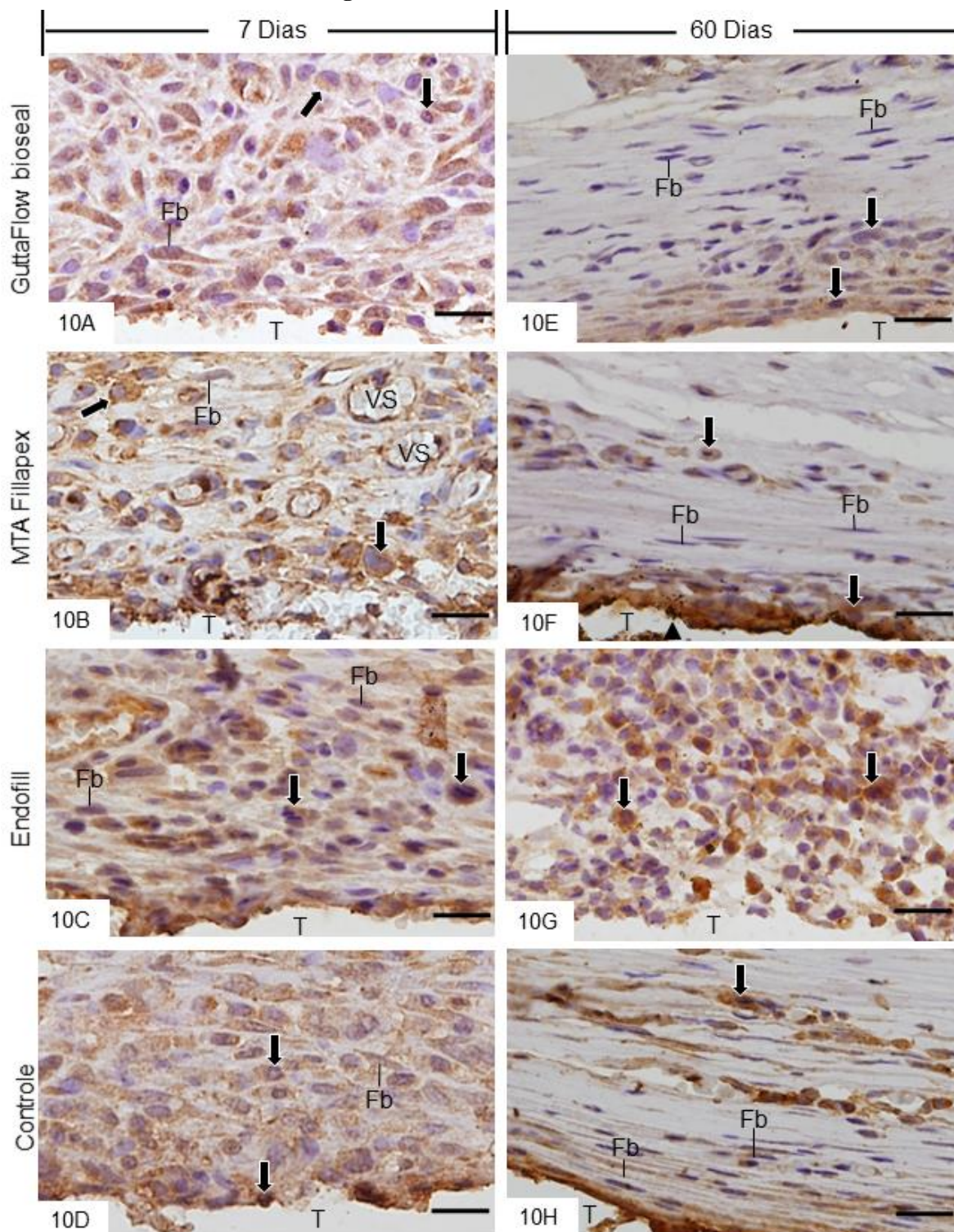
Tabela 3– Densidade numérica de células positivas à IL-6 nas cápsulas adjacentes aos implantes dos grupos GuttaFlow bioseal (GFB), MTA Fillapex (MTAF), Endofill (EF) e Controle (GC) após 7, 15, 30 e 60 dias.

Períodos	GFB	MTAF	EF	GC
7 dias	720 ± 18 ^{a;1}	924 ± 7 ^{b;1}	1.303 ± 11 ^{c;1}	454 ± 9 ^{d;1}
15 dias	601 ± 8 ^{a;2}	728 ± 6 ^{b;2}	1.051 ± 4 ^{c;2}	300 ± 7 ^{d;2}
30 dias	370 ± 12 ^{a;3}	447 ± 11 ^{b;3}	912 ± 7 ^{c;3}	193 ± 7 ^{d;3}
60 dias	288 ± 7 ^{a;4}	398 ± 3 ^{b;4}	510 ± 9 ^{c;4}	85 ± 7 ^{d;4}

Valores numéricos representam média ± desvio padrão. A comparação entre os grupos no mesmo período é indicado por letras sobrescritas nas linhas; letras iguais = sem diferença estatística significativa. A comparação entre os períodos é indicada por números sobrescritos nas colunas; números iguais = sem diferença estatística significativa. Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

Figura 10 – Prancha IL-6 7 e 60 dias



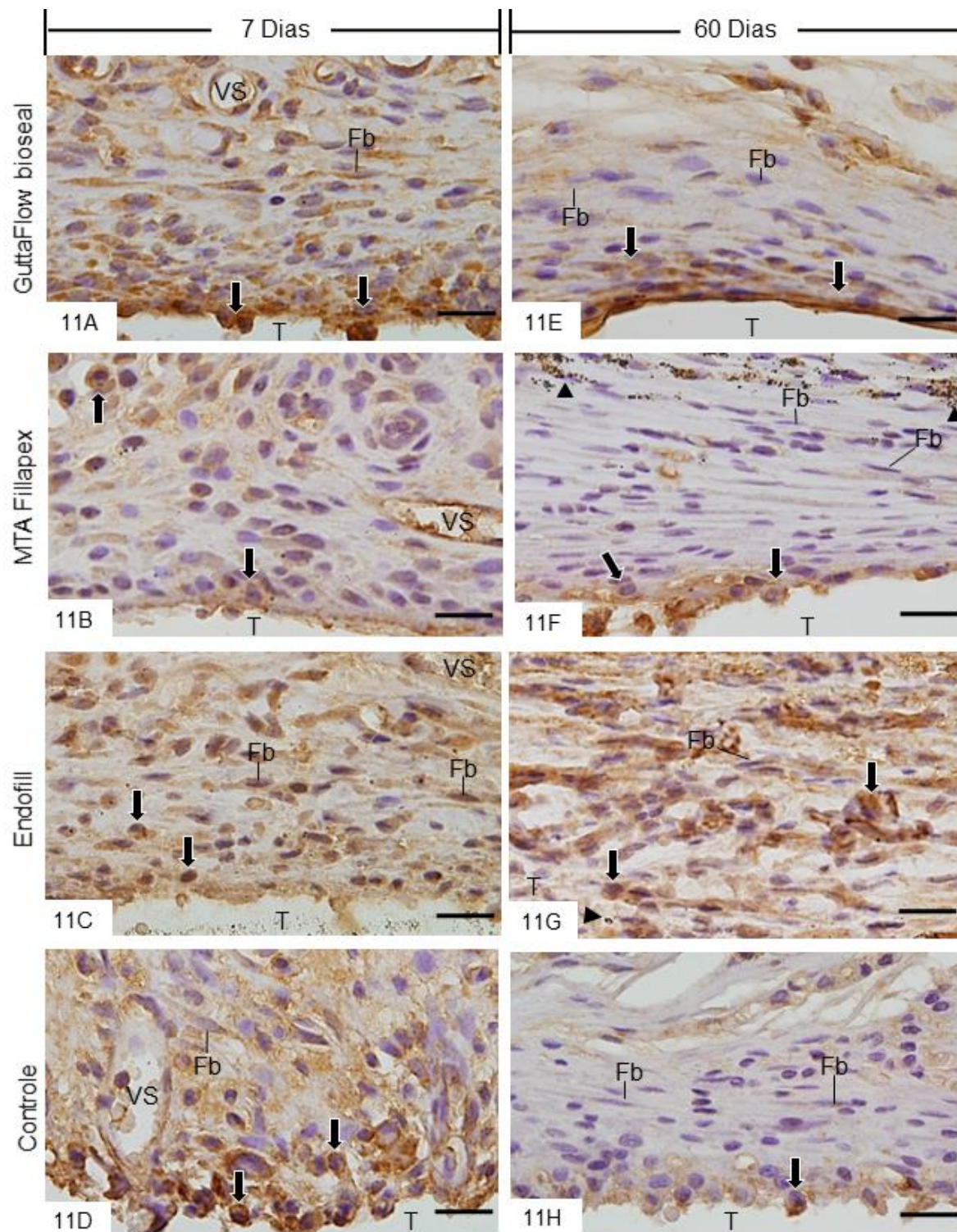
Fonte: Elaboração própria.

Fotomicrografias mostrando cortes das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 7 (**Figuras 10A-10D**) e 60 dias (**Figuras 10E-10H**). Os cortes foram submetidos à imuno-histoquímica para detecção de IL-6 (em castanho) e contracolorados com hematoxilina. **Figuras 10A-10D** – as cápsulas contêm diversas células imunopositivas à IL-6, principalmente células inflamatórias (setas). **Figuras 10E-10H** – as cápsulas dos grupos GFB, MTAF e controle exibem poucas células IL-6-imunopositivas enquanto que no grupo EF (**Figura 10G**) diversas células inflamatórias (setas) imunomarcadas são observadas. Fb, fibroblastos (Fb); VS, vasos sanguíneos; Cabeça de seta: partículas de cimento. Barras: 20 µm.

5.5 Resultados da Reação Imuno-Histoquímica para Detecção de VEGF

Os cortes das cápsulas submetidos à reação imuno-histoquímica para VEGF mostraram células imunomarcadas (em castanho) nas cápsulas de todos os grupos e períodos. Aos 7 dias, além das células endoteliais, diversas células inflamatórias e alguns fibroblastos exibiram forte imunopositividade (Figuras 11A-11D). A análise qualitativa revelou uma gradativa redução da imunoposição com o decorrer do tempo. Assim, uma redução evidente na imunoposição para VEGF foi observada nas cápsulas após 60 dias aos implantes de todos os grupos, com exceção do grupo EF (Figuras 11E-11H). No grupo EF (Figura 11G), diversas células inflamatórias apresentam intensa imunopositividade ao VEGF. Os cortes incubados com soro em substituição ao anticorpo primário (controle negativo), não exibiram células imunopositivas (dados não ilustrados).

Figura 11 – Prancha VEGF 7 e 60 dias

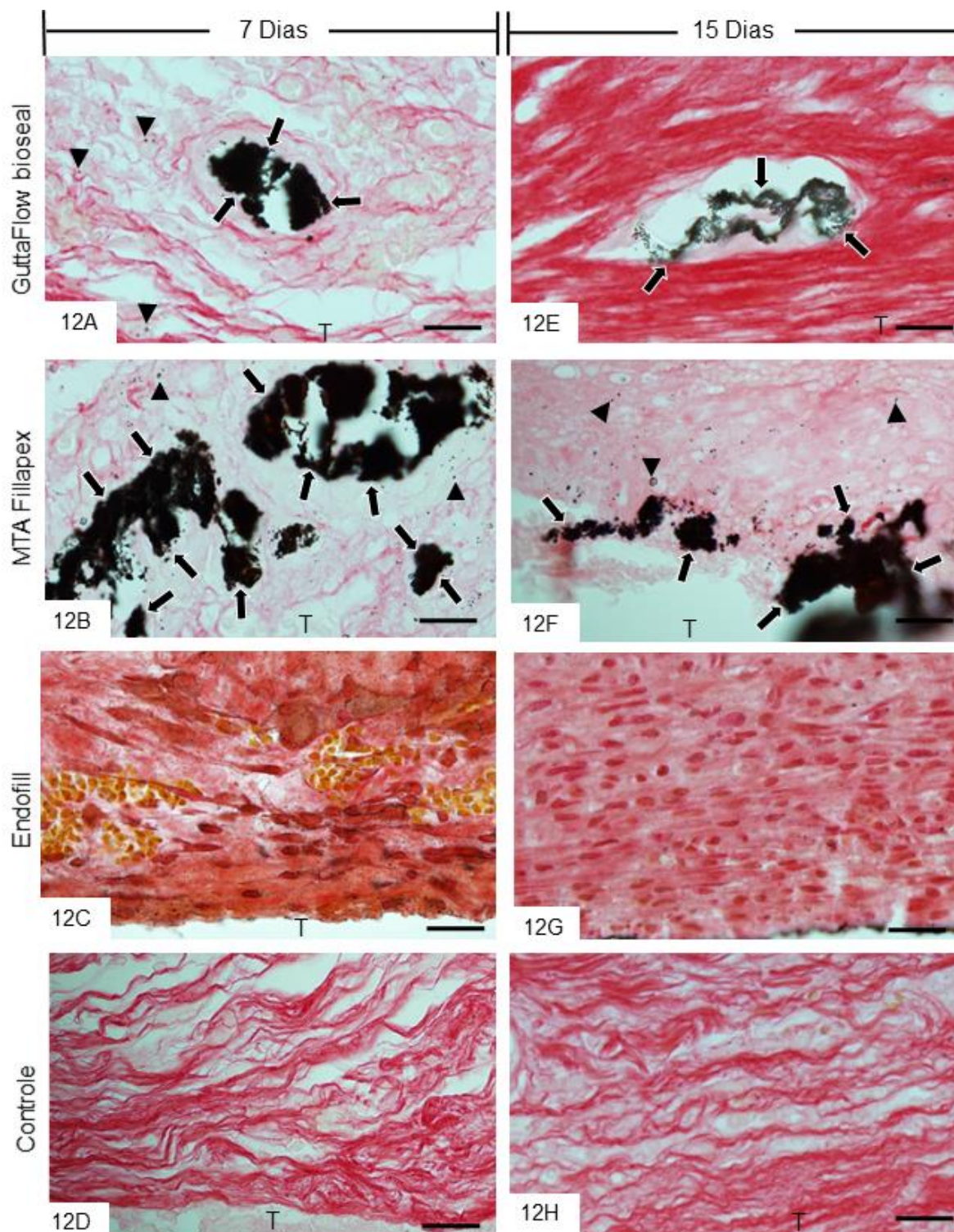


Fonte: Elaboração própria.

Fotomicrografias mostrando cortes das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 7 (**Figuras 11A-11D**) e 60 dias (**Figuras 11E-11H**). Os cortes foram submetidos à imuno-histoquímica para detecção de VEGF (em castanho) e contracolorados com hematoxilina. **Figuras 11A-11D** – as cápsulas contêm diversas células imunopositivas ao VEGF, principalmente células inflamatórias (setas). **Figuras 11E-11H** – as cápsulas dos grupos GFB, MTAF e controle exibem poucas células VEGF-imunopositivas enquanto que no grupo EF (**Figura 11G**) diversas células inflamatórias (setas) imunomarcadas são observadas. Fb, fibroblastos (Fb); VS, vasos sanguíneos; Cabeça de seta: partículas de cimento. Barras: 20 μ m.

5.6 Reação Histoquímica de von Kossa

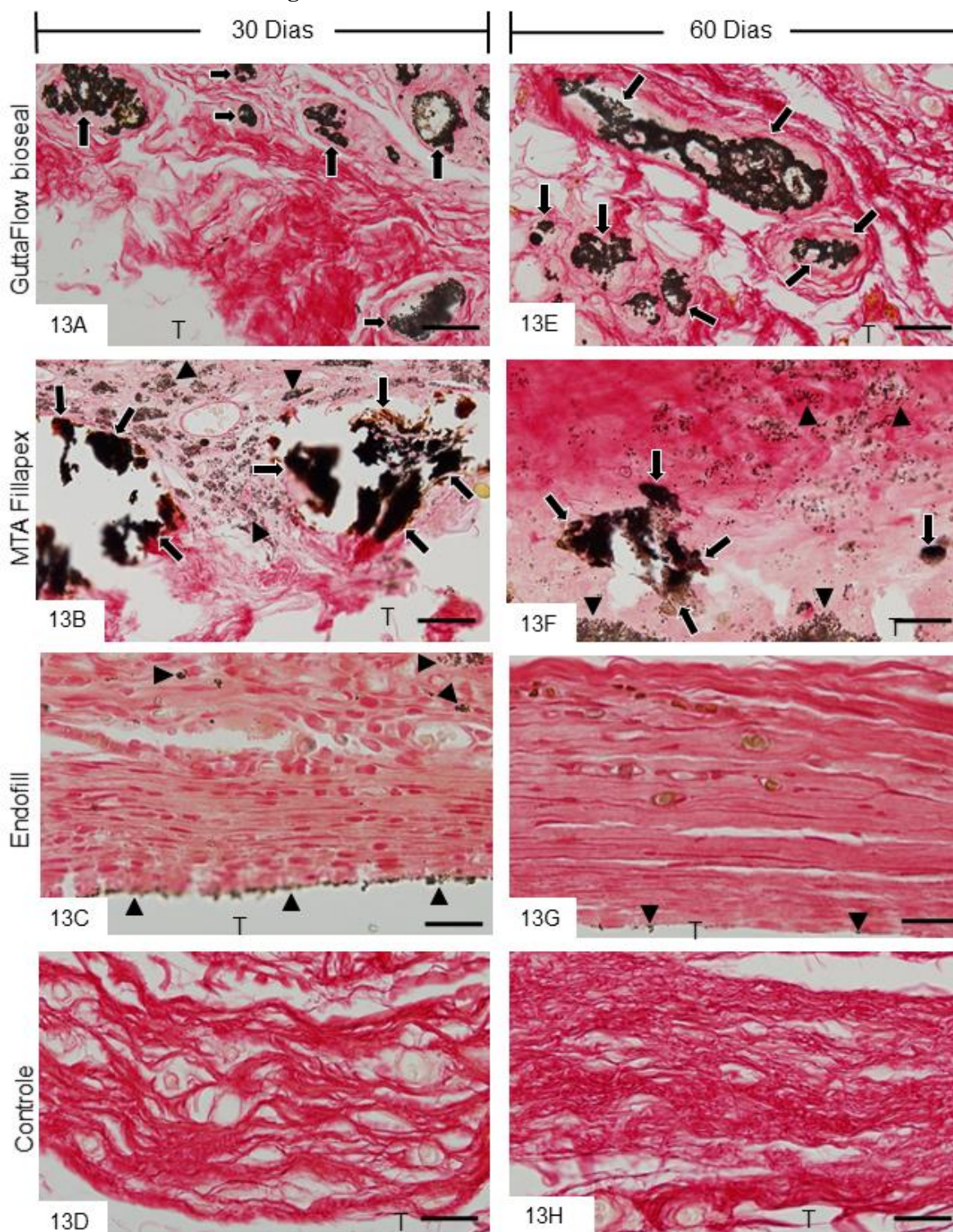
Os cortes dos implantes dos grupos GBF e MTAF submetidos ao método histoquímico von Kossa revelaram estruturas em preto, ou seja, positivas ao von Kossa, em todos os períodos (Figuras 12A, 12B, 12E, 12F, 13A, 13B, 13E e 13F). Os depósitos von Kossa-positivos foram observados dispersos entre as células e fibras colágenas (Figuras 12A, 12B, 12E, 13A e 13E) bem como na superfície interna das cápsulas (Figuras 12F, 13B e 13F). Depósitos von Kossa-positivos não foram observados nas cápsulas dos grupos EF e no GC (Figuras 12C, 12D, 12G, 12H, 13C, 13D, 13G e 13H).

Figura 12 – Prancha von Kossa 7 e 15 dias

Fonte: Elaboração própria.

Fotomicrografias mostrando cortes das cápsulas submetidos ao método de von Kossa e contracorados com picrossirius. As fotomicrografias mostram porções das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 30 (**Figuras 12A-12D**) e 60 (**Figuras 12E-12H**) dias. As cápsulas dos grupos GFB e MTAF exibem estruturas irregulares e positivas ao von Kossa (em preto; Figuras 12A, 12B, 12E e 12F) enquanto nos grupos EF (Figuras 12C e 12G) e GC (Figuras 12D e 12H) estruturas von Kossa-positivas não são observadas. Partículas de cimento dispersas nas cápsulas (cabecinhas de seta). VS, vasos sanguíneos. Setas evidenciam estruturas positivas para precipitação de cálcio. Barras: 20 µm. von Kossa e Picrossirius-red.

Figura 13 – Prancha von Kossa 30 e 60 dias



Fonte: Elaboração própria.

Fotomicrografias mostrando cortes das cápsulas submetidos ao método de von Kossa e contracorados com picrossírius. As fotomicrografias mostram porções das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos após 7 (**Figuras 13A-13D**) e 15 (**Figuras 13E-13H**) dias. Depósitos von Kossa-positivos (em preto) são observados entre os demais componentes das cápsulas (Figuras 13A, 13B e 13E) e na sua superfície (Figura 13F). Note que nos grupos EF (Figuras 13C e 13G) e GC (Figuras 13D e 13H) estruturas von Kossa-positivas não são observadas. Setas evidenciam estruturas positivas para precipitação de cálcio (positivas ao von-Kossa). Barras: 20 μ m. von Kossa e Picrosírius-red.

6 DISCUSSÃO

Considerando que os cimentos endodônticos entram em íntimo contato com os tecidos apicais e periapicais, a biocompatibilidade é uma das características mais importantes, pois os materiais liberam substâncias que interagem com os tecidos perirradiculares^{88,51,78}. A liberação destas substâncias pode desencadear uma resposta imuno-inflamatória do hospedeiro, estimulando a migração e diferenciação de células inflamatórias e, conseqüentemente, ocasionando uma reação inflamatória^{82,61}. Dessa maneira, a intensidade da reação inflamatória bem como o tempo de duração desta reação está intimamente associada a composição química dos materiais. A compreensão da resposta inflamatória aos materiais de obturação é essencial para o sucesso clínico no tratamento endodôntico³⁸. O implante de materiais odontológicos em subcutâneo de ratos é amplamente utilizado para avaliar a biocompatibilidade^{33,66,97,19,76}. A avaliação da biocompatibilidade in vivo é importante, pois permite esclarecer os mecanismos celulares e moleculares que desencadeiam a reação inflamatória promovida pelos cimentos em contato com os tecidos^{81,19,76}.

Os resultados do presente estudo in vivo mostraram que todos os cimentos utilizados induziram uma reação inflamatória que foi mais intensa aos 7 dias, observando-se uma significativa redução no número de células inflamatórias com o decorrer dos períodos. Além disso, nos grupos GFB e MTAF a diminuição do processo inflamatório ocorreu concomitante ao aumento evidente de fibras colágenas nas cápsulas adjacentes aos materiais. Concomitantemente a redução do processo inflamatório, a espessura das cápsulas adjacentes aos materiais implantados no subcutâneo dos animais, apresentou uma redução na sua espessura e melhor organização com o decorrer dos períodos, particularmente nos grupos GFB e MTAF. A regressão do processo inflamatório acompanhada pela formação de finas cápsulas contendo colágeno indica que estes materiais são biocompatíveis⁷⁶.

Os três cimentos estudados causaram uma reação inflamatória no tecido subcutâneo, no entanto, com uma variedade no grau de intensidade desta reação. Assim, o GuttaFlow bioseal foi o cimento que induziu inicialmente a menor reação inflamatória, desde que, aos 7 dias, o número de células inflamatórias nas cápsulas foi significativamente menor em comparação ao MTAF e ao Endofill. Portanto, estes resultados indicam que a intensidade dessa reação está relacionada com o tipo do cimento e o período que o material permaneceu

implantado no animal⁸. Os materiais que apresentam propriedades adequadas, como baixa porosidade e solubilidade, tempo de presa adequado, e propriedades biológicas favoráveis aos tecidos, representam o “padrão ouro” para o preenchimento dos canais radiculares, contribuindo assim para a reparação e regeneração tecidual^{36,69}.

No presente estudo, o GuttaFlow bioseal apresentou diferença significativa em relação ao MTA Fillapex com relação a reação inflamatória, sendo que um menor número de células inflamatórias foi observado nas cápsulas do GuttaFlow bioseal, aos 7, 15 e 30 dias. Adicionalmente, o GuttaFlow bioseal e o MTA Fillapex induziram a formação de um menor processo inflamatório em comparação ao Endofill, sendo que as cápsulas do Endofill apresentaram um infiltrado inflamatório moderado persistente aos 60 dias. O grupo controle apresentou o menor número de células inflamatórias em todos os períodos, quando comparado com os demais grupos.

A inflamação persistente do cimento Endofill é uma resposta característica deste material, considerada indesejável do ponto de vista biológico. Esse maior potencial de irritação aos tecidos é consequência dos componentes dos cimentos à base de óxido de zinco e eugenol^{94,6}. Estudos sobre cimentos à base de óxido de zinco e eugenol atribuem a baixa tolerância tecidual, devido ao eugenol e sua liberação lenta e prolongada. Além disso, os íons de zinco causam uma atividade deletéria secundária, levando a um quadro de inflamação crônica^{26,71,8,76}. No nosso estudo, a proporção utilizada foi de 1g de pó para 220µl de eugenol (5:1), ou seja, a mínima quantidade de eugenol necessária para proporcionar ao cimento uma consistência ideal, de acordo com o fabricante^{9,20}. Diversos estudos têm reportado que o Endofill provoca uma reação inflamatória moderadamente intensa 90 dias após a obturação de canais radiculares de cães⁵⁵ e intolerância tecidual, apresentando-se altamente tóxico quando avaliado *in vitro*^{81,61,95}. Os nossos resultados confirmaram estes dados, desde que uma reação inflamatória moderada persistiu após 60 dias aos implantes no subcutâneo.

É possível que a reação inflamatória mais intensa promovida inicialmente pelo MTA Fillapex possa ser explicada pela presença das resinas e a menor proporção de silicato tricálcico deste cimento em comparação ao MTA puro. O MTA Fillapex apresentou maior citotoxicidade em valores absolutos nas concentrações de 1:4 e 1:8 em comparação aos cimentos AH Plus e Endoseal⁵⁹. O MTA Fillapex apresentou alta citotoxicidade em todos os tempos de extração⁶⁹. Células do ligamento periodontal cultivadas com GuttaFlow bioseal

apresentaram maior viabilidade do que quando comparadas com o MTA Fillapex¹⁷. O MTA Fillapex possui um tempo de presa prolongado, podendo solubilizar-se no meio, liberando possivelmente componentes tóxicos, como a resina de salicilato, resina de diluição e sílica presentes em sua composição. A liberação destes componentes durante a reação de presa química, torna o material menos tolerado^{94,59,78,69}. Assim, a injúria tecidual provocada pelo MTA Fillapex nos períodos iniciais, pode também ser relacionada com o tempo de presa do material, que é prolongado, obtendo presa final após 20 horas^{98,59} e alta solubilidade de 20-30%, liberando resina salicilato por um longo período, interferindo na biocompatibilidade^{40,85,98}. No entanto, diferenças significantes no número de células inflamatórias entre o MTF e o GFB não foram detectadas aos 60 dias reforçando, portanto, a ideia de que a reação inflamatória inicialmente promovida pelo MTA F deve ser em decorrência da liberação de substâncias durante a sua presa. Assim, os nossos resultados indicam que a reação inflamatória inicialmente estimulada pelo MTA Fillapex regride com o decorrer do tempo, apresentando, portanto, biocompatibilidade.

Os resultados imuno-histoquímicos também revelaram uma nítida diferença no padrão da imunoposição para IL-6 entre os grupos, em todos os períodos. Embora células imunomarcadas para IL-6 nas cápsulas foram observadas em todos os períodos, houve acentuada imunopositividade nas cápsulas ao redor dos implantes aos 7 dias. A acentuada imunoposição observada nas cápsulas foi concomitante a incidência de linfócitos, macrófagos e plasmócitos, indicando que esta interleucina deve participar na instalação e progressão da resposta imuno-inflamatória promovida pelos implantes no subcutâneo, como demonstrado anteriormente^{86,87,19,76}. De fato, uma redução tanto de células imunomarcadas para IL-6 quanto da reação inflamatória foi observada com o decorrer do tempo, em todos os grupos. Além disso, nossos resultados mostraram uma diferença significativa na imunoposição entre os grupos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex, sendo que um número menor de células imunopositivas à IL-6 foi observada no GuttaFlow bioseal, em todos os períodos. Assim, os resultados relativos à IL-6 suportam a ideia de que as alterações estruturais provocadas pelo GuttaFlow bioseal são de menor amplitude em comparação ao MTA Fillapex. Apesar das diferenças significantes na imunoposição de IL-6 observadas entre os grupos com cimentos e o grupo controle, pode-se sugerir que o potencial irritante dos materiais aos tecidos é baixo, com exceção do Endofill. Embora o GuttaFlow Bioseal e MTA Fillapex, aos 60 dias, apresentaram um

número maior de células imunopositivas à IL-6 em comparação ao grupo controle, os valores destes grupos foram menores que o observado no Endofill. O elevado número de células positivas à IL-6, aos 60 dias, observado nas cápsulas do grupo EF foi acompanhado pelo número de células inflamatórias, reforçando o conceito do seu efeito citotóxico prolongado. Além disso, nas cápsulas dos grupos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex a redução da imunoexpressão para IL-6 foi acompanhada pela redução da reação inflamatória e presença marcante de fibroblastos e fibras colágenas nas cápsulas dos grupos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex com o decorrer do tempo, indicando que os efeitos deletérios promovidos por estes cimentos são temporários. De fato, a presença de células endoteliais bem como alguns fibroblastos positivos à IL-6 nas cápsulas, inclusive do grupo GC aponta para uma possível participação desta citocina no controle de metaloproteinases da matriz (MMP), enzimas responsáveis pela remodelação dos componentes da matriz extracelular²⁴. A presença de células imunomarcadas para IL-6 aos 60 dias, sugere que esta interleucina deve também estar envolvida no processo de remodelação das cápsulas formadas em resposta aos implantes no subcutâneo^{19,76}.

Adicionalmente, a presença de diversas células imunopositivas ao VEGF, um fator de crescimento que tem estimula a migração celular e proliferação celular, bem como a diferenciação de células tronco⁴³ foi observada inicialmente, portanto, concomitantemente ao processo inflamatório. O VEGF tem um papel importante na proliferação de células endoteliais, aumenta a permeabilidade vascular e promove neovascularização²³. A angiogênese possibilita a formação de uma profusa rede de vasos sanguíneos e, conseqüentemente, o maior recrutamento de células inflamatórias levando à formação de um tecido de granulação inicial. Além das células inflamatórias, células mesenquimais também são recrutadas durante a fase fibrovascular da reparação⁴². Considerando que o VEGF aumenta a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, facilita a diapedese dos leucócitos para o tecido conjuntivo, a reduzida imunoexpressão observada aos 60 dias nas cápsulas dos grupos GFB, MTAF e GC deve estar diretamente associada com a diminuição significativa da reação inflamatória. De fato, uma acentuada imunoexpressão para VEGF foi observada nas cápsulas do Endofill que apresentaram um persistente processo inflamatório aos 60 dias. Portanto, nos períodos iniciais, a evidente imunoexpressão para VEGF deve estar associada ao estabelecimento do tecido do processo inflamatório e sua substituição pelo tecido de granulação. No presente estudo, com a regressão do processo inflamatório ocorreu a

proliferação de fibroblastos e formação de fibras colágenas, indícios de reparação tecidual como observado nas cápsulas dos grupos GFB, MTAF e GC aos 60 dias.

Cimentos de silicato de cálcio possuem comportamento bioativo, são biointerativos, capazes de liberarem íons para nucleação dos depósitos de apatita na superfície em um curto período de indução, sendo fundamentais para induzir a remineralização^{35,36}. Estes cimentos são capazes de liberar íons biologicamente relevantes (Ca^{+2} e OH^-), atuando em diversas células envolvidas no processo de mineralização, dentre elas os osteoblastos e os cementoblastos, sendo considerados, portanto osteoindutores. Os cimentos que contém silicato de cálcio apresentam pH alcalino, com capacidade de nuclear depósitos de cálcio³⁶. Em nosso estudo, o GuttaFlow bioseal dentre os cimentos, apresentou a menor reação inflamatória quando comparado ao MTA Fillapex e ao Endofill, além da presença de precipitação de cálcio nas cápsulas como revelado pelo método von Kossa.

Os nossos resultados obtidos com o método de von Kossa revelaram a presença de estruturas com arranjo irregular contendo cálcio nas cápsulas adjacentes aos cimentos GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex indicando que estes cimentos podem estimular a formação de estruturas mineralizadas. GuttaFlow bioseal difere dos outros cimentos, pois contém vidro bioativo, este material é sólido (não poroso) constituído por sílica, óxido de cálcio, óxido de sódio, óxido de fósforo e silicatos. Há evidências de que estes cimentos possuem capacidade de nuclear depósitos de hidroxiapatita, atividade alcalinizante e liberação de cálcio^{39,37} e, portanto, o cimento contendo vidro bioativo é indicado em casos onde é necessário o reparo de tecido mineralizado. O material bioativo, quando colocado em um ambiente biológico, como o fluido corporal, interage quimicamente com o meio e com os tecidos que se encontram em contato com o material. Geralmente a interação envolve a modificação química do vidro e a liberação de íons no ambiente biológico, que é supersaturado em relação aos constituintes de apatita²⁷. Estas características proporcionam a estes materiais as propriedades osteoindutoras e osteocondutoras, devido os cristais de hidroxiapatita serem semelhantes ao do osso e ao entrarem em contato com os fluídos dos tecidos periapicais, interagem-se com o tecido ósseo. Em nossas análises, o MTA Fillapex apresentou também capacidade de estimular a deposição de estruturas contendo cálcio, porém, o GFB promoveu uma reação inflamatória inicial menor em comparação ao MTA Fillapex. Além disso, o GuttaFlow bioseal induziu a formação de cápsulas significativamente mais delgadas em comparação ao MTA Fillapex, em todos os períodos. Estes resultados

indicam claramente que o potencial irritante do GuttaFlow bioseal é menor do que o MTA Fillapex, induzindo uma reação inflamatória de menor intensidade e possibilitando ao hospedeiro a regressão mais rápida desta reação. É possível sugerir que esta diferença na resposta biológica entre estes dois cimentos seja, pelo menos em parte, em decorrência da presença do vidro bioativo no GuttaFlow bioseal e de resinas no MTA Fillapex^{39,78}. A ausência de depósitos de cálcio nas cápsulas do Endofill e do grupo controle reforça o conceito de que o GuttaFlow bioseal e o MTA Fillapex são cimentos com potencial osteogênico.

Pode-se concluir que os materiais GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex apresentam uma resposta tecidual satisfatória, desde que ocorre redução no número de células inflamatórias e na imunexpressão à IL-6, bem como a formação de fibras colágenas adjacentes as cápsulas destes materiais, especialmente, no período de 60 dias. Assim, esses cimentos podem ser considerados biocompatíveis. Além disso, o GuttaFlow bioseal e MTA Fillapex induzem a formação de estruturas contendo cálcio, sugerindo que estes cimentos podem apresentar potencial bioativo e podem induzir a mineralização, conseqüentemente, podem estimular os processos de reparação e/ou de regeneração dos tecidos mineralizados.

7 CONCLUSÃO

- A redução significativa do processo inflamatório acompanhada pela formação de fibras colágenas nas cápsulas do GuttaFlow bioseal e do MTA Fillapex indica que esses cimentos são biocompatíveis.
- A redução do número de células imunopositivas à IL-6 e ao VEGF nas cápsulas do GuttaFlow Bioseal e do MTA Fillapex indica que estes cimentos permitem a formação de delgadas cápsulas fibrosas. Assim, estes cimentos devem possibilitar a regeneração e/ou reparação dos tecidos conjuntivos.
- A presença de depósitos de cálcio nas cápsulas do GuttaFlow bioseal e do MTA Fillapex sugere que estes exibem potencial de mineralização, baseado na análise através do teste de von Kossa.
- O Endofill induz a formação de infiltrado inflamatório crônico e não apresenta bioatividade.

REFERÊNCIAS*

1. Accardo C, Himel VT, Lallier TE. A novel guttaflow sealer supports cell survival and attachment. *J Endod.* 2014; 40(2): 231-4.
2. Akcay M, Arslan H, Durmus N, Mese M, Capar ID. Dentinal tubule penetration of AH Plus, iRoot SP, MTA fillapex, and guttaflow bioseal root canal sealers after diferente final irrigation procedures: a confocal microscopic study. *Lasers Surg Med.* 2016; 48(1): 70-6.
3. Almeida WA, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Silva LAB. Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. *Int Endod J.* 2000; 33(1): 25-7.
4. Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LTA. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J.* 2014; 47(7): 615-21.
5. Baldasso FER. Resposta tecidual frente ao cimento endodôntico guttaflow: avaliação em tecido conjuntivo de ratos [trabalho de conclusão de curso de especialização em endodontia]. Porto Alegre: Faculdade de Odontologia UFRGS; 2014.
6. Baldasso FER, Kopper PMP, Morgental RDM, Steier L, Figueiredo JAP, Scarparo RK. Biological tissue response to a new formulation of a silicone based endodontic sealer. *Braz Dent J.* 2016; 27(6): 657-63.
7. Barkhordar RA, Hayashi C, Hussain MZ. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1999; 15(1):26-7.
8. Batista RFC, Hidalgo MM, Hernandez L, Consolaro A, Velloso TRG, Cuman RKN, et al. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. *J Biomed Mater Res A.* 2007; 81(1): 171-7.
9. Bernabé PFE, Holland R, Morandi R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, et al. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. *Baz Dent J.* 2005; 16(2): 149-55.
10. Bin CV, Valera MC, Camargo SEA, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012; 38(4): 495-50.
11. Blackman RB, Gross M, Seltzer S. An evaluation of the biocompatibility of a glass ionomer-silver cement in rat connective tissue. *J Endod.* 1989; 15(2): 76-9.
12. Bósio CC, Bortoluzzi FEA, Felipe MCS, Felipe WT, Rivero ERC. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. *Int Endod J.* 2014; 47(7): 667-74.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

13. Bouillaguet S, Shaw L, Barthelemy J, Krejci I, Wataha JC. Long-term sealing ability of Pulp Canal Sealer, AH-Plus, Guttaflow and Epiphany. *Int Endod J.* 2008; 41(3): 219-26.
14. Camargo RV, Silva-Sousa YTC, Rosa RPF, Mazzi-Chaves JF, Lopes FC, Steier L, et al. Evaluation of the physicochemical properties of silicone-and epoxy resin-based root canal sealers. *Braz Oral Res.* 2017; 31: e72.
15. Camilleri J. Evaluation of selected properties of mineral trioxide aggregate sealer cement. *J Endod.* 2009; 35(10): 1412-7.
16. Camilleri J, Formosa L, Damidot D. The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J.* 2013; 46(9): 831-40.
17. Collado-González M, Tomás-Catalá CJ, Oñate-Sánchez RE, Moraleda JM, Rodríguez-Lozano FJ. Cytotoxicity of Guttaflow Bioseal, GuttaFlow 2, MTA Fillapex, and AH Plus on human periodontal ligament stem cells. *J Endod.* 2017; 43(5): 816-22.
18. Coltene [homepage na internet]. Langenau: Coltene; [acesso em 2017 abr 10]. Disponível em: https://www.coltene.com/fileadmin/Data/EN/Products/Endodontics/Root_Canal_Obturation/GuttaFlow_bioseal/60019782_04-16_GuttaFlow_bioseal_PT.pdf
19. da Fonseca TS, Da Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. In vivo evaluation of the inflammatory response na IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J.* 2016; 49(2):145-53.
20. da Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanoamaru-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.
21. da Silva EJNL, Accorsi-Mendonça T, Pedrosa AC, Granjeiro JM, Zaia AA. Long-term cytotoxicity, ph and dissolution rate of AH Plus and MTA Fillapex. *Braz Dent J.* 2016; 27(4): 419-23.
22. Daming WU, Tang Z, Zhang G, Liu W. The sealing ability of a new silicone-based root canal filling material (guttaflow): an in vitro study using the percentage of gutta-percha-filled area. *Dent Mater J.* 2011; 30(5): 569-75.
23. de Mayo T, Conget P, Becerra-Bayona S, Sossa CL, Galvis V, Arango-Rodriguez ML. The role of bone marrow mesenchymal stromal cell derivatives in skin wound healing in diabetic mice. *PLoS One.* 2017; 12(6): e0177533.
24. de Oliveira PA, de Pizzol-Júnior JP, Longhini R, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine Reduces Interleukin-6, Matrix Metalloproteinases-1 and -9 Immunoexpression in the gingival mucosa of rat molars with induced periodontal disease. *J Periodontol.* 2017; 88(1): 100-11.

25. Dimmeler S, Zeiher AM. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res.* 2000; 87(6): 434-9.
26. Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod.* 1995; 21(3): 122-7.
27. Efflandt SE, Magne P, Douglas WH, Francis LF. Interaction between bioactive glasses and human dentin. *J Mater Sci Mater Med.* 2002; 13(6): 557-65.
28. Elayouti A, Achleithner C, Lost C, Weiger R. Homogeneity and adaptation of a new gutta-percha paste to root canal walls. *J Endod.* 2005; 31(9): 687-90.
29. Endofill [bula]. Petrópolis: Dentsply; 2016.
30. Faraoni G, Finger MS, Masson MC, Victorino FR. Avaliação comparativa do escoamento e tempo de presa do cimento MTA fillapex. *RFO.* 2013; 18(2): 180-4.
31. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FLCV, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J.* 2013; 46(8): 755-62.
32. Fathia E, Abu-bakr NH, Yahia I. A comparative study of the microleakage of Resilon/Epiphany and Gutta-Percha/AH-Plus obturating systems. *Iran Endod J.* 2012; 7(3): 139-43.
33. FDI. Fédération Dentaire Internationale. Recommended standard practices for the biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1980; 30(2):140-88.
34. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 421746.
35. Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, Stefano ED, Prati C. Biomimetic remineralization of human dentin using promising innovative calcium-silicated hybrid “smart” materials. *Dent Mater.* 2011; 27(11): 1055-69.
36. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Properties of a novel polysiloxane-guttapercha calcium silicate-bioglass-containing root canal sealer. *Dent Mater.* 2016; 32(5):e113-26.
37. Gencoglu N, Sener G, Omurtag GZ, Tozan A, Uslu B, Arbak S, et al. Comparison of biocompatibility and cytotoxicity of two new root canal sealers. *Acta Histochem.* 2009; 112(6):567-75.
38. Ghanaati S, Willershausen I, Barbeck M, Unger RE, Joergens M, Sader RA, et al. Tissue reaction to sealing materials: different view at biocompatibility. *Eur J Med Res.* 2010; 25(15): 483-92.

39. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury. Care.* 2005; 36(3): s20-7.
40. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LTA, Mauro MJ, Otoboni Filho JA, et al. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX®. *Dent Traumatol.* 2012; 28(6): 452-6.
41. Guinesi AS, Faria G, Tanomaru-Filho M, Bonetti-Filho I. Influence of sealer placement technique on the quality of root canal filling by lateral compaction or single cone. *Braz Dent J.* 2014; 25(2): 117-22.
42. Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015; 1(94): 3-12.
43. Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest.* 1994; 93(6): 2490-6.
44. Hashizume M, Mihara M. The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis.* 2011; 2011:765624.
45. Herbert J, Bruder M, Braunsteiner J, Altenburguer MJ, Karl-Thomas W. Apical quality and adaptation of Resilon, EndoREZ, and Guttaflow root canal fillings in combination with a noncompaction technique. *J Endod.* 2009; 35(2): 261-4.
46. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999; 25(3): 161-6.
47. Kala M, Torvi SJ. An in vitro comparison of apical leakage in immediate versus delayed post space preparation using EndoREZ and RoekoSeal root canal sealers. *J Int Clin Dent Res Organ.* 2015; 7(1): 30-4.
48. Kangarlou A, Dianat O, Esfahrood ZR, Asharaf H, Zandi B, Eslami G. Bacterial leakage of Guttaflow-filled root canals compared with Resilon/Epiphany and Gutta-percha/AH 26-filled root canals. *Aust Endod J.* 2012; 38(1): 10-3.
49. Kilkis BT, Kursat ER, Tasdemir T, Yildirim M, Taskesen F, Tumkaya L, et al. Neurotoxicity of various root canal sealers on rat sciatic nerve: an electrophysiologic and histopathologic study. *Clin Oral Invest.* 2015; 19(8): 2091-100.
50. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 2010; 22(5): 347-52.
51. Konjhodzic-Prcic A, Gorduysus O, Kucukkaya S, Atila B, Muftuoglu S, Zeybek D. In vitro comparison of cytotoxicity of four root canal sealers on human gingival fibroblasts. *Med Arh.* 2015; 69(1): 24-7.

52. Koulaouzidou EA, Economides N, Beltes P, Geromichalos G, Papazisis K. In vitro evaluation of the cytotoxicity of ProRoot MTA and MTA Angelus. *J Oral Sci.* 2008; 50(4): 397-2.
53. Lee SK, Lorenzo JA. Regulation of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin mRNA expression by parathyroid hormone is predominantly mediated by the protein kinase a pathway in murine bone marrow cultures. *Bone.* 2002; 31(1): 252-9.
54. Leonardo MR, Almeida WA, Silva LAB, Utrilla LS. Histological evaluation of the response of apical tissues to glass ionomer and zinc oxide-eugenol based sealers in dog teeth after root canal treatment. *Endod Dent Traumatol.* 1998; 14(6): 257-61.
55. Leonardo MR, Almeida WA, Silva LAB, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol.* 1999; 15(1): 28-32.
56. Li Y, Chi L, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Histamine-induced production of interleukin-6 and interleukin-8 by human coronary artery endothelial cells is enhanced by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Microvasc Res* 2001; 61(3): 253-2.
57. Longhini R, de Oliveira PA, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. *J Periodontol* 2014; 85(8): 1115-25.
58. Mandal P, Zhao J, Sab SK, Huang Y, Liu J. In vitro cytotoxicity of guttaflow 2 on human gingival fibroblasts. *J Endod.* 2014; 40(8): 1156-9.
59. Marins FC, Ronconi CT, Saavedra FM, Lima ABM, Zaia AA, Moreira EJM, et al. Avaliação da citotoxicidade de dois cimentos à base de MTA: um estudo in vitro. *Rev Bras Odontol.* 2017; 74(1): 27-30.
60. Marques NCT, Neto NL, Fernandes AP, Rondini CO, Duarte MAH, Oliveira TM. Rat subcutaneous tissue response to MTA Fillapex® and Portland cement. *Braz Dent J.* 2013; 24(1): 10-4.
61. Martins VJM, Lins RX, Berlinck TCA, Fidel RAS. Cytotoxicity of root canal sealers on endothelial cell cultures. *Braz Dent J.* 2013; 24(1): 15-20.
62. Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MAH, Grizzo LT, Buzalaf MAR, et al. pH, calcium ion release, and setting time of an experimental MTA-based root canal sealer. *J Endod* 2011;37(6):844-6.
63. MTA Fillapex [bula]. Londrina: Angelus; 2017.
64. Nawal RR, Parande M, Sehgal R, Naik A, Rao NR. A comparative evaluation of antimicrobial efficacy and flow properties for Epiphany, Guttaflow and AH-Plus sealer. *Int Endod J.* 2011; 44(4): 307-13.
65. Oliveira ACM, Duque C. Atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos. *Rev Odontol Univ Cid.* 2013; 25(1): 58-7.




66. Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 1981; 7(8): 355-67.
67. Ozcan E, Eldeniz AU, Aydinbelge HA. Assessment of the sealing abilities of several root canal sealers and filing methods. *Acta Odontol Scand.* 2017; 71(6):1362-9.
68. Panzarini SR, Trevisan CL, Brandini DA, Poi WR, Sonoda CK, Luvizito ER, et al. Intracanal dressing and root canal filling materials in tooth replantation: a literature review. *Dent Traumatol.* 2012; 28(1): 42-8.
69. Poggio C, Riva P, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Comparative cytotoxicity evaluation of eight root canal sealers. *J Clin Exp Dent.* 2017; 9(4): 574-8.
70. Puchtler H, Meloan SN. Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction. *Histochemistry.* 1978; 56(4): 177-85.
71. Ranade MP, Kamra AI. A comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic materials. *Endodontology.* 2003; 15(1): 7-13.
72. Reyes-Carmona JF, Santos ARS, Figueiredo CP, Felipe MS, Felipe WT, Cordeiro MM. In vivo host interactions with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide: inflammatory molecular signaling assessment. *J Endod.* 2011; 37(9): 1225-35.
73. Ricucci D, Langeland K. Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 2. A histological study. *Int Endod J.* 31(6): 394-9.
74. Rincon M. Special issue on interleukin-6 (IL-6). *Int J Biol Sci.* 2012; 8(9): 1225-6.
75. Rungby J, Kassem M, Eriksen EF, Danscher G. The von Kossa reaction for calcium deposits: silver lactate staining increases sensitivity and reduces background. *Histochem J.* 1993; 25(6): 446-51.
76. Saraiva JA, da Fonseca TS, Silva GF, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, et al. Reduced interleukin-6 immunoreexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. *Biomed Mater.* 2018; 13(3): 1-12.
77. Savariz A, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Long-term sealing ability of Guttaflow versus Ah Plus using different obturation techniques. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010; 15(6): 936-41.
78. Saygili G, Saygili S, Tuglu I, Capar ID. In vitro cytotoxicity of GuttaFlow Bioseal, GuttaFlow 2, AH-Plus and MTA Fillapex. *Iran Endod J.* 2017; 12(3): 354-9.
79. Scelza MZ, Coil J, Alves GG. Effect of time extraction on the biocompatibility of endodontic sealers with primary human fibroblasts. *Braz Oral Res.* 2012; 26(5): 424-30.

80. 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.
81. Senne MI, Lemos N, Fidel SR, Fidel RAS. Avaliação da citotoxicidade dos três cimentos endodônticos empregados na obturação do sistema de canais radiculares. *RSBO*. 2009; 6(1): 71-6.
82. 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; 35(5): 899-903.
83. Shvero DK, Abramovitz I, Zaltsman N, Davidi MP, Weiss EI, Beyth N. Towards antibacterial endodontic sealers using quaternary ammonium nanoparticles. *Int Endod J*. 2013; 46(8): 747-54.
84. Siew K, Lee AHC, Cheung GSP. Treatment outcome of repaired root perforation: a systematic review and meta-analysis. *J Endod*. 2015; 41(11): 1795-804.
85. Silva EJNL, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BPFA, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod*. 2013; 39(2): 274-7.
86. 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; 102(12): 4336-45.
87. Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Investig*. 2015; 19(8): 2015-25.
88. Simsek N, Akinci L, Gecor O, Alan H, Ahmetoglu F, Taslidere E. Biocompatibility of a new epoxy resin-based root canal sealer in subcutaneous tissue of rat. *Eur J Dent*. 2015; 9(1): 31-5.
89. Sonu KR, Girish TN, Ponnappa, KC, Kishan KV, Thameem PK. Comparative evaluation of dentinal penetration of three different endodontic sealers with and without smear layer removal – scanning electron microscopic study. *Saudi Endod J*. 2016; 6(1):16-20.
90. Souza JRM, Oliveira RT, Blotta MHSL, Coelho OR. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18(IL-18) e proteína C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnívelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. *Arq Bras Cardiol* 2008; 90(2): 94-9.
91. Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. *Int Endod J*. 1998; 31(2): 85-9.

92. Tanomaru-Filho M, Faleiros FBC, Saçaki JN, Duarte MAH, 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.
93. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Chávez-Andrade GM, de Almeida M, Navarro LG, Steier L et al. Physicochemical properties and volumetric change of silicone/bioactive glass and calcium silicated-based endodontic sealers. *J Endod.* 2017; 43(12): 2097-101.
94. Tavares CO, Bottcher DE, Assman E, Kopper PMP, de Figueiredo JAP, Grecca FS, et al. Tissue reactions to a new mineral trioxide aggregate-containing endodontic sealer. *J Endod.* 2013; 39(5): 653-7.
95. Teixeira L, Basso FG, Hebling J, Costa CAS, Mori GG, Silva-Sousa YTC, et al. Cytotoxicity evaluation of root canal sealers using an in vitro experimental model with roots. *Braz Dent J.* 2017; 28(2): 165-71.
96. Vasiliadis L, Kodonas K, Economides N, Gocos C, Stavrianos C. Short-and long-term sealing ability off Gutta-flow and AH-Plus using an ex vivo fluid transport model. *Int Endod J.* 2010; 43(5): 377-81.
97. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012; 100(7): 1773-81.
98. Vitti RP, Prati C, Silva EJNL, Sinhoreti MAC, Zanchi CH, Silva MGS et al. Physical properties of MTA Fillapex sealer. *J Endod.* 2013; 39(7): 915-8.
99. Wang H, Keiser JA. Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998; 83(8): 832-40.
100. Wastein M, Morgental RD, Waltrick SBG, Oliveira SD, Vier-Pelisser FV, Figueiredo JAP et al. In vitro antibacterial activity of a silicone-based endodontic sealer and two conventional sealers. *Braz Oral Res.* 2016; 30(1): 1-5.
101. Willershausen I, Callaway A, Briseño B, Willershausen B. In vitro analysis of the cytotoxicity and the antimicrobial effect of four endodontic sealers. *Head Face Med.* 2011; 7(15): 1-9.
102. Yang Y, Tan Y, Wong R, Wenden A, Zhang L, Rabie ABM. The role of vascular endothelial growth factor in ossification. *Int J Oral Sci.* 2012; 4(2): 64-8.
103. Yesilsoy C, Koren LZ, Morse DR, Kobayashi C. A comparative tissue toxicity evaluation of established and newer root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988; 65(4): 459-67.
104. Yigiti DH, Gencoglu N. Evaluation of resin/silicone-based root canal sealers. Part I: physical properties. *Dig J Nanomater Biostruct.* 2012; 7(1): 107-15.

105. Zhou HM, Shen Y, Zheng W, Zheng Y, Haapasalo M. Physical properties of 5 root canal sealers. *J Endod.* 2013; 39(10): 1281-6.
106. Zielinsk TM, Baumgartner C, Marshall G. An evaluation of Guttaflow and gutta-percha in the filling of lateral grooves and depressions. *J Endod.* 2008; 34(3): 295-8.
107. Zmener O, Lalis RM, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod.* 2012; 38(9): 1233-8.
108. Zoufan K, Jiang J, Komabayashi T, Wang Y, Safavi, KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(5): 657-61.

ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA Comprovante aprovado em reunião pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia

		UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" FACULDADE DE ODONTOLOGIA	
<u>CERTIFICADO</u>			
<p>Certificamos que a proposta intitulada <i>"REAÇÃO TECIDUAL PROVOCADA POR CIMENTOS ENDODÔNTICOS A BASE DE SILICONE E SILICATO DE CÁLCIO EM SUBCUTÂNEO DE RATOS: ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA"</i>, registrada com o nº 16/2016, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). Paulo Sérgio Cerri – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA em reunião de 20/09/2016.</p>			
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica		
Vigência da autorização	Agosto/2018		
Espécie/linhagem/raça	Rato – Holtzmann		
Nº de animais	80		
Peso/Idade	220g /adultos jovens		
Sexo	Macho		
Origem	Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara		
 Profª Drª ELISA MARIA APARECIDA GIRO Vice-coordenadora da CEUA			
<small>Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA Rua Humaitá nº 1.680 – Centro – CEP 14801-903 – Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA – SP 5º andar – fone (16) 3301-6459 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: ceua@foar.unesp.br - home page: http://www.foar.unesp.br</small>			

de Araraquara, autorizando a realização da pesquisa.

Não autorizo a reprodução deste trabalho até
21 de março de 2020
(Direitos de publicação reservados ao autor)
Araraquara, 21 de março de 2018

Mateus Machado Delfino