



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



Rafaela Nanami Handa Inada

Avaliação da biocompatibilidade, potencial bioativo, alteração volumétrica e interface dentina/material de novos cimentos reparadores e obturadores biocerâmicos

Araraquara

2022



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



Rafaela Nanami Handa Inada

Avaliação da biocompatibilidade, potencial bioativo, alteração volumétrica e interface dentina/material de novos cimentos reparadores e obturadores biocerâmicos

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutora em Odontologia, na Área de Endodontia

Orientador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Araraquara

2022

I35a

Inada, Rafaela Nanami Handa

Avaliação da biocompatibilidade, potencial bioativo, alteração volumétrica e interface dentina/material de novos cimentos reparadores e obturadores biocerâmicos / Rafaela Nanami Handa Inada. -- Araraquara, 2022

108 f. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Mário Tanomaru-Filho

Coorientador: Paulo Sérgio Cerri

1. Materiais Biocompatíveis. 2. Ratos. 3. Microtomografia por Raio-X. 4. Endodontia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Rafaela Nanami Handa Inada

Avaliação da biocompatibilidade, potencial bioativo, alteração volumétrica e interface dentina/material de novos cimentos reparadores e obturadores biocerâmicos

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau em Doutora em Odontologia

Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

Prof^a. Dr^a. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva

Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte

Araraquara, 22 de março de 2022

DADOS CURRICULARES

Rafaela Nanami Handa Inada

- Nascimento:** 20 de novembro de 1991 - Araraquara – SP
- Filiação:** Renato Hideo Inada
Tereza keiko Handa Inada
- 2011-2016** Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
- 2014** Curso de Extensão “Estética do Sorriso” pela Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas- regional de Araraquara- APCD
- 2015** Curso de Extensão em Cirurgia Oral Menor pela Associação Brasileira de Odontologia- regional de Araraquara- ABO
- 2016-2018** Especialização em Endodontia pela Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia – FAEPO
- 2016-2018** Mestrado em Odontologia, área de Endodontia, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
- 2018-2022** Doutorado em Odontologia, área de Endodontia, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico à realização desse trabalho,

Aos meus pais, Renato e Tereza, meu alicerce que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando em todas as minhas decisões e respeitando minhas vontades. Obrigada por todo amor e carinho que me proporcionaram, e por todos o esforço que fizeram para dar a melhor educação a mim e meu irmão. Dedico a eles a realização deste trabalho como forma de agradecimento pois, eles sempre me incentivaram a buscar o conhecimento e a superar minhas dificuldades. Todas as minhas conquistas, realizações e superações eu devo a eles. Não existem palavras ou gestos que demonstrem a minha gratidão, amor e admiração que tenho por eles.

Ao meu irmão, Renato, que me incentivou a alcançar meus objetivos e superar minhas dificuldades todo esse processo de aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**. É Ele que me guia, me dá saúde e paz e me fortalece a cada dia para superar todos os obstáculos e a seguir em frente.

Aos meus pais, **Renato e Tereza**, que estiveram ao meu lado me dando todo apoio nessa etapa de aprendizado. Agradeço eternamente todo amor, incentivo, carinho que me proporcionaram! Tenho muito orgulho de ser filha de vocês e sempre os amarei. Tentarei ao máximo dar o melhor de mim sempre.

Ao meu irmão **Renato** que sempre esteve ao meu lado me apoiando em minhas decisões e me incentivando.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho**, que me deu um voto de confiança e me acolheu como orientanda, desde o mestrado até o doutorado. Obrigada pelos conhecimentos ensinados, experiências e oportunidades. Agradeço por toda a paciência e compreensão durante todos esses anos, sempre me incentivando a buscar o meu melhor. Foram anos de muito aprendizado que com toda certeza levarei para o resto de minha vida. Obrigada por me ajudar a seguir esse caminho e acreditar no meu potencial. Foi uma grande honra ter sido sua orientada e fazer parte desta equipe.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, que me recebeu de braços abertos em seu departamento e me auxiliou nessa nova jornada, que foi o doutorado. Enriqueceu muito o projeto e toda a colaboração que foi proporcionada foi de grande valia. Sua co-orientação a foi essencial para realização deste projeto, por isso agradeço por todo conhecimento e paciência durante esses anos.

A professora **Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, que foi essencial para realização deste doutorado. Obrigada por toda a disponibilidade, dedicação, ajuda e conhecimento durante esses anos, foram de extrema importância.

Aos professores **Guilherme Ferreira da Silva, Morgana Rodrigues Guimarães Stabili e Marco Antônio Húngaro Duarte**, por aceitarem fazer parte da banca de qualificação e/ou defesa. A contribuição de cada um será de grande valia e tenho a certeza que todas as considerações serão de um enriquecimento enorme para este projeto.

Aos professores do departamento de endodontia: **Fábio Berbert, Idomeo Bonetti Filho, Renato Leonardo e Gisele Faria** e do departamento de histologia: **Estela Sasso Cerri** por todo o conhecimento compartilhado desde a graduação até a pós-graduação.

Aos meus amigos de turma: **Victor, Jäder, Cristiane, Hernán, Livía, Jéssica, Matheus, Fernanda, Giselle e Evelin** que estiveram desde o início desta jornada comigo,

participando de clínicas, seminários e congressos. Agradeço por todos esses momentos juntos, de aprendizado, companheirismo e amizade. Obrigada por sempre estarem disposto a ajudar e compartilhar todos esses anos juntos.

As minhas amigas **Camila** e **Marcela**, que foram essências durante esses anos. Cada uma delas me ajudaram de maneira diferentes e especiais em cada etapa dessa jornada. Agradeço ambas por toda a ajuda, amizade e companheirismo. Em especial a **Marcela**, que esteve comigo em todo processo prático para realização desta pesquisa, me auxiliando e dando apoio.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP** representada pelo diretor **Prof. Dr. Edson Alves de Campos** e vice-diretora **Profa. Dra. Patricia Pertomilli Nordi Sasso Garcia**

A todos os funcionários da faculdade por serem sempre tão prestativos, em especial aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora, **Vanderlei**, por nos permitir trabalhar em um ambiente limpo e organizado e a **Creuza Hortênci**, por todo trabalho prestado ao nosso departamento, Agradeço também os funcionários da pós-graduação **José Alexandre Garcia** e **Cristiano Afonso Lamounier** por toda paciência e dedicação e ajuda durante todos esse anos e às funcionárias da biblioteca da FOAr, em especial à **Ana Cristina Jorge** por toda colaboração e disponibilidade.

Ao técnico do laboratório de Histologia: **Pedro Simões**, pela ajuda no laboratório na realização de várias etapas essenciais deste Doutorado. Obrigada por todo conhecimento compartilhado.

A todos os meus colegas de departamento da Endodontia e da Histologia, que fizeram parte dessa jornada, na qual compartilhamos risadas, conhecimentos e dúvidas, meus sinceros obrigada.

A todos os amigos de infância e de faculdade, em especial **Audrey, Marina, Inara, Najla, Rafael, Gabriela, Maurício, Laís, Débora, Giovana**, que sempre estiveram ao meu lado, ouvindo todas as minhas angústias, rindo ao meu lado, dando força quando eu precisei e comemorando minhas vitórias, agradeço a vocês meus queridos amigos, todo esse apoio.

Aos meus familiares que também sempre estiveram torcendo para meu sucesso e desejando as melhores coisas para mim. Obrigada por estarem comigo.

Um agradecimento especial à **CAPES**, o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Muito obrigada a todos!

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção”.

Paulo Freire*

* Freire P. Pedagogia da autonomia: saberes necessários à prática educativa. Brasil: Paz e Terra; 1997.

Inada RNH. Avaliação da biocompatibilidade, potencial bioativo, alteração volumétrica e interface dentina/material de novos cimentos reparadores e obturadores biocerâmicos [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Materiais biocerâmicos são desenvolvidos para utilização como cimentos reparadores e para obturação de canais radiculares. **Publicação 1:** Avaliação da biocompatibilidade, potencial bioativo, porosidade e interface dentina/material dos cimentos: Bio-C Sealer (BIOC), Sealer Plus BC (SP), TotalFill BC Sealer (TF) em comparação com AH Plus (AHP). A resposta tecidual no subcutâneo de ratos foi avaliada por meio da implantação de tubos de dentina humana com cimentos e tubos vazios (grupo controle-GC) por 7, 15, 30 e 60 dias. Cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para análise de espessura de cápsula e densidade numérica de células inflamatórias/mm²(CIs). Interleucina-6 (IL-6) e osteocalcina (OCN) também foram avaliadas. von Kossa foi realizado para identificação de depósitos de cálcio. Porosidade e interface dentina/material foram analisados por meio de microtomografia computadorizada (Micro-CT). Os dados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey, com significância de 5%. Em todos os grupos, a espessura de cápsula diminuiu com o decorrer do tempo. AHP exibiu mais CIs e células IL-6-imunopositivas comparado com outros cimentos ($P < 0,05$). Aos 7 dias, o BIOC mostrou mais CIs e células IL-6-imunopositivas em comparação com SP e TF ($P < 0,05$). Aos 15 e 30 dias, nenhuma diferença significativa para CIs e células IL-6-imunopositivas foram detectadas entre SP e TF ($P > 0,05$). BIOC, SP, TF e GC não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) após 60 dias. Estruturas von Kossa-positivas e birrefringentes foram observadas ao redor de todos os materiais. BIOC, SP e TF exibiram células OCN- imunopositivas em todos os períodos. BIOC apresentou maior porosidade que SP e TF ($P < 0,05$). BIOC, SP, TF e AHP apresentaram similar porcentagem de espaços vazios na interface ($P > 0,05$). Conclui-se que BIOC, SP, TF são biocompatíveis e apresentam bioatividade, e vazios de interface similar ao AHP. **Publicação 2:** Avaliação da biocompatibilidade, potencial bioativo, porosidade e interface dentina/material de materiais biocerâmicos reparadores: Bio-C Repair (BIOC-R) e MTA repair HP (MTAHP) em comparação ao cimento à base de óxido de zinco e eugenol (IRM). A avaliação da biocompatibilidade e potencial bioativo foram realizadas por meio da implantação de tubos de dentina preenchidos com os materiais e tubos vazios como grupo controle (GC). Após 7, 15, 30 e 60 dias, os tubos e tecidos adjacentes foram removidos para mensuração da capsula, contagem das células inflamatórias/mm²(CIs), detecção das células IL-6 e OCN imunopositivas e von Kossa para identificação de depósitos de cálcio. Análise de micro-CT foi realizada para avaliação da porosidade e interface. Os dados foram submetidos aos testes ANOVA e Tukey, com significância de 5%. As cápsulas de IRM apresentaram maior espessura, CIs e células IL-6- imunopositivas, aos 7 e 15 dias ($P < 0,05$). As cápsulas de BIOC-R exibiram maior espessura e CIs do que MTAHP em 7 dias ($P < 0,05$) e mais células IL-6 -imunopositivas em 7 e 15 dias ($P < 0,05$). Aos 30 e 60 dias, não foram observadas diferenças significativas no número de CIs, espessura da cápsula e número de células IL-6- imunopositivas entre os grupos ($P > 0,05$). Células OCN-imunopositivas, von Kossa positivo e estruturas birrefringentes foram observadas apenas em BIOC-R e MTAHP. BIOC-R e IRM apresentaram baixa porosidade e vazios ($P > 0,05$). O MTAHP apresentou maior porosidade e vazios na interface ($P < 0,05$). Conclui-se que BIOC-R, MTAHP e IRM são materiais biocompatíveis, porém apenas BIOC-R e MTAHP possuem potencial bioativo. MTAHP apresentou maior porosidade e presença de vazios na interface.

Palavras chave: Materiais Biocompatíveis. Ratos. Microtomografia por Raio-X. Endodontia.

Inada RNH. Evaluation of biocompatibility, bioactive potential, volumetric change, and dentine/material interface of new bioceramics root repair material and sealer [tese de doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Bioceramic materials are developed for use as root repair material and root canal fillings. **Publication 1:** Evaluation of biocompatibility, bioactive potential, porosity and dentin/material interface of cements: Bio-C Sealer (BIOC), Sealer Plus BC (SP), TotalFill BC Sealer (TF) compared to AH Plus (AHP). The subcutaneous tissue response of rats was evaluated by implanting human dentin tubes with cements and empty tubes (control group-GC) for 7, 15, 30 and 60 days. Histological sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) for analysis of capsule thickness and numerical density of inflammatory cells/mm² (ICs). Interleukin-6 (IL-6) and osteocalcin (OCN) were also evaluated. von Kossa was performed to identify calcium deposits. Porosity and dentin/material interface were analyzed using micro computed tomography (micro-CT). Data were submitted to ANOVA and Tukey tests, with a significance of 5%. In all groups, capsule thickness decreased over time. AHP exhibited more ICs and IL-6-immunopositive cells compared to other cements ($P < 0.05$). At 7 days, BIOC showed more ICs and IL-6-immunopositive cells compared to SP and TF ($P < 0.05$). At 15 and 30 days, no significant differences for ICs and IL-6-immunopositive cells were detected between SP and TF ($P > 0.05$). BIOC, SP, TF and GC showed no significant differences ($P > 0.05$) after 60 days. von Kossa-positive and birefringent structures were observed around all materials. BIOC, SP and TF exhibited OCN-immunopositive cells in all periods. BIOC showed higher porosity than SP and TF ($P < 0.05$). BIOC, SP, TF and AHP showed similar percentage of voids at the interface ($P > 0.05$). It is concluded that BIOC, SP and TF are biocompatible and present bioactivity, and interface voids similar to AHP. **Publication 2:** Assessment of biocompatibility, bioactive potential, porosity and dentin/material interface of repairing bioceramic materials: Bio-C Repair (BIOC-R) and MTA repair HP (MTAHP) compared to zinc oxide-eugenol-based cement (IRM). The evaluation of biocompatibility and bioactivity were performed by implanting dentin tubes filled with the materials and empty tubes as a control group (GC). After 7, 15, 30 and 60 days, the tubes and adjacent tissues were removed to measure the capsule, count inflammatory cells/mm² (ICs), detect immunopositive IL-6 and OCN cells, and von Kossa to identify calcium deposits. Micro-CT analysis was performed to evaluate porosity and interface. Data were submitted to ANOVA and Tukey tests, with a significance of 5%. The IRM capsules showed greater thickness, ICs and IL-6-immunopositive cells at 7 and 15 days ($P < 0.05$). BIOC-R capsules exhibited greater thickness and ICs than MTAHP at 7 days ($P < 0.05$) and more IL-6-immunopositive cells at 7 and 15 days ($P < 0.05$). At 30 and 60 days, no significant differences were observed in the number of ICs, capsule thickness and number of IL-6-immunopositive cells between groups ($P > 0.05$). OCN-immunopositive, von Kossa positive cells and birefringent structures were observed only in BIOC-R and MTAHP. BIOC-R and IRM showed low porosity and voids ($P > 0.05$). MTAHP showed higher porosity and voids at the interface ($P < 0.05$). It is concluded that BIOC-R, MTAHP and IRM are biocompatible materials. However, just BIOC-R and MTAHP have bioactive potential. MTAHP showed higher porosity and presence of voids at the interface.

Keywords: Biocompatible Materials. Rats. X-Ray Microtomography. Endodontics

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 PUBLICAÇÕES	20
3.1 Publicação 1.....	20
3.2 Publicação 2.....	52
4 DISCUSSÃO.....	71
5 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE A- METODOLOGIA EXPANDIDA.....	88
APÊNDICE B- SUBMISSÃO DOS ARTIGOS.....	104
ANEXO A-CEUA.....	106
ANEXO B-CEP.....	107

1 INTRODUÇÃO

Cerâmicas são materiais inorgânicos e não metálicos obtido pelo aquecimento de minerais brutos em altas temperaturas¹. Biocerâmicos são materiais cerâmicos biocompatíveis de combinações entre silicato de cálcio e o fosfato de cálcio, podendo incluir ainda partículas de alumina, zircônia e vidros bioativos^{2,3}. O tipo de biocerâmico utilizado e sua interação com o tecido hospedeiro, permite a sua classificação como “bioinerte”, ou seja que não promove interação com o ambiente biológico, como por exemplo os componentes alumina e zircônia; ou “bioativo” que pode sofrer interações interfaciais com o tecido circundante, tais como vidros bioativos, cerâmica de vidro bioativo, hidroxiapatita e silicatos de cálcio. Além disso, as cerâmicas bioativas podem ser reabsorvíveis ou não reabsorvíveis, que eventualmente são substituídos ou incorporados ao tecido como o fosfato tricálcico e vidros bioativos^{2,4}.

Atualmente, os biocerâmicos apresentam ampla aplicabilidade tanto na área médica quanto odontológica. Podendo ser utilizados para usos cirúrgicos, como substituições de articulações ou tecidos⁴, reparo de defeitos ósseos, aumento do rebordo alveolar, obliteração do seio nasal e correção de fratura do assoalho orbital⁵. Também são indicados para uso protético como implantes, próteses e revestimentos para melhorar a biocompatibilidade desses implantes metálicos^{5,6} e para uso restaurador como materiais substituto da dentina, capeamento pulpar, hipersensibilidade e remineralização dentinária^{5,7}.

Na endodontia, os biocerâmicos foram introduzidos na década de 1990, primeiro como materiais para obturação retrógrada e para reparo de perfurações radiculares, e depois como cimentos obturadores^{8,9}. O fato dos biocerâmicos serem bioativos¹⁰, biocompatíveis, e quimicamente estáveis dentro do ambiente biológico¹¹, ampliaram a sua utilização clínica. Bioatividade do material está relacionando quando este material promove a formação de hidroxiapatita semelhante a osso após ser imersa em fluidos corporais¹².

A mineralização dos tecidos inclui diversos eventos celulares, expressões e a interação de várias moléculas. A avaliação da formação de tecidos mineralizados pode ser realizada por técnicas de imuno-histoquímica, e detecção de proteínas como a osteocalcina, encontrada na matriz óssea e secretada por osteoblastos, com papel importante no processo de mineralização^{13,14}. O método von Kossa também é utilizado para avaliar a formação de tecido calcificado, baseando-se na avaliação da precipitação de cálcio¹⁵.

A biocompatibilidade de um material é relacionada com a capacidade de provocar uma resposta biológica apropriada em uma determinada aplicação¹⁶. Um material biocompatível apresenta redução da resposta inflamatória com o decorrer do tempo¹⁷. Durante a resposta

inflamatória, as células inflamatórias sintetizam e liberam diversos mediadores químicos moduladores da inflamação, como a interleucina-6 (IL-6), produzida em resposta à estímulos como agressões e infecções por células como fibroblastos, macrófagos e neutrófilos^{18,19}. Pode estar relacionada com a inflamação da polpa dentária, visto que ela atua como mediadora da resposta do hospedeiro^{20,21}.

Na fase de reparação do tecido conjuntivo ocorre redução de células inflamatórias e imunopositivas à IL-6, acompanhado pela presença de diversos fibroblastos entre feixes de fibras colágenas, o que evidencia o processo de reparação do tecido^{22,23}. Desta forma, cimentos reparadores e obturadores dos canais radiculares devem ser biocompatíveis e, se possível, bioativos uma vez que estão em contato com os tecidos perirradiculares e podem influenciar no reparo e neoformação óssea²⁴.

Estudos, in vivo, principalmente em tecido subcutâneo de ratos são recomendados pela ISO para avaliação da resposta biológica provocada pelos diferentes materiais^{15,24-31}. Diversos estudos utilizam implante de tubos de polietileno por serem um material inerte^{24,27-30}. Considerando-se que cimentos biocerâmicos, principalmente os prontos para uso, são de natureza hidrofílica e necessitam de umidade proveniente da dentina para reação de presa³², tubos de dentina humana possibilitam maior proximidade com a situação clínica^{10,33-35}, assim como avaliação das interações da interface parede dentinária/material^{34,35}.

Mineral Trioxide Aggregate (MTA), foi o primeiro material de silicato de cálcio na endodontia, desenvolvido pela Universidade de Loma Linda (Califórnia, EUA) no ano de 1993³⁶. O MTA é um cimento reparador amplamente utilizado na área endodôntica, para capeamento pulpar, pulpotomia, selamento de perfuração radicular, apicificação e obturação retrógrada³⁷, devido a sua capacidade seladora, biocompatibilidade e capacidade de induzir a deposição de tecido mineralizado^{19,38-42}. Essa capacidade de indução de tecido duro, está relacionado na formação de hidroxiapatita⁴³⁻⁴⁷, e é de extrema importância para os materiais reparadores no processo de reparo e neoformação óssea^{10,48}.

Entretanto, há algumas desvantagens como dificuldade de manuseio, devido sua consistência⁷ longo tempo de presa⁴⁹ e escurecimento dentário⁵⁰⁻⁵². Diversos cimentos endodônticos à base de silicato de tricálcico, principal componente bioativo do MTA foram desenvolvidos, com intuito de superar as desvantagens do MTA. Associado à diferentes tipos de radiopacificadores, como óxido de zircônio (ZrO_2), óxido de nióbio (Nb_2O_5) e tungstato de cálcio (Ca_2WO_4), esses cimentos demonstram possuir biocompatibilidade⁵³, citocompatibilidade^{54,55}, radiopacidade adequada⁵⁶, bioatividade semelhante ao MTA, menor tempo de presa, baixa solubilidade e liberação de íons de cálcio⁵⁷.

O BIO-C Repair, é um cimento biocerâmico reparador desenvolvido pela Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos S/A (Londrina, Brasil), que possui excelente capacidade de preenchimento, baixa alteração volumétrica⁵⁸, adequada radiopacidade, pH alcalino e não promove escurecimento dentário⁵⁹. Indicado para os tratamentos de perfuração de raiz ou furca via canal ou cirúrgica, reabsorção interna via canal ou cirúrgica, reabsorção externa, retrobturação em cirurgia parendodôntica, capeamento pulpar direto ou indireto, apicificação, apicigênese, pulpotomia e regeneração pulpar. É um cimento reparador pronto para uso, pronto para uso, composto por silicato tricálcico, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente de dispersão.

Benetti et al.⁶⁰ avaliaram *in vitro* a citotoxicidade e em subcutâneos de ratos, a biocompatibilidade e mineralização do Bio-C Repair (Angelus) comparado ao MTA repair HP (Angelus) e MTA branco (Angelus), através de tubos de polietileno contendo os materiais ou vazios (controle) removidos do tecido subcutâneo de ratos após 7 e 30 dias. Os autores observaram que aos 7 e 30 dias, os grupos apresentaram inflamação moderada e leve, respectivamente. Além disso, todos os materiais mostraram estruturas positivas para von Kossa e luz polarizada. Concluindo que, o Bio-C Repair teve citocompatibilidade semelhante aos materiais à base de MTA, foi biocompatível e induziu à mineralização.

Ghilotti et al.⁶¹ compararam a composição química, a morfologia ultraestrutural, bem como seus efeitos biológicos nas células da polpa dental humana do Biodentine (Septodont) ProRoot MTA (Dentsply) e Bio-C Repair, através de um estudo *in vitro*. Os autores observaram que o Bio-C Repair evidenciou uma baixa concentração de cálcio e a maior concentração de zircônio. Demonstrou também uma adesão adequada das células da polpa dental humana (hDPCS) aos materiais. Concluíram que o Bio-C Repair demonstrou excelente citocompatibilidade, semelhante ao Biodentine e ProRoot MTA.

Lopéz-Garcia et al.⁶² realizaram um estudo *in vitro* para avaliar algumas propriedades biológicas do Bio-C Repair e Bio-C Sealer (Angelus). Foram avaliados os efeitos desses materiais em diversas diluições nas células-tronco do ligamento periodontal, além do perfil de liberação iônica e pH. Como resultados foram observados um pH semelhante nestes cimentos. Bio-C Sealer liberou significativamente mais íons Cálcio e Silício em comparação com Bio-C Repair. O Bio-C Sealer não diluído induziu uma redução significativa na viabilidade celular, sobrevivência celular e migração celular quando comparado ao controle. Os autores concluíram que o Bio-C Repair apresentou maior viabilidade celular, taxas de migração, maior adesão e proliferação de células em comparação ao Bio-C Sealer.

Klein-Junior et al.⁶³, avaliaram os efeitos citotóxicos, *in vitro*, do Biodentine, MTA Repair HP, Bio-C Repair e Bio-C Repair Íon+. Como resultados foram observados que todos os materiais demonstraram redução na viabilidade celular. Bio-C Repair Íon+ apresentou citotoxicidade leve e moderada nas análises de 24 horas e 7 dias, respectivamente. Bio-C Repair e Biodentine apresentaram citotoxicidade leve, e MTA Repair HP exibiu citotoxicidade moderada em ambos os intervalos. Concluindo que a Biodentine, MTA e Repair HP apresentaram em ordem crescente a maior viabilidade celular. Bio-C Repair e Bio-C Repair Íon+ apresentaram citotoxicidade moderada, semelhante ao MTA Repair HP na análise de 7 dias.

Outro cimento reparador biocerâmico da Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos S/A (Londrina, Brasil) é o MTA repair HP, que é a base de silicato tricálcico e contém tungstato de cálcio na composição. Segundo o fabricante o MTA Repair HP é um material reparador de alta plasticidade, com indicações comuns ao MTA. A diferença entre o MTA Angelus (Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brasil) e o MTA Repair HP é a substituição da água destilada por líquido contendo água e plastificante orgânico, facilitando o manuseio e inserção do material e o tungstato de cálcio como agente radiopacificador. Cintra et al.⁶⁴ utilizaram tubos de polietileno em subcutâneo de ratos e demonstraram que o MTA Repair HP é biocompatível e possui uma capacidade de mineralização similar ao MTA Angelus, além de uma maior viabilidade das células de fibroblastos em comparação com o MTA branco após um período mais longo. Além de promover uma resposta biológica adequada em células da polpa dentária humana (hDPSCs) em termos de proliferação celular, morfologia, migração e ligação^{65,66}.

Ferreira et al.⁶⁷ também avaliaram a biocompatibilidade utilizando tubos de polietileno em subcutâneo de ratos. Além da citotoxicidade, tempo de presa, fluidez, radiopacidade e solubilidade em água do MTA repair HP e o MTA branco (Angelus). Os autores observaram que não houve diferença no tempo de presa, radiopacidade, solubilidade entre os cimentos. O MTA repair HP mostrou ser biocompatível, com propriedades físico-químicas e biológicas adequadas e com melhor fluidez quando comparado ao MTA.

Delfino et al.²⁷ avaliaram a resposta tecidual por meio de tubos de polietileno implantados no subcutâneo de ratos promovida pelo Bio-C Pulpo (Angelus), MTA Repair HP e MTA branco (Angelus) e também avaliaram as alterações hepáticas que tais materiais poderiam causar. Concluindo que Bio-C Pulpo, MTA repair HP e MTA branco não causaram alterações morfológicas no fígado e nenhuma alteração significativa nos níveis séricos de TGO

e TGP, que são enzimas que refletem o status de funcionamento do fígado. Além disso, demonstraram ser materiais biocompatíveis e com potencial bioativo.

Queiroz et al.⁵⁵ avaliaram *in vitro* a citotoxicidade, bioatividade, atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* e testes físico-químicos de tempo de presa, radiopacidade, pH e solubilidade comparando materiais experimentais à base de silicato tricálcico (TCS), associados a radiopacificadores óxido de zircônio (ZrO_2), tungstato de cálcio ($CaWO_4$) ou óxido de nióbio (Nb_2O_5), com o MTA Repair HP. Os autores observaram que MTA repair HP apresentou menor tempo de presa comparados com os outros materiais e radiopacidade acima de 3 mmAl. Além disso, observaram que todos os cimentos apresentaram pH alcalino, baixa solubilidade, nenhum efeito citotóxico, bioatividade e atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*.

O material de restauração intermediária (IRM) (Dentsply, Delaware, Estados Unidos) é um material restaurador apresentado na forma de pó que consiste em óxido de zinco e poli metacrilato de metila e líquido com eugenol e ácido acético. Utilizado, antigamente, como material retrobturador na endodontia^{68,69} com o intuito de superar as desvantagens que o amálgama proporcionava como a dificuldade de manipulação e inserção⁷⁰, infiltração marginal^{69,71}, citotoxicidade^{72,73}, baixa biocompatibilidade⁷⁴⁻⁷⁶. Diversos estudos utilizam o IRM como comparativo com os novos materiais de silicato de cálcio⁷⁷⁻⁷⁹.

Já foi relatado na literatura taxas de sucesso clínico semelhante ao MTA^{80,81}, baixo grau de porosidade e espaços vazios⁷⁸, baixa alteração volumétrica^{82,83} e boa adaptação marginal⁸⁴. Entretanto há estudos na literatura que observaram que o eugenol e o zinco presentes na sua composição são os principais componentes citotóxicos^{85,86}. Além da baixa viabilidade³⁸ e fixação celular⁸⁷, citotoxicidade⁸⁸, há diversos estudos que observaram uma menor biocompatibilidade^{89,90}, deficiente adaptação marginal^{91,92} e baixo selamento apical comparado ao MTA^{93,94}.

Segundo Koch⁹⁵, na área de desenvolvimento de materiais em endodontia, o principal avanço é relacionado ao uso da tecnologia biocerâmica; na obturação endodôntica. A obturação tem como um dos seus objetivos, finalidade biológica, como a não interferência no reparo e se possível promover estimulação⁹⁶. Para ser considerado um cimento ideal são necessárias algumas características como: biocompatibilidade, selamento marginal, permitir ou induzir o processo de reparo e neoformação óssea, apresentar atividade antimicrobiana, ser de fácil manipulação e inserção, não ser solúvel nos fluidos corporais após o endurecimento, ser radiopaco, assim como ser de baixo custo⁹⁷⁻¹⁰⁰. Entretanto, não existe um cimento que tenha todas essas características.

Cimentos obturadores biocerâmicos apresentam algumas vantagens como uma biocompatibilidade e ação bactericida devido ao seu pH alcalino. Além disso, apresentam capacidade de formar hidroxiapatita, promovendo uma ligação entre a dentina e os materiais obturadores⁴. Atualmente, os cimentos biocerâmicos são também desenvolvidos na forma pré-misturada, diminuindo os riscos de uma mistura não homogênea¹⁰¹.

O Bio-C Sealer é um cimento obturador biocerâmico pronto para uso desenvolvido pela Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos S/A (Londrina, Brasil). Indicado para obturações de canais radiculares permanentes é composto por silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente de dispersão. Bio-C Sealer tem demonstrado adequada capacidade de preenchimento do canal radicular^{102,103}, tempo de presa adequado, capacidade de alcalinização, adequado escoamento e radiopacidade, além de baixa alteração volumétrica¹⁰⁴.

Silva et al.²⁹, avaliaram a biocompatibilidade e o potencial bioativo de cimentos Bio-C Sealer e Sealer Plus BC (MK Life) em comparação com AH Plus (Dentsply), após a implantação de tubos de polietileno contendo os materiais no tecido subcutâneo de ratos durante os períodos de 7,15,30 dias e concluíram que Bio-C Sealer e Sealer Plus BC são biocompatíveis e apresentam potencial bioativo. Okamura et al.¹⁰⁵ também estudaram a biocompatibilidade do Bio-C Sealer em raízes de dentes de cães e concluíram ser um material biocompatível e seguro para uso em contato próximo com o tecido periapical.

López-García et al.¹⁰⁶ avaliaram *in vitro* a citotoxicidade e potencial de mineralização do Bio-C Sealer e TotalFill BC Sealer (FKG Dentine) em comparação com o AH Plus e concluíram que Bio-C Sealer e TotalFill BC Sealer demonstraram melhor citocompatibilidade, migração, morfologia celular, fixação celular e capacidade de mineralização do que AH Plus. Além dessas propriedades, o potencial antibacteriano do Bio-C Sealer contra bactérias comuns em infecções endodônticas primárias e secundárias também foi avaliada, demonstrando o material possuir atividade antibacteriana¹⁰⁷.

Sealer Plus BC também é o cimento obturador biocerâmico, pronto para uso, lançado pela indústria MK Life dental and medical products (Porto Alegre, Brasil). Segundo o fabricante, o Sealer Plus BC é um cimento insolúvel, radiopaco, sem alumínio, com óxido de zircônio; silicato tricálcio; silicato dicálcio; hidróxido de cálcio e propilenoglicol em sua composição. O cimento demonstra ser biocompatível e bioativo em subcutâneo de ratos^{29,108}, de baixa citotoxicidade¹⁰⁸, baixo tempo de presa, pH alcalino, adequada radiopacidade, fluidez e liberação de cálcio¹⁰⁹, porém com alta solubilidade^{109,110}. Benetti et al.¹⁰⁸ avaliaram a biocompatibilidade com tubos de polietileno em subcutâneo de ratos e citotoxicidade *in vitro*

do Sealer Plus BC em comparação com MTA Fillapex (Angelus) e AH Plus e constataram que Sealer Plus BC é biocompatível quando comparado ao MTA Fillapex e AH Plus, e é menos citotóxico quando são utilizados extratos menos diluídos.

Outro cimento à base de silicato de cálcio, pronto para uso, é o TotalFill BC Sealer (FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça). Este material apresenta óxido de zircônia como agente radiopacificadores e tem demonstrado não ser citotóxico^{106,111,112}, possuir ação seladora¹¹³, ser antimicrobiano⁵⁴, pH alcalino¹¹⁴, ser hidrófilo, promover a difusão de hidróxido de cálcio¹¹⁵, possuir radiopacidade adequada¹⁰⁴ e biocompatível^{116,117}. Após a análise da interface dentina/material para avaliar o potencial de bioatividade foi observado a deposição de mineral^{118,119}.

Silva et al.²⁴, avaliaram a biocompatibilidade e o potencial bioativo do TotalFill BC Sealer, AH Plus e um cimento experimental base de silicato tricálcico, com a implantação de tubos de polietileno em subcutâneo de ratos, durante os períodos de 7,15,30 e 60 dias e concluíram que o TotalFill BC Sealer e o cimento experimental apresentaram potencial bioativo e biocompatibilidade. Santos et al.¹²⁰ também avaliaram a biocompatibilidade e bioatividade do TotalFill BC Sealer e TotalFill BC Sealer HiFlow através de implante subcutâneo em tecido conjuntivo de ratos e concluíram que o TotalFill BC Sealer e o TotalFill BC Sealer HiFlow são biocompatíveis e apresentam potencial bioatividade quando implantados no tecido subcutâneo.

O AH Plus (Dentsply, Konstanz, Alemanha) é um cimento endodôntico à base de resina epóxi considerado como “padrão ouro” para comparações com outros cimentos¹²¹, devido sua adequada propriedade seladora¹²², estabilidade dimensional¹²³, propriedade adesiva¹²⁴, radiopacidade^{125,126} e possuir atividade antibacteriana¹²⁷. No entanto, em relação a biocompatibilidade e citotoxicidade há controvérsias na literatura. Alguns estudos mostraram uma elevada toxicidade¹¹⁶ e reação inflamatória persistente^{128,129}, outros observaram uma não toxicidade ou baixa toxicidade^{130,131} e diminuição do infiltrado inflamatório¹³². Quando analisado sua interface dentina/material não foi observado nenhuma mudança¹³³. São necessários mais estudos para confirmação.

Além do material endodôntico necessitar de propriedades biológicas adequadas são necessárias propriedades físico-químicas para o sucesso a longo prazo do tratamento endodôntico¹³⁴. A microtomografia computadorizada (micro-CT) é uma ferramenta não destrutiva usada para avaliar propriedades de materiais^{83,110,135,136}. Torres et al.⁸² utilizando a micro-CT avaliaram a capacidade de preenchimento e alteração volumétrica dos cimentos MTA repair HP, Bio-C Repair e IRM, e concluíram que Bio-C Repair é um material com capacidade de preenchimento e baixa alteração volumétrica.

O micro-CT também pode ser usado para medir a porosidade dos materiais do canal radicular^{135,136} e avaliar a interface entre a parede dentinária e o material endodôntico de acordo com a porcentagem de lacunas e vazios no material obturador^{58,137} permitindo a avaliação de vazios entre a superfície da parede dentinária e o material^{137,138}. Vergarças et al.¹³⁹ avaliaram os defeitos marginais e vazios do MTA Branco, MTA Repair HP e Bio-C Repair, utilizando o micro-CT. Foi observado que não houve diferença estatística na porcentagem de defeitos marginais entre os materiais e o MTA branco apresentou menos vazios que o Bio-C e o MTA Repair HP.

Torres et al.¹³⁵ também utilizaram do micro-CT para avaliar a estabilidade volumétrica e morfológica, porosidade e vazios de interface do MTA branco (Angelus), Biodentine e IRM, após imersão em solução salina tamponada com fosfato (PBS), e observaram que MTA e IRM apresentaram estabilidade dimensional e volumétrica. Biodentine apresentou adaptabilidade adequada e menores valores de porosidade que o MTA, porém após a imersão em PBS houve redução dimensional deste material, além de aumento na porosidade e vazios de interface.

Torres et al.¹¹⁰, empregando micro-CT, avaliaram solubilidade, alteração volumétrica e presença de vazios dos cimentos TotalFill BC Sealer, Sealer Plus BC e Bio-C Sealer em comparação com o AH Plus sob o efeito da imersão em água destilada ou solução salina tamponada com fosfato (PBS) e observaram que TotalFill BC Sealer, Sealer Plus BC e Bio-C Sealer apresentaram solubilidade significativamente maiores do que AH Plus, e acima do recomendado pela ISO 6876¹⁴⁰. Porém, todos os cimentos avaliados apresentaram presença baixa alteração volumétrica e foram semelhantes em relação aos espaços vazios.

Sendo assim, diante do exposto, tornam-se oportuno, estudos que avaliem essas propriedades físico-químicas e biológicas, por metodologias que simulem condições clínicas como implante de tubos de dentina, e associação com métodos que empregam Micro-CT.

2 PROPOSIÇÕES

Este estudo possui um objetivo geral e específicos.

2.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo a avaliação das propriedades biológicas e físico-químicas de materiais endodônticos biocerâmicos através da implantação de tubos de dentina em subcutâneo de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

Esse estudo está dividido em duas publicações:

Publicação 1: Avaliar a capacidade dos cimentos obturadores biocerâmicos Bio-C Sealer, Sealer Plus BC e TotalFill BC em comparação com cimento à base de resina epóxi, AH Plus, em causar danos biológicos, induzir a formação de tecido duro, por meio de análises de densidade numérica de células inflamatórias, espessura das cápsulas adjacentes aos implantes, reação imuno-histoquímica para detecção de interleucina-6, reação imuno-histoquímica para detecção de osteocalcina, reação e análise de von Kossa e análise sob luz polarizada e analisar a porosidade e interface dentina/material utilizando o micro-CT;

Publicação 2: Avaliação da biocompatibilidade, potencial bioativo, porosidade e interface dentina/material de cimentos reparadores biocerâmicos, Bio-C Repair, MTA repair HP em comparação com cimento de óxido de zinco e eugenol, IRM, através análises de densidade numérica de células inflamatórias, espessura das cápsulas adjacentes aos implantes, reação imuno-histoquímica para detecção da interleucina-6 e osteocalcina, reação e análise de von Kossa e análise sob luz polarizada, além de porosidade e interface dentina/material por meio de micro-CT.

3 PUBLICAÇÕES

Este trabalho foi dividido em dois artigos.

3.1 Publicação 1*

Evaluation of biocompatibility, bioactivity, porosity, and interface of bioceramic ready-to-use sealers using a dentin-tube model

Abstract

Aim This study evaluated biocompatibility, bioactivity, porosity, and interface of the bioceramic ready-to-use sealers Bio-C Sealer (BIOC), Sealer Plus BC (SP), TotalFill BC Sealer (TF) compared to AH Plus (AHP), using a dentin-tube model in subcutaneous tissue of rats.

Methodology Dentin tubes filled with sealer and empty tubes (control group, GC) were implanted in the subcutaneous connective tissue of rats ($n = 6/\text{group}$ in each period). After 7, 15, 30, and 60 days, the tubes with connective tissue were removed. The number of inflammatory cells (ICs), capsule thickness, calcium deposits (von Kossa), and immunostained cells for interleukin-6 (IL-6) and osteocalcin (OCN) were evaluated. In addition, porosity and interface dentin-material were assessed by micro-computed tomographic analysis. The data were submitted to ANOVA analysis of variance and Tukey's test ($p < 0.05$).

Results In all groups, the thickness of capsules decreased over time. In all periods, AHP exhibited a greater number of ICs and IL-6 immunopositive cells than bioceramic sealers ($p < 0.05$). At 7 days, BIOC showed higher values of ICs and IL-6-immunolabelled cells in comparison with SP and TF ($p < 0.05$). At 15 and 30 days, no significant difference in the number of ICs and immunoexpression of IL-6 cells was detected between SP and TF ($p > 0.05$). BIOC, SP, TF, and GC had no significant difference ($p > 0.05$) in ICs and IL-6-immunolabelled cells after 60 days. Von Kossa-positive and birefringent structures were observed in the capsules around the materials. However, only BIOC, SP, and TF exhibited OCN-immunolabelled cells in all periods. AHP and GC did not display OCN-immunolabelled cells in the capsules. BIOC showed higher porosity than SP and TF ($p < 0.05$). BIOC, SP, TF, and AHP had no difference in the percentage of voids ($p > 0.05$).

Conclusion Bio-C Sealer, Sealer Plus BC and TotalFill BC sealers are biocompatible and suggest bioactive potential. Bioceramic sealers showed similar percentage of voids than AH Plus.

Keywords: Biocompatibility, bioactivity, calcium silicate, root canal filling material, physicochemical properties, X-ray microtomography.

* Artigo nas normas do periódico *International Endodontic Journal* para o qual foi submetido.

Introduction

Bioceramics are biocompatible materials that associate calcium silicate and calcium phosphate and may include alumina, zirconia, and bioactive glass particles (Shenoy & Shenoy, 2010). The use of bioceramics endodontic sealers has been increased due to their proper physicochemical and biological properties (Silva et al., 2017).

Root canal sealers should be biocompatible and bioactive, as they maintain contact to periradicular tissues (Silva et al., 2021). Furthermore, appropriate physical and chemical properties are required for the long-term success of endodontic treatment (Celikten et al., 2019). Micro-computed tomography (Micro-CT) is a highly accurate, nondestructive tool that has been used to assess physicochemical properties (Torres et al., 2020, Torres et al., 2021). Micro-CT can be used to measure the porosity in the root canal endodontic sealers (Torres et al., 2018, Torres et al., 2019) and evaluate the interface between the dentin wall and endodontic sealer according to the percentage of gaps and voids in the filling material (Gandolfi et al., 2013; Torres et al., 2021) allowing the evaluation of gaps between the surface of the dentin wall and the endodontic sealer (Gandolfi et al., 2013; Huang et al., 2018).

Biocompatibility is "the ability of a material to elicit an appropriate biological response in a given application," implying an interaction among a host, a material, and an expected function of the material (Wataha, 2001). A bioactive material is a material on which bone-like hydroxyapatite will form selectively after it is immersed in simulated body fluids (Bohner & Lemaire, 2009). Ready-to-use calcium silicate-based endodontic sealers, such as Bio-C sealer (BIOC; Angelus, Londrina, PR, Brazil), Sealer Plus BC (SP; MK Life, Porto Alegre, Brazil), and TotalFill BC Sealer (FKG Dentine AS, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) have been demonstrated biological properties, such as biocompatibility, bioactivity, and cytocompatibility (López-García et al., 2019; Silva et al., 2020, Silva et al., 2021; Zordan-Bronzel et al., 2019b) and proper physicochemical properties (Torres et al., 2020; Zordan-Bronzel et al., 2019a).

However, they show solubility according to ISO tests (Tanomaru-Filho et al., 2017; Torres et al., 2019; Zordan-Bronzel et al., 2019a). On the other hand, bioceramic sealers demonstrate volumetric stability in theses using micro- CT (Campi, 2020).

Polyethylene tubes in subcutaneous rats is used to evaluate the biocompatibility and bioactivity of bioceramics materials (Fonseca et al., 2016; Silva et al., 2020, Silva et al., 2021). However, many complex interactions between the biological environment and the material occur (Wataha, 2001). Considering that ready-to-use bioceramic cements depend on reactions that occur from moisture and interaction with dentin, dentin tubes may be more appropriate to assess these properties, and previously have been used with others materials (Bósio et al., 2014; Dreger et al., 2012; Holland et al., 1999) allowing the interactions of the dentin and endodontic sealer (Dreger et al., 2012; Holland et al., 1999) Dentin tubes may allow the formation of an interfacial layer with tag-like structures at the cement-dentin interface (Reyes-Carmona et al., 2009). There is no data evaluating the biocompatibility and bioactivity of these ready-to-use bioceramics on subcutaneous of rats, using dentin tubes.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the biocompatibility, bioactive potential, porosity, and interface dentin-material of three ready-to-use bioceramic sealers compared with AH Plus using the dentin tube implant model with the materials in the subcutaneous tissue of rats. The null hypothesis is that the materials have similar biological and physicochemical properties.

Material and methods

Biological properties analysis

This study used single root human teeth to produce one hundred and twenty dentin tubes with approximately 5 mm in length, cross-sectioned with a precision cutting machine ISOMET (Buehler, Lake Bluff, New York, USA), 1.3 mm internal diameter, prepared with Gates Glidden

number 5# and 1.5 mm wall thickness. The dentine tubes were submitted to the cleaning protocol to remove the "smear layer," with irrigation of 17% EDTA, sodium hypochlorite 1%, and distilled water, and then autoclaved, then the dentin tubes were filled with the endodontic sealers (Table 1).

The Animal Experimentation Ethics Committee approved this protocol in the University (#04/2019). Thirty-two adult male Holtzman rats (*Rattus norvegicus albinus*) were used, weighing between 270-300 g, and maintained under a 12:12 light-dark cycle at controlled temperature ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$), with food and water provided *ad libitum*. The animals were distributed in five groups (n=6): sealers and control group (empty tubes. The animals were anesthetized intraperitoneally with ketamine hydrochloride (80 mg kg^{-1} body weight, Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brazil) and xylazine hydrochloride (4 mg kg^{-1} body weight; União Química-Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, SP, Brazil) and disinfected with 5% iodine solution. After asepsis, the dorsal skin was shaved, a 2 cm craniocaudal incision was made, and a subcutaneous pocket was created. Next, four tubes were inserted into each animal's subcutaneous pocket, one from each group, and the skin was closed with a 4/0 silk suture (ETHICON, São José dos Campos, São Paulo, SP, Brazil). After 7, 15, 30, and 60 days, the animals were euthanized with anesthetic overdose, the implanted tubes with adjacent tissues were removed, and the samples were processed for light microscopy.

Table 1 - Bioceramic sealers, chemical composition, manufacturer, and proportions

Sealers	Composition	Manufacturers	Proportion
Bio C-Sealer (BIOC)	Calcium silicates, calcium aluminate, calcium oxide, zirconium oxide, iron oxide, silicon dioxide, and dispersing agent.	Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brazil	Ready-to-use
Sealer Plus BC (SP)	Calcium disilicate, nanoparticulate calcium trisilicate, zirconium oxide.	MK LIFE, Porto Alegre, Brazil	Ready-to-use
TotalFill BC Sealer (TF)	Zirconium oxide, calcium silicates, calcium, monobasic phosphate, calcium hydroxide, filling, and thickening agents	FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça	Ready-to-use
AH Plus (AHP)	Paste A: epoxy bisphenol-A resin and epoxy bisphenol-F, calcium tungstate (WO ₄ Ca ₂), zirconium oxide (ZrO ₂), silica, iron oxide. Paste B: dibenzyl amine, aminoadamantane, WO ₄ Ca ₂ , ZrO ₂ , silica, silicone	Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany	1 g: 1 g (folder/ folder)

Histological Procedures

The implanted tubes and adjacent tissues were removed and immediately immersed in a 4% formaldehyde solution, buffered with 0.1 M sodium phosphate and pH 7.2 for 72 hours. After fixation, the specimens were dehydrated, diaphanized, immersed in liquid paraffin (60°C) for 4 hours, and embedded in paraffin. Longitudinal sections with a thickness of 6 µm were obtained. Non-serial sections were stained with haematoxylin-eosin (H&E) for morphological analysis and estimated the number of inflammatory cells and capsules' thickness. Non-serial sections also adhered to slides treated with 4% silane (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA) and subjected to the immunohistochemistry for detection of interleukin-6 (IL-6) and osteocalcin (OCN).

Numerical density of inflammatory cells

To estimate the inflammatory reaction induced by materials in the connective tissue, three HE-stained sections (with a minimal distance of 100 µm between the sections) were captured under x695 magnification (each field with 0.09 mm²). The number of inflammatory cells was computed using an image analysis program (Image-Pro Express 6.0 program,

Olympus, Tokyo, Japan) in this field. Thus, in each specimen, the inflammatory cells were estimated in a total standardized field of 0.27 mm². Thus, the total number of inflammatory cells (obtained from three sections per specimen) was divided by total area (0.027 mm²), and the number of inflammatory cells per mm² was calculated per specimen (Fonseca et al., 2016; Silva et al., 2021)

Thickness of capsules

According to ISO-10993-6: 2016 (International Organization for Standardization, 2016), the fibrous capsule extension can be used as a parameter to assess the biological response. Utilizing a camera (DP- 71; Olympus Corporation, Tokyo, Japan) attached to the light microscope (BX-51; Olympus), three images of non-serial H&E-stained sections per specimen were captured at x65 magnification. The capsule measurement was performed with an image analysis program (Image-Pro Express 6.0 program, Olympus, Tokyo, Japan); the distance was traced, in the middle portion of the capsule, from its surface adjacent to the material to its limit with the adjacent tissues. From the three measurements, the average of each specimen was calculated. This analysis was performed in all specimens (in all groups and periods) (Silva et al., 2020).

Immunohistochemical detection of IL-6

For antigen retrieval, sections were immersed in a 0.001 M sodium citrate buffer pH 6.0 and heated at 98° C using a microwave for 30 min. After cooling, the slides were washed with Tris-HCl 0.05 M buffer at pH 7.4, and the endogenous peroxidase was inactivated by treatment with 5% aqueous hydrogen peroxide solution for 20 minutes. Next, the sections were washed and incubated with 2% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) for 30 minutes. Then, the sections were incubated overnight in a humid chamber at 4 ° C with

a primary mouse anti-IL-6 antibody (Abcam, Cambridge Science, Cambridge, UK; code Ab 9324) at 1: 100 dilution. After washing, the sections were incubated with biotinylated anti-mouse IgG secondary antibody (LSAB, Dako Inc., Carpinteria, California, USA) at room temperature. The 3,3'-diaminobenzidine chromogen (ImmPACT™ DAB; Vector, Burlingame, CA, USA) revealed peroxidase activity, and then the sections were counterstained with haematoxylin Carazzi. Finally, the sections were incubated with non-immune serum instead of the anti-IL-6 antibody as a negative control.

The number of IL-6-immunolabelled cells was estimated in all specimens. In each specimen, a standardized field was captured at x695 magnification (0.09 mm²) using a digital camera attached (DP-71, Olympus, Tokyo, Japan) to the light microscope (BX-51, Olympus). The captured image was transferred to an image analysis program (Image-Pro Express 6.0, Olympus), and the number of immunostained cells (in brown/yellow colour) was computed. Thus, the number of immunolabelled cells per mm² was calculated (Silva et al., 2017; Silva et al., 2020)

Immunohistochemical detection of osteocalcin (OCN)

After dewaxing, the antigenic retrieval was performed by immersion in heated (96-98° C) 0.001 M sodium acetate at pH 6.0 under microwave treatment for 10 min. Then, the sections were immersed in 5% hydrogen peroxide for 20 min to inactivate the endogenous peroxidase. After washing with Tris-HCl buffer, the sections were incubated with 3% BSA for 20 minutes and subsequently with primary rabbit anti-osteocalcin antibody (1:500, code SAB1306277; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 16 hours in a humid chamber at 4° C. After washing, the sections were incubated with mouse/rabbit labelled polymer-HRP (EnVision + Dual Link System-HRP, Dako Inc., Carpinteria, CA, USA; K4061) for 1 hour at room temperature. The immunoreaction was revealed by 3,3'- diaminobenzidine chromogen (DAB, Dako Inc.,

Carpinteria, California, USA) for 3 min. The sections were counterstained with Carazzi haematoxylin. The sections were incubated in non-immune serum instead of anti-OCN antibody in the negative controls.

The number of OCN-immunolabelled cells was obtained in all specimens. First, the capsule's standardized field (0.09 mm²) was captured at x695 magnification. Then, using an image analysis program, the cells exhibiting immunoreactivity to the OCN antibody (in brown/yellow colour) were computed, and, subsequently, the number of immunolabelled cells was calculated (Silva et al., 2017; Silva et al., 2020).

von Kossa reaction and analysis under polarized light

The von Kossa method was used for calcium deposit detection in the capsules. The sections were dewaxed, hydrated, and immersed in 5% silver nitrate solution for 1 hour under sunlight. Then the sections were rinsed in distilled water for 3 minutes, immersed in 5% sodium hyposulfite solution for 5 minutes. After washing with distilled water for 5 minutes, the sections were stained with picosirius-red for 1 hour, dehydrated, and mounted in a resinous medium (Silva et al., 2020; Viola et al., 2012). Sections near to those submitted to von Kossa were dewaxed and mounted in a resinous medium. As calcite crystals exhibit birefringence (Holland et al. 1999), the unstained sections were analysed under polarized illumination (Olympus, BX51).

Physicochemical properties analysis

After the histological process, the dentin tubes were removed, and the porosity and dentin-material interface were evaluated in the micro-CT. All groups and periods were assessed compared to the baseline. The sealers were manipulated according to the manufacturers, filled

into the new dentin tubes, and stored for 48 hours at 37 °C and 95% humidity for a complete set.

Porosity

Porosity analysis by micro-CT was performed based on a previous study (Torres *et al.*, 2018, 2019). Before the scanning, the dentin tubes in the subcutaneous were placed in contact with a moistened gauze and stored for 24 hours at 37 °C and 95% humidity. The samples were assessed by micro-CT (SkyScan 1176), using as parameters voltage 80 kV, 313 μ A current, pixel size 9 μ m, and 360° rotation with a Cu + Al filter. The porosity of the material was calculated in mm³ and percentage. Reconstruction of the images was performed using NRecon software (V1.6.4,7; Bruker-MicroCT).

Each material had the correction parameters for smoothing, beam hardening, and ring artifacts defined. CTAn software (V1.11.8; Bruker-MicroCT) was used to analyze the images. Porosity values for each material and period were evaluated compared with the baseline. A 3D model of the filled cavities was obtained by the CTAn software and visualized and saved using the CTVol program (V2.0; Bruker-MicroCT).

Dentin-material interface

The method used to evaluate the differences in the percentages of voids at the interface between the dentin surface of the root canal walls and the filling materials was based on previous studies (Gandolfi *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2020). The 3D distribution of the interface voids in a predefined volume of interest (VOI) was calculated for each group and compared with the baseline. Each 3D VOI was a 40-micron-thick interface volume consisting of the superficial 20 microns of the canal wall dentine and the first 20 microns of the filling material. Thus, voids with a size of 5 μ m inside the VOI were detected by the threshold gray level. 3D

models of the voids were created using CTAn software (V1.15.4.0; Bruker-MicroCT, Kontich, Belgium).

Statistical analysis

All data were statistically analyzed by GraphPad Prism 5 software (Jandel Scientific, Sausalito, CA, USA). The data of the biological properties were submitted to two-way ANOVA followed by the Tukey test. The porosity and interface analysis data were submitted to One-way ANOVA, also, followed by the Tukey test. The significance level accepted was $p \leq 0.05$.

Results

Morphological and morphometrical findings

The sections of capsule thickness of the sealers in different periods are presented at Figure 1. At 7 days, the dentine tubes were surrounded by thick capsules exhibiting a high density of cells. Note that in the AHP specimens, an intense inflammatory infiltrate was present. However, in all groups, the inflammatory infiltrate was located next to the opening of the dentine tubes and, adjacent tissues (loose connective tissue and muscle tissue) were with standard features (Figs. 1a-1e). In addition, an evident reduction in the thickness of the capsules was observed in groups after 60 days (Figs. 1f-1j).

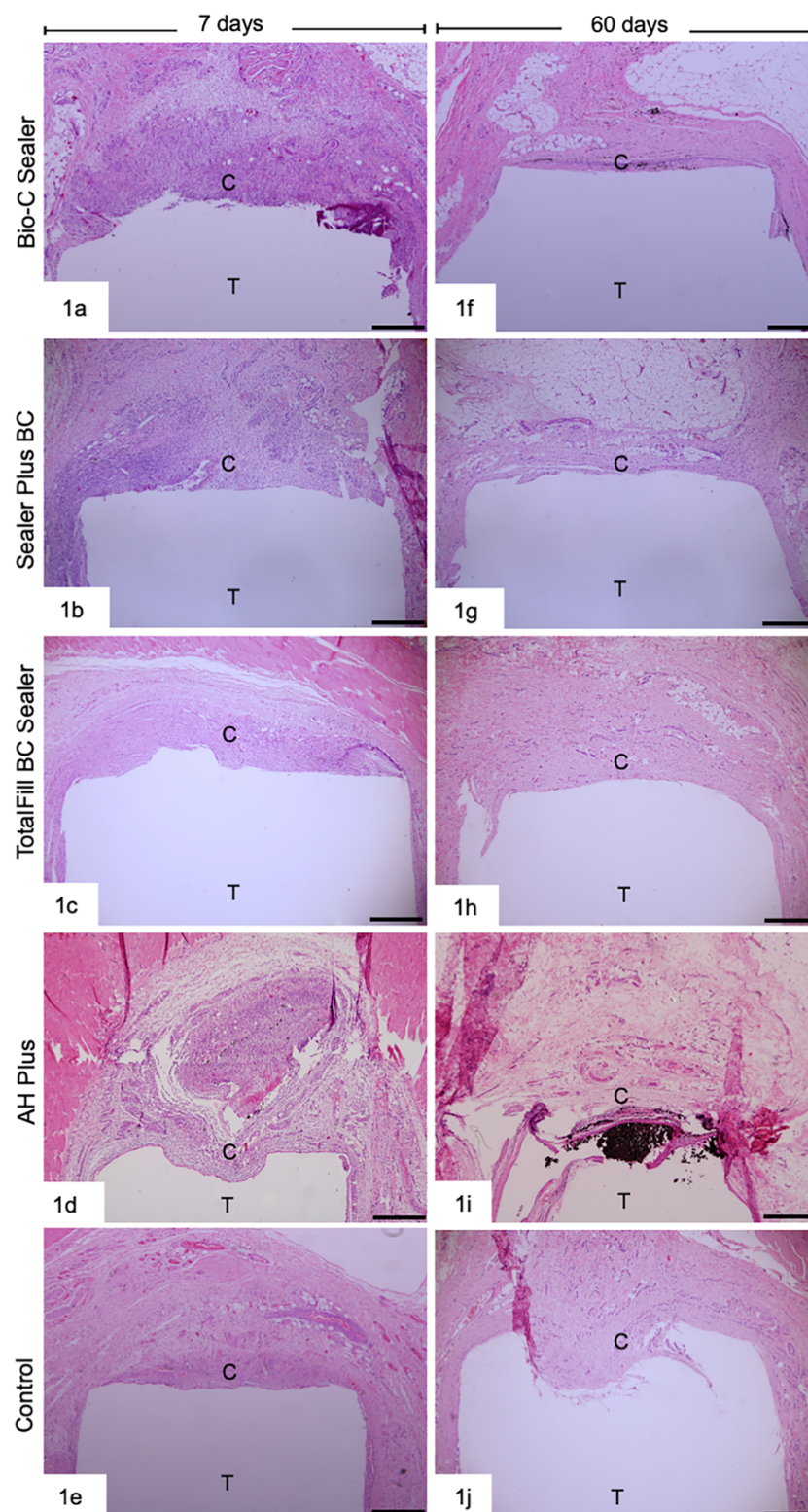


Figure 1 - Photomicrographs of sections showing portions of capsules (C) adjacent to the opening of the dentine tubes (T). Figs. 1a-1j: an overview of the capsules (C) after 7(Figs.1a-1e) and 60 (Figs.1f-1j) days to the implants. HE. Bars= 50 μ m

According to Table 2, the thickness of capsules of AHP was greater significant than in other groups at 7 and 60 days. At 7 and 15 days, the capsules around BIO specimens were significantly thicker than in SP and TF specimens ($P < 0.05$), but no significant difference was found between SP and TF groups ($P > 0.05$). At 30 days, had no significant difference between AHP and TF groups, which showed greater values than in BIO and CG specimens. A significant difference was also not detected between BIO and SP groups ($P > 0.05$). After 60 days, AHP presented thicker capsules than other groups ($P < 0.05$). On the 60th day, BIO, SP, TF, and CG specimens exhibited thin capsules, and no significant difference was detected among these groups ($P > 0.05$). Thus, in all groups, a significant reduction in the thickness of the capsules was seen over time.

The sections showing inflammatory reaction induced by materials in the connective tissue are presented at Figure 2. At 7 days, the examination at high magnification revealed several mononuclear inflammatory cells, particularly macrophages, lymphocytes, and plasma cells, in the thick capsules around the specimens (Figs. 2a-2e). In addition, an enhanced density of inflammatory cells was observed in the capsules of AHP specimens (Fig. 2d). At 15 days, some fibroblasts were seen among inflammatory cells in the capsules of all groups, except in AHP specimens. In addition, the capsules contained numerous inflammatory cells (Figs. 2f-2j). After 30 (Figs. 2k-2o) and 60 (Figs. 2p-2t) days, the capsules around BIO, SP, TF, and CG specimens contained predominantly fibroblasts dispersed between bundles of collagen fibers and a few inflammatory cells. In contrast, in AHP specimens, several inflammatory cells were still observed (Figs. 2n and 2s).

The analysis of the numerical density of inflammatory cells (Table 2) showed that the highest values of IC were observed in the AHP specimens ($P < .0001$) in all periods. At 7 days, the IC number was significantly greater in the BIO than in SP and TF specimens ($P < 0.05$), while no significant difference was observed between SP and TF groups. After 15 days, a

significant difference in IC number was not detected between BIOC and TF groups, but the IC value was greater in the BIOC than in SP specimens ($P < 0.05$). Moreover, no significant difference was found among SP, TF, and CG specimens at 15 days. On the 30th day, significant differences were not observed among BIOC, SP, and TF specimens; a significant difference was also not observed between BIOC and CG groups ($P > 0.05$). Finally, at 60 days, no significant difference was found among BIOC, SP, TF, and CG ($P > 0.05$). Thus, a significant reduction in IC was found in all groups over time.

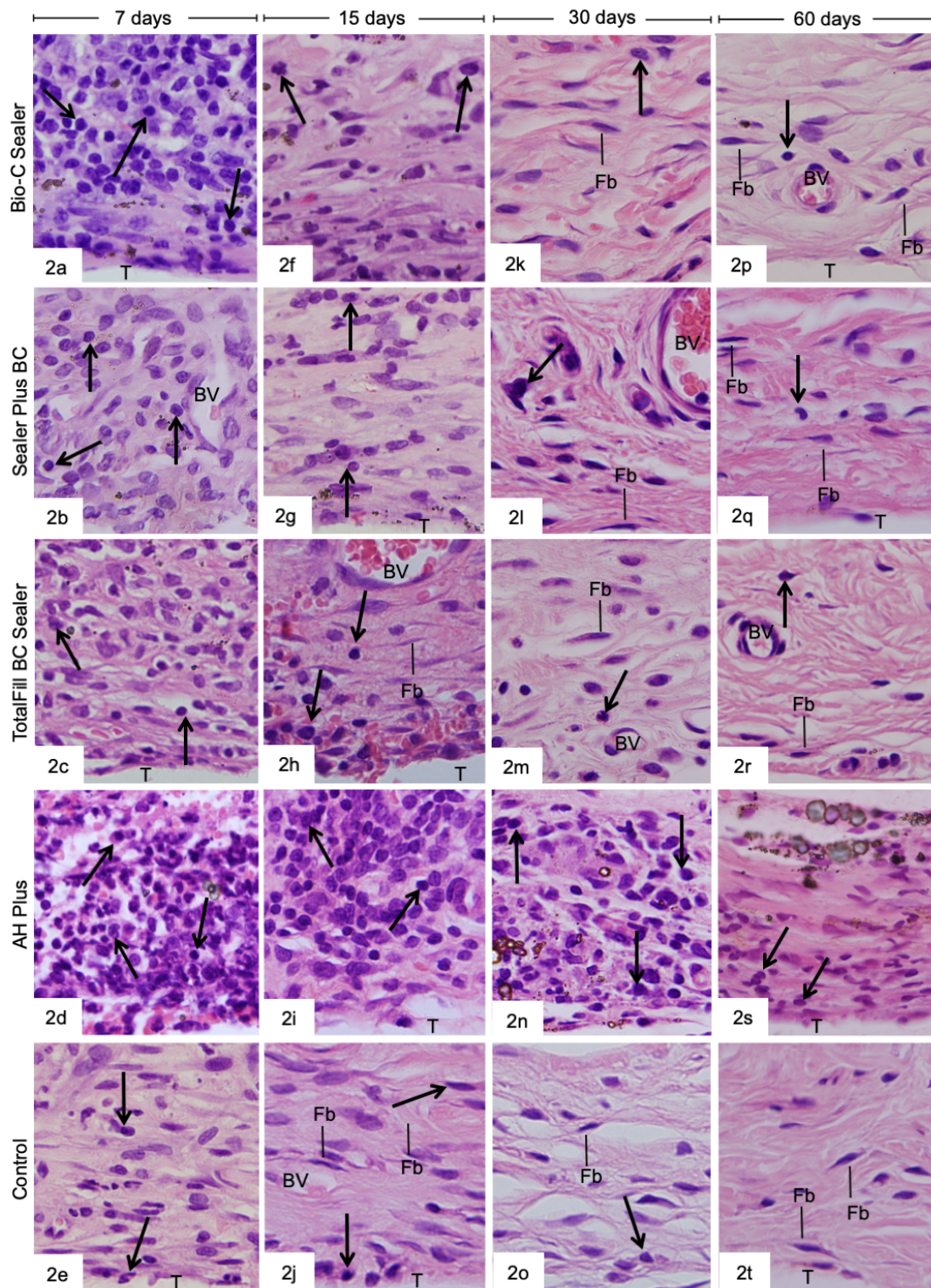


Figure 2- Photomicrographs of sections showing capsules adjacent to the implanted tubes (T) in the subcutaneous tissue, in high magnification, at 7 (Figs. 2a-2e), 15 (Figs. 2f-2j), 30 (2k-2o), and 60 (2p-2t) days. Figs. 2a-2e: the capsules show numerous inflammatory cells (arrows), BV, blood vessels; Figs. 2p-2t: the capsules have typical fibroblasts (Fb) between bundles of collagen fibers (CF); few inflammatory cells (arrows) are seen in the capsules. HE. Bars= 13 μ m.

Table 2. Capsule thickness (μm), number of inflammatory cells (IC) per mm^2 , number of IL-6-immunopositive cells (IL-6), and number of OCN-immunolabelled cells per mm^2 (OCN) in Bio-C Sealer, Sealer Plus BC, TotalFill BC Sealer, AH Plus, and Control groups after 7, 15, 30, and 60 days. Mean (standard deviation).

Groups Parameters	Bio-C Sealer	Sealer Plus BC	TotalFill BC	AH Plus	Control
7 days					
Thickness	$501 \pm 35^{b,1}$	$395 \pm 43^{c,1}$	$395 \pm 43^{c,1}$	$625 \pm 69^{a,1}$	$299 \pm 66^{d,1}$
Inflammatory Cells	$887 \pm 95^{a,1}$	$472 \pm 64^{d,1}$	$568 \pm 85^{c,1}$	$1171 \pm 90^{a,1}$	$374 \pm 99^{e,1}$
Interleucin-6	$311 \pm 12^{b,1}$	$246 \pm 13^{c,1}$	$215 \pm 14^{d,1}$	$385 \pm 18^{a,1}$	$185 \pm 15^{e,1}$
Osteocalcin	$37 \pm 6^{a,1}$	$19 \pm 6^{c,1}$	$28 \pm 6^{b,1}$	-	-
15 days					
Thickness	$470 \pm 21^{a,1}$	$291 \pm 44^{c,2}$	$305 \pm 35^{c,2}$	$405 \pm 44^{b,2}$	$276 \pm 35^{c,1}$
Inflammatory Cells	$516 \pm 70^{b,2}$	$372 \pm 63^{cd,2}$	$423 \pm 51^{bc,2}$	$686 \pm 33^{a,2}$	$293 \pm 53^{d,1}$
Interleucin-6	$152 \pm 13^{b,2}$	$146 \pm 12^{bc,2}$	$170 \pm 15^{b,2}$	$272 \pm 15^{a,2}$	$122 \pm 14^{c,2}$
Osteocalcin	$39 \pm 6^{a,1}$	$31 \pm 5^{ab,2}$	$30 \pm 9^{b,1}$	-	-
30 days					
Thickness	$149 \pm 9^{b,2}$	$203 \pm 26^{bc,3}$	$222 \pm 33^{ac,3}$	$274 \pm 24^{c,3}$	$160 \pm 17^{b,2}$
Inflammatory Cells	$241 \pm 42^{b,3}$	$278 \pm 26^{b,3}$	$337 \pm 38^{b,2}$	$584 \pm 31^{a,3}$	$130 \pm 11^{c,2}$
Interleucin-6	$83 \pm 12^{c,3}$	$130 \pm 12^{b,2}$	$128 \pm 17^{b,3}$	$219 \pm 21^{a,3}$	$83 \pm 11^{c,3}$
Osteocalcin	$50 \pm 6^{a,2}$	$41 \pm 6^{b,3}$	$39 \pm 9^{b,2}$	-	-
60 days					
Thickness	$138 \pm 19^{b,2}$	$140 \pm 18^{b,4}$	$127 \pm 8^{b,4}$	$164 \pm 33^{a,4}$	$94 \pm 8^{b,3}$
Inflammatory Cells	$172 \pm 11^{b,3}$	$152 \pm 8^{b,4}$	$148 \pm 11^{b,4}$	$331 \pm 8^{a,4}$	$80 \pm 7^{b,2}$
Interleucin-6	$67 \pm 10^{b,3}$	$71 \pm 12^{b,3}$	$80 \pm 15^{b,4}$	$157 \pm 15^{a,4}$	$59 \pm 8^{b,4}$
Osteocalcin	$72 \pm 6^{a,3}$	$56 \pm 7^{b,4}$	$56 \pm 7^{b,3}$	-	-

The values are the mean $\pm$ standard deviation. The comparison between groups in the same period is indicated by superscript letters on the line. Same letters = no statistically significant difference. The comparison between intervals in the same group is indicated by numbers superscript in the columns; same numbers = no statistically significant difference. The Tukey test ($P \leq .05$).

Immunohistochemical detection of IL-6

The sections subjected to the immunohistochemistry for detecting IL-6 are presented at Figure 3. In addition, several immunolabelled inflammatory cells were present in the capsules at 7 and 15 days (Figs. 3a-3j), while few immunostained fibroblasts and inflammatory cells were seen after 30 and 60 days (Figs. 3k-3t).

According to Table 2, the number of IL-6-immunolabelled cells was significantly greater in the AHP than in other groups ($P < 0.0001$) in all periods. At 7 days, the immunoexpression for IL-6 was significantly greater in the BIOC than SP and TF ($P < 0.05$), and SP showed a higher value than in TF specimens ($P < 0.05$). At 15 days, no significant difference in the immunoexpression of IL-6 was observed among BIOC, SP, and TF groups, which showed values greater than CG specimens. After 30 days, a significant difference was not observed between SP and TF ($P > 0.05$) groups and BIO and CG groups ($P > 0.05$). At 60 days, BC, SP, TF, and CG groups showed the lowest values; no significant difference was observed ($P > 0.05$). From 7 to 60 days, a significant reduction in the immunoexpression of IL-6 was detected in the capsules of all groups over time ($P < 0.05$).

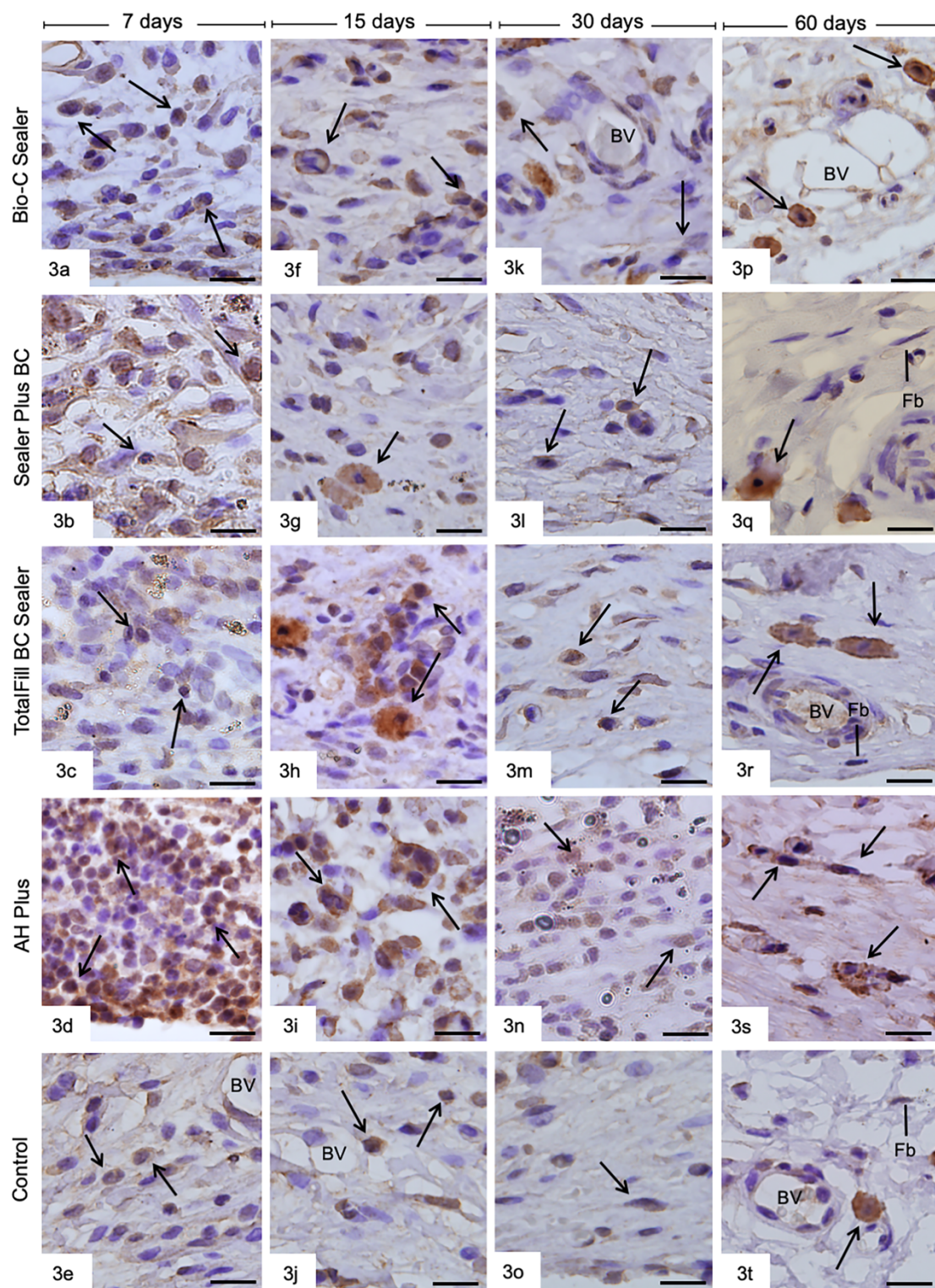


Figure 3 - Photomicrographs showing capsules adjacent to the tubes implanted in the subcutaneous tissue for 7 (Figs. 3a-3e), 15 (3f-3j), 30 (3k-3o) 60 (Figs. 3p-3t) days. The sections were subjected to immunohistochemistry to detect IL-6-immunopositive cells (in brown) and haematoxylin. BV, blood vessels. Bars= 13 μm

Immunohistochemical detection of osteocalcin (OCN)

The sections subjected to immunohistochemistry to detect OCN-immunolabelled cells (brown-yellow) are presented at Figure 4. Few OCN-immunolabelled cells were observed in the capsules of BIOC, SP, and TF groups at all time points. In contrast, immunolabelled cells for OCN were not seen in the capsules of AHP and GC groups in the different periods (Figs. 4a-4t). At 30 and 60 days, immunoreactivity was also observed in the extracellular matrix (Figs. 4k-4m, 4p, and 4r). According to table 2, the BIOC group exhibited the highest values of OCN-immunolabelled cells in the capsules in all periods. At 7 days, the immunoexpression of OCN was significantly greater in the TF group than in SP specimens ($P < 0.05$). However, there was no significant difference between SP and TF ($P > 0.05$) at 15, 30, and 60 days. At all-time points, OCN-immunolabelled cells were not observed in the capsules of AHP and GC groups.

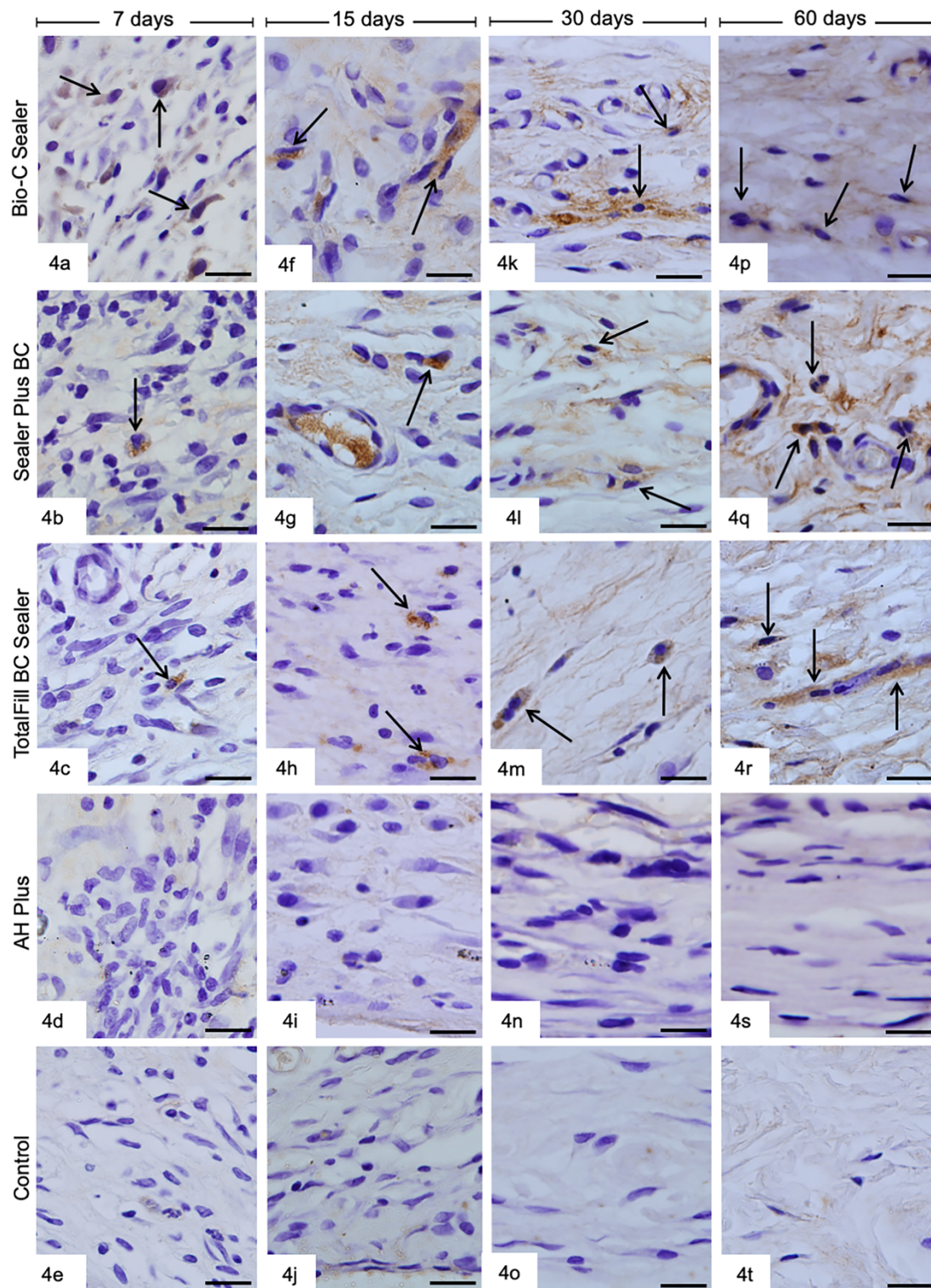


Figure 4 - Sections showing capsules adjacent to the tubes implanted for 7 (Figs. 4a-4e), 15 (4f-4j), 30 (4k-4o), and 60 (Figs. 4p-4t) days. The sections were subjected to immunohistochemistry for osteocalcin (brown-yellow color) and hematoxylin. Bio-C Sealer, Sealer Plus BC, TotalFill BC Sealer contain immunolabelled fusiform/elliptical cells (arrows). No immunolabelled cells are observed in AH Plus and control groups (Fig. 4d-4s and 4e-4t). Bars= 13 μ m

von Kossa reaction and analysis under polarized illumination

The sections with picosirius red submitted to von Kossa method and sections analyzed by polarization microscope are presented at Figure 5. The capsules of BIO-C, SP, TF, and AHP exhibited von Kossa-positive structures at 7 (Figs. 5a-5d) and 60 (Figs. 5e-5h) days. Unstained sections analyzed under polarized light revealed birefringent structures in the capsules of BIO-C, SP, TF, and AHP samples (Figs. 5i-5l; 5m-5p). Birefringent structures were not found in the capsules of CG.

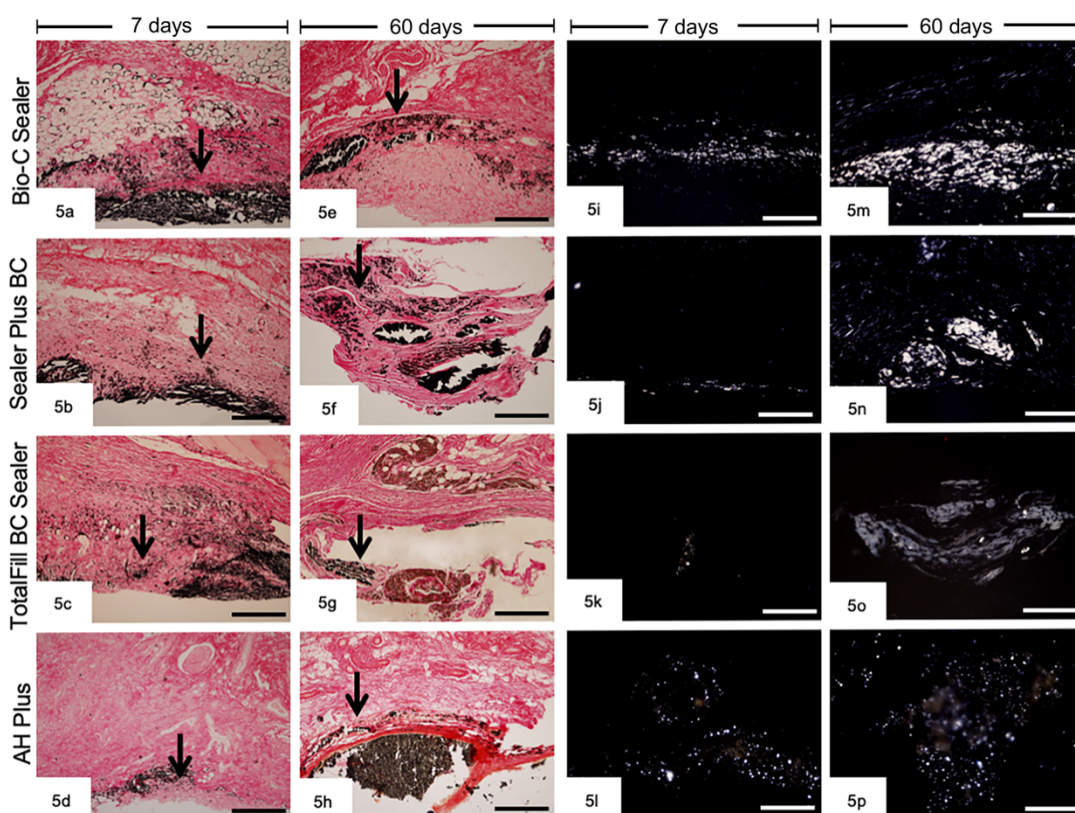


Figure 5 - Sections submitted to Kossa and picosirius red. Bio-C Sealer, Sealer Plus BC, TotalFill BC Sealer and AH Plus exhibit positive structures to von Kossa method (black/brown color), at 7(Figs. 5a-5e) and 60 (Figs 5e-5h) days. Figs. 5i-5l and 5m-5p -unstained sections analyzed under polarization illumination. Birefringent deposits are present in the capsules adjacent to the materials. Bars= 285 μ m

Porosity

The porosity values observed in micro-CT are shown in Table 3. The porosity values increased at 60 days compared with the baseline ($P<0.05$), except in AH Plus exhibited similar porosity values ($P>0.05$). Bio-C Sealer showed the highest porosity at 60 days ($P<0.05$). Sealer Plus BC and TotalFill BC exhibited similar porosity values at 15, 30, and 60 days ($P>0.05$). AH Plus showed the lowest porosity at 60 days ($P<0.05$). The 3D models created in the CTVox program with the different materials are presented in Figure 6.

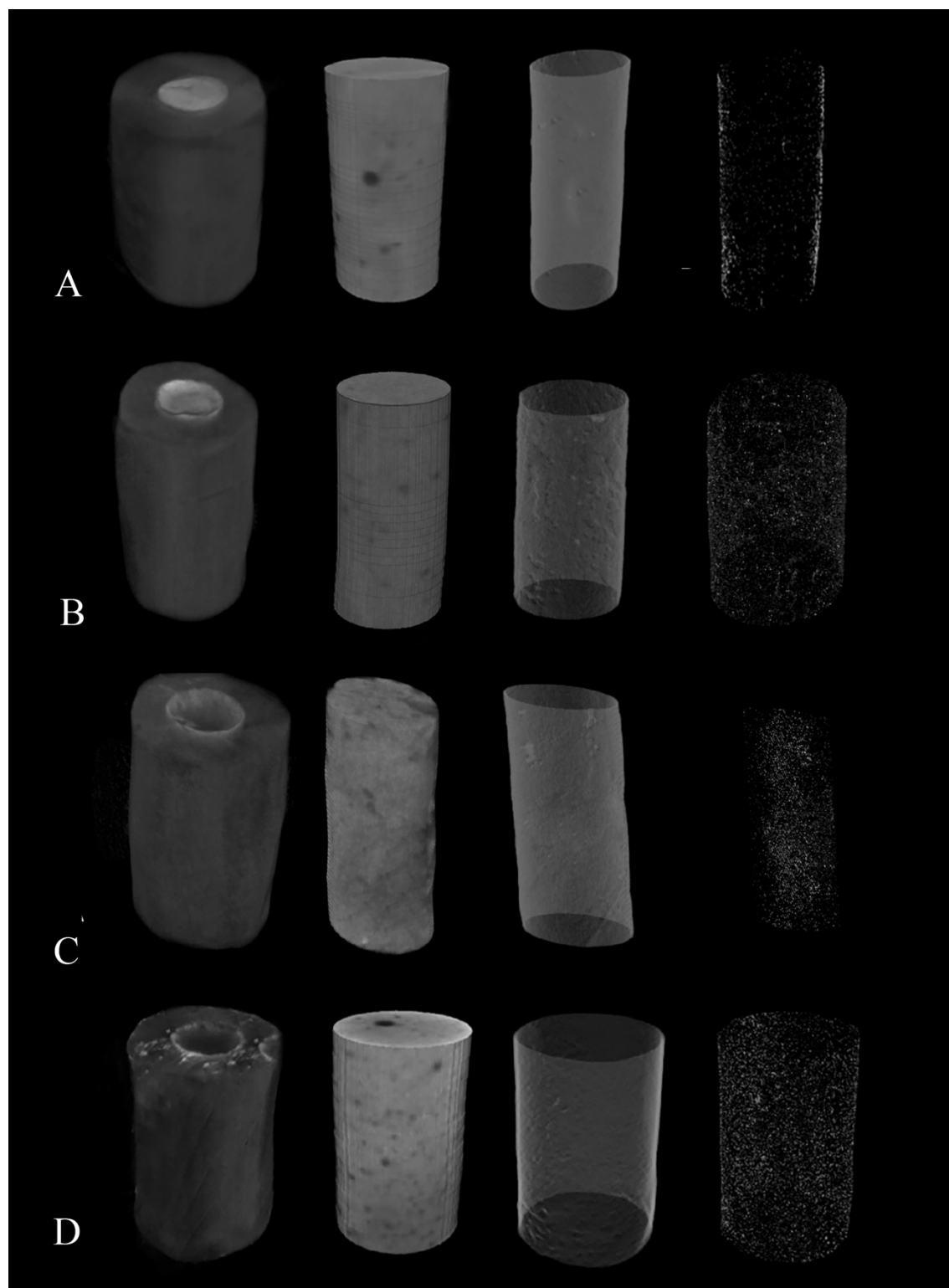


Figure 6 - 3D models, representing the porosity of the dentin tubes filled with the sealers: (A) Bio-C Sealer, (B) Sealer Plus BC, (C) TotalFill BC Sealer and (D) AH Plus.

Dentin-material interface

The Table 3 shows the interface evaluation of the sealers. All groups showed higher values in the percentage of voids at 60 days compared to the baseline ($P < 0.05$). However, Bio-C Sealer, Sealer Plus BC, TotalFill BC, and AH Plus exhibited a similar percentage of voids during all time ($P > 0.05$). Images captured from CTAn software are presented in Figure 7.

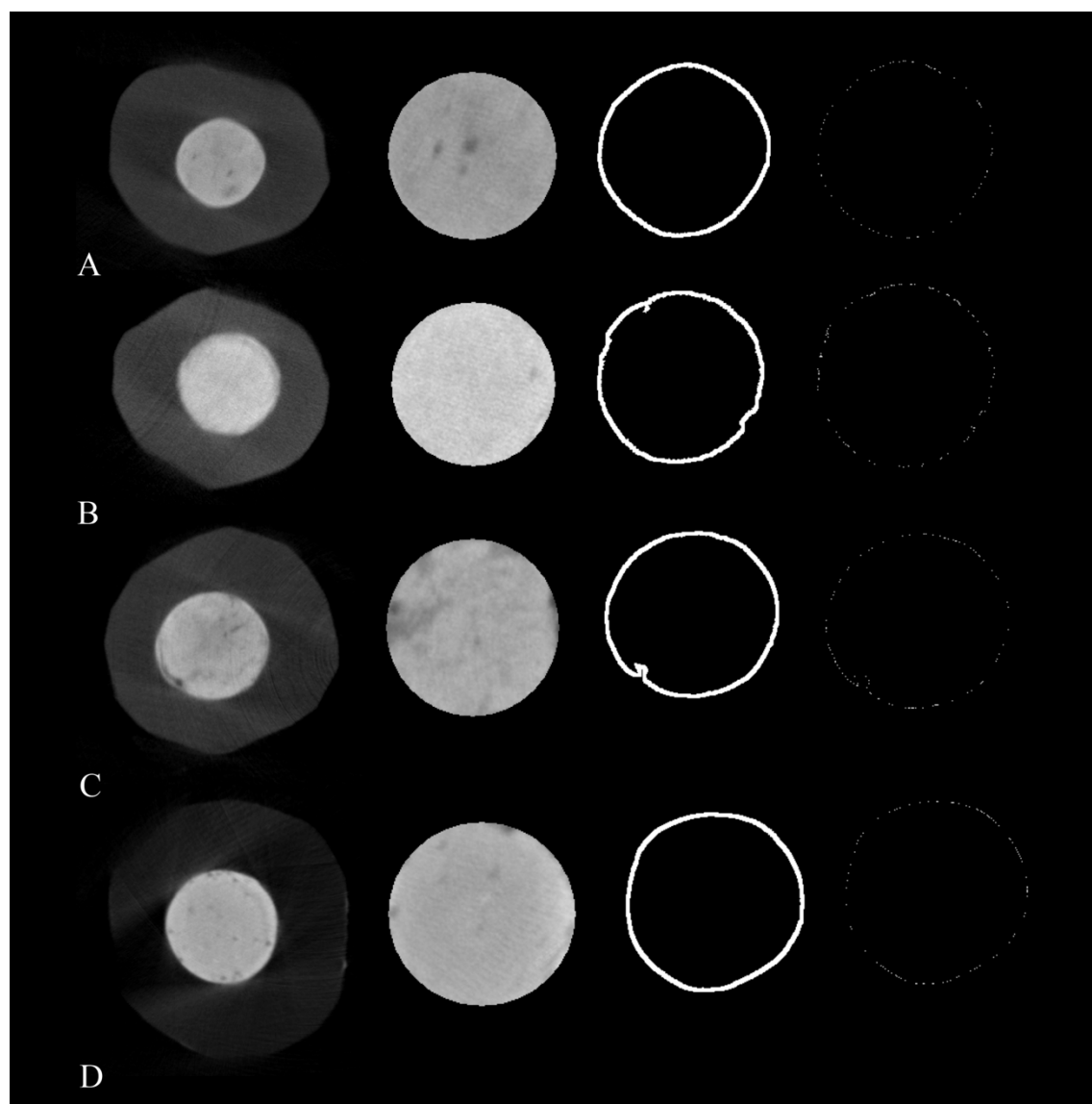


Figure 7 - Microtomographic images representing of the presence of voids and gaps in the interface dentin/sealer of (A) Bio-C Sealer, (B) Sealer Plus, (C) TotalFill BC Sealer and (D) AH Plus.

Table 3. Porosity and interface (voids) in the different time intervals (mean and standard deviation) observed in bioceramic sealers.

Groups Periods	Bio-C Sealer	Sealer Plus BC	TotalFill BC	AH Plus
Porosity (%)				
Baseline	0.71 ($\pm$ 0.27) ^{D, a}	0.81 ($\pm$ 0.09) ^{B, a}	0.66 ($\pm$ 0.19) ^{C, a}	0.84 ($\pm$ 0.18) ^{C, a}
7 days	1.34 ($\pm$ 0.43) ^{CD, b}	0.52 ($\pm$ 0.42) ^{B, c}	1.11 ($\pm$ 0.25) ^{BC, b}	2.02 ($\pm$ 0.28) ^{B, a}
15 days	2.14 ($\pm$ 0.47) ^{CD, ab}	2.25 ($\pm$ 0.95) ^{A, ab}	1.45 ($\pm$ 0.38) ^{BC, b}	2.85 ($\pm$ 1.12) ^{A, a}
30 days	3.40 ($\pm$ 0.59) ^{B, a}	2.45 ($\pm$ 0.42) ^{A, ab}	1.83 ($\pm$ 0.69) ^{B, b}	2.68 ($\pm$ 0.78) ^{A, a}
60 days	4.66 ($\pm$ 0.68) ^{A, a}	2.87 ($\pm$ 0.17) ^{A, b}	3.07 ($\pm$ 0.71) ^{A, b}	1.91 ($\pm$ 0.61) ^{AC, c}
Interface (%)				
Baseline	1.01 ($\pm$ 0.30) ^{C, a}	1.43 ($\pm$ 0.31) ^{C, a}	1.80 ($\pm$ 1.95) ^{B, a}	0.81 ($\pm$ 0.42) ^{C, a}
7 days	1.20 ($\pm$ 1.17) ^{BC, a}	0.99 ($\pm$ 0.26) ^{C, a}	1.53 ($\pm$ 0.63) ^{B, a}	0.95 ($\pm$ 0.49) ^{C, a}
15 days	2.52 ($\pm$ 1.62) ^{BC, a}	1.20 ($\pm$ 0.39) ^{C, a}	2.82 ($\pm$ 1.46) ^{B, a}	1.69 ($\pm$ 0.78) ^{C, a}
30 days	3.60 ($\pm$ 0.83) ^{B, a}	3.26 ($\pm$ 0.21) ^{B, a}	2.78 ($\pm$ 0.96) ^{B, a}	2.95 ($\pm$ 0.19) ^{B, a}
60 days	5.60 ($\pm$ 0.41) ^{A, a}	5.69 ($\pm$ 0.43) ^{A, a}	5.75 ($\pm$ 0.37) ^{A, a}	5.39 ($\pm$ 0.55) ^{A, a}

ABC Different capital letter in the same column indicate statistically significant difference among the periods ($p < 0.05$).

abcd Different lower case letters on the same row indicate statistically significant difference among the sealers ($p < 0.05$).

Baseline= sealers after complete setting (37 ± 1 °C, $95 \pm 5\%$ relative humidity)

Discussion

The null hypothesis was rejected because the biological and physicochemical properties differed. At the end of this study, bioceramic cements induced less inflammation, presented bioactive potential and exhibited greater porosity when compared to AHP, except for the interface, which was no difference between them.

The present study evaluated biocompatibility and bioactivity using dentin tubes to enable interactions between ready-to-use bioceramics and dentin interface, simulating clinical application, as previous studies with others materials (Bósio et al., 2014; Dreger et al., 2012; Holland et al., 1999). No data evaluating the biocompatibility, bioactivity with a dentin tubes model of these ready-to-use bioceramics and the analysis of the porosity and interface of the sealers in different periods using micro-CT were described yet. At 7 days, all sealers presented

a thick capsule exhibiting a high density of inflammatory cells around the dentine tubes and enhanced IL-6 immunoexpression. The IL-6 is a cytokine produced by fibroblasts in response to aggressions and infections (Fonseca et al., 2016; Silva et al., 2014). This cytokine plays an essential role in the inflammatory response (Fonseca et al., 2016; Silva et al., 2015). The initial reaction observed in the control group (empty tubes) has been associated with surgical trauma (Fonseca et al., 2016; Silva et al., 2014) since previous studies using dentin tubes, but others materials, presented similar results (Dreger et al., 2012; Holland et al., 1999).

Additionally, the alkaline pH of the bioceramics sealers and the formation of calcium hydroxide can promote the recruitment of inflammatory cells and the production of cytokines (Fonseca et al., 2016; Silva et al., 2015). Thus, the alkaline pH and calcium hydroxide formation may be related to the greater inflammatory infiltrate and IL-6 immunoexpression in the capsules around the tubes filled with sealers than CG specimens. However, this alkaline environment provided by bioceramic sealers can positively affect apical healing, contributing to the formation of mineralized tissues (Urban et al., 2018). In addition, bioceramics sealers have shown high solubility after immersion in water compared with resin-based sealers (Torres et al., 2020; Zordan-Bronzel et al., 2019a). The alkaline pH of the environment is because of the disassociation of formed calcium hydroxide during the hydration process into Ca^{2+} and OH^- ions (Borges et al., 2012; Zordan-Bronzel et al., 2019b). Additionally, the bioactive potential of calcium silicate-based sealers is a consequence of the slight solubility of these materials even after setting (Donnermeyer et al., 2019).

BIOC had a thickness capsule with a higher value of inflammatory cells and IL-6-immunopositive cells than SP and TF on the 7th day. There was a decrease in the number of ICs and the IL-6 immunoexpression on the 15th and 30th day, showing an intense remodeling in the capsules of all groups, except AHP in the initial periods. This response could be explained by the high solubility and flow of BIOC (Zordan-Bronzel et al., 2019a).

SP and TF presented no statistical difference in the number of ICs and immunolabelling from the 15th day. Both materials are cytocompatible (Benetti et al., 2019; López-García et al., 2019). After 60 days, the bioceramics sealers had no statistical difference among them and the control group. There was a gradual and significant decrease in the numerical density of ICs and the number of IL-6-immunopositive cells in the capsules with concomitant formation of dense connective tissue containing collagen fiber bundles in the bioceramic sealers. A significant reduction in the capsule thickness was observed in all groups over time. However, only bioceramic-sealers were surrounded by thin capsules, i.e., exhibiting thickness lower than 150 μm . These findings taken together indicate that BIO-C, SP, and TF are biocompatible, in accordance with studies using polyethylene tubes in subcutaneous rat tissue (Silva et al., 2020, Silva et al., 2021).

AHP, an epoxy-based root canal filling sealer, was used in this study as a reference material since this sealer is an epoxy resin sealer (Garrido et al., 2010). AH Plus presented the highest values of inflammatory cells and IL-6-immunopositive cells in all periods. The number of these cells decreased over time. However, on the 60th day, the values were significantly different from the control group and the other sealers. The mechanism of this inflammatory reaction can be related to AHP composition, that delays the healing process could be the epoxy resin released (Benetti et al., 2019) and the amines' presence to accelerate the polymerization (Zhou et al., 2015). Thus, there is evidence that bioceramic sealers exhibit lower cytotoxicity (López-García et al., 2019) and better biocompatibility than AH Plus sealer (Benetti et al., 2019; Silva et al., 2020).

The bioactive potential was assessed by the von Kossa histochemical technique combined with the immunohistochemical reaction of osteocalcin; only the von Kossa method is alone is not appropriate for the identification and quantitation of bonelike minerals

(Bonewald et al., 2003). Osteocalcin has been used as a marker for mature osteoblast and can bind to the calcium that participates in the mineralization process (Viola et al., 2012).

All materials had immunostaining for osteocalcin and presented structures positive to von Kossa staining with calcium deposits in the adjacent capsules in all periods, except AHP. AHP exhibited von Kossa positivity because of this material release of calcium (Borges et al., 2012; Silva et al., 2020). However, AHP did not show positive marking for osteocalcin at any period, suggesting no bioactivity, in agreement with previous studies (Silva et al., 2020). Additional analysis by scanning electron microscope (SEM) of dentin tubes implanted in the subcutaneous tissue of rats can confirm the bioactive potential in vivo, verifying the formation of a mineral interfacial layer between the cement and the dentin wall of the tube (Dreger et al., 2012; Reyes-Carmona et al., 2010).

Bioceramics materials can release calcium and hydroxyl ions, helping the process of tissue healing and mineralization (Giraud et al., 2019). However, the reaction of calcium ions and carbon dioxide leads to calcite crystals, which are birefringent. The bioceramics sealers showed birefringent structures in all periods. BC, SP, and TF presented biocompatibility in the present study because they induced a mild inflammatory reaction compared to AHP. Moreover, all bioceramic sealers show bioactivity exhibiting osteocalcin-immunopositive cells and positive structures to von Kossa staining in the capsules.

Tridimensional sealing is essential to long-term success in endodontic treatment (Celikten et al., 2019). Root canal sealers with low porosity are desirable to provide a long-term seal and prevent microbial and fluid leakage (Camilleri et al., 2014). Solubility and porosity may be associated (Gandolfi et al., 2015). The porosity may reduce the materials' hardness and strength (Dieter, 1988), affecting the root canal sealers' stability, integrity, and durability (Mutal & Gani, 2005; Torres et al., 2019).

AH Plus exhibited low porosity, which may be attributed to the strong cross-links in epoxy resin-based materials (Viapiana et al., 2014). A higher porosity of the bioceramic sealers was detected in this study, which a greater solubility may correlate compared to AH Plus (Torres et al., 2020; Zordan-Bronzel et al., 2019a). Bio-C Sealer exhibited the highest porosity, which may be explained by a greater solubility than Sealer Plus BC and TotalFill BC (Torres et al., 2020).

The quality of the root canal filling can be affected by voids inside and the surface between the material and the dentin (Huang et al., 2017). Therefore, root canal sealers should not have a high percentage of voids (Gandolfi et al., 2016). A similar percentage of voids were observed for the sealers, which may be correlated with the high viscosity and small particle size of these sealers (Celikten et al., 2016; Huang et al., 2018). Our findings corroborate with previous studies, which compared bioceramics sealers with AH Plus, and no difference among them was observed (Torres et al., 2020).

Conclusion

Using the dentin tube implant model, at the end of this study, Bio-C Sealer, Sealer Plus BC, and TotalFill BC had adequate biological properties since they induced less inflammatory response and exhibited bioactive potential. However, they showed a greater porosity. On the other hand, AHP produced higher inflammatory reaction and is not bioactive.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest

Reference

- Benetti, F., Azevedo Queiroz, Í.O., Oliveira, P.H.C., et al. (2019) Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. *Brazilian Oral Research*, **33**, 1–9.
- Bohner, M., Lemaitre, J. (2009) Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials*, **30**, 281–312.
- Bonewald, L.F., Harris, S.E., Rosser, J., et al. (2003) Von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcified Tissue International*, **72**, 537–547.
- Borges, R.P., Sousa-Neto, M.D., Versiani, M.A., et al. (2012) Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *International Endodontic Journal*, **45**, 419–428.
- Bósio, C.C., Felipe, G.S., Bortoluzzi, E.A., Felipe, M.C.S., Felipe, W.T., Rivero, E.R.C. (2014) Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. *International Endodontic Journal*, **47**, 667–674.
- Camilleri, J., Grech, L., Galea, K., et al. (2014) Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. *Clinical Oral Investigations*, **18**, 1437–1446.
- Campi, L.B. (2020) Physico-chemical and biological characteristics of new bioceramic repair materials and cements based on tricalcium silicate doped with fluoride ions (PhD Thesis). Araraquara, SP: São Paulo State University, School of Dentistry.
- Celikten, B., Jacobs, R., Faria, K.V., Huang, Y., et al. (2019) Comparative evaluation of cone beam CT and micro-CT on blooming artifacts in human teeth filled with bioceramic sealers. *Clinical Oral Investigations*, **23**, 3267–3273.
- Celikten, B., Uzuntas, C.F., Orhan, A.I., et al. (2016) Evaluation of root canal sealer filling quality using a single-cone technique in oval shaped canals: An *In vitro* Micro-CT study. *Scanning*, **38**, 133–140.
- Dieter, G. (1988) *Elements of the theory of plasticity*. In: Dieter G, ed. Mechanical metallurgy; pp.69-102. London, UK: McGraw Hill.
- Donnermeyer, D., Bürklein, S., Dammaschke, T., Schäfer, E. (2019) Endodontic sealers based on calcium silicates: a systematic review. *Odontology*, **107**, 421-436.
- Dreger, L.A.S., Felipe, W.T., Reyes-Carmona, J.F., Felipe, G.S., Bortoluzzi, E.A., Felipe, M.C.S. (2012) Mineral Trioxide Aggregate and Portland Cement Promote Biomineralization In Vivo. *Journal of Endodontics*, **38**, 324-329.
- Fonseca, T.S., Silva, G.F., Tanomaru-Filho, M., et al. (2016) In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *International Endodontic Journal*, **49**, 145–153.

Gandolfi, M.G., Parrilli, A.P., Fini, M., Prati, C., Dummer, P.M.H. (2013) 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with Thermafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. *International Endodontic Journal*, **46**, 253–263.

Gandolfi, M.G., Siboni, F., Prati, C. (2016) Properties of a novel polysiloxane-guttapercha calcium silicate-bioglass-containing root canal sealer. *Dental Materials*, **32**, e113–e126.

Gandolfi, M.G., Spagnuolo, G., Siboni, F., et al. (2015) Calcium silicate/calcium phosphate biphasic cements for vital pulp therapy: chemical-physical properties and human pulp cells response. *Clinical Oral Investigations*, **19**, 2075–2089.

Garrido, A.D.B., Lia, R.C.C., França, S.C., Silva, J.F., Astolfi-Filho, S., Sousa-Neto, M.D. (2010) Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copafiera multijuga oil-resin. *International Endodontic Journal*, **43**, 283–291.

Giraud, T., Jeanneau, C., Rombouts, C., Bakhtiar, H., Laurent, P., About, I. (2019) Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. *Dental Materials*, **35**, 24–35.

Holland, R., Souza, V., Nery, M.J., Otoboni-Filho, J.A., Bernabé, P.F.E., Dezan, E. (1999) Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*, **25**, 161–166.

Huang, Y., Celikten, B., Faria, K.V., et al. (2017) Micro-CT and nano-CT analysis of filling quality of three different endodontic sealers. *Dentomaxillofacial Radiology*, **46**, 20170223.

Huang, Y., Orhan, K., Celikten, B., Orhan, A.I., Tufenkci, P., Sevimay, S. (2018) Evaluation of the sealing ability of different root canal sealers: a combined SEM and micro-CT study. *Journal of Applied Oral Science*, **26**, e20160584.

International Organization for Standardization (2016) *ISO 10993-6: Biological Evaluation of Medical Devices Part 6: Testes for Local Effects after Implantation*, pp 1–29.

López-García, S., Pecci-Lloret, M.R., Guerrero-Gironés, J., et al. (2019) Comparative cytocompatibility and mineralization potential of Bio-C Sealer and TotalFill BC Sealer. *Materials*, **12**, 3087.

Mutal, L., Gani, O. (2005) Presence of pores and vacuoles in set endodontic sealers. *International Endodontic Journal*, **38**, 690–696.

Reyes-Carmona, J.F., Felipe, M.S., Felipe, W.T. (2009) Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *Journal of Endodontics*, **35**, 731–736.

Reyes-Carmona, J.F., Santos, A.S., Figueiredo, C.P., et al. (2010) Host-mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. *Journal of Endodontics*, **36**, 1347–1353.

Shenoy, A., Shenoy, N. (2010) Dental ceramics: An update. *Journal of Conservative Dentistry*, **13**, 195.

- Silva, L.H.A., Moraes, R.R., Morgental, R.D., Pappen, F.G. (2017) Are premixed calcium silicate-based endodontic sealers comparable to conventional materials? A systematic review of in vitro studies. *Journal of Endodontics*, **43**, 527–535.
- Silva, E.C.A., Tanomaru-Filho, M., Silva, G.F., Delfino, M.M., Cerri, P.S., Guerreiro-Tanomaru, J.M. (2020) Biocompatibility and bioactive potential of new calcium silicate-based endodontic sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *Journal of Endodontics*, **46**, 1470–1477.
- Silva, E.C.A., Tanomaru-Filho, M., Silva, G.F., Lopes, C.S., Cerri, P.S., Guerreiro Tanomaru, J.M. (2021) Evaluation of the biological properties of two experimental calcium silicate sealers: an *in vivo* study in rats. *International Endodontic Journal*, **54**, 100–111.
- Silva, G.F., Bosso-Martelo, R., Ferino, R.V., et al. (2014) Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: Evaluation of physicochemical and biological properties. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, **102**, 4336–4345.
- Silva, G.F., Tanomaru-Filho, M., Bernardi, M.I.B., Guerreiro-Tanomaru, J.M., Cerri, P.S. (2015) Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clinical Oral Investigations*, **19**, 2015–2025.
- Tanomaru-Filho, M., Torres, F.F.E., Chávez-Andrade, G.M., et al. (2017) Physicochemical properties and volumetric change of silicone/bioactive glass and calcium silicate-based endodontic sealers. *Journal of Endodontics*, **43**, 2097–2101.
- Torres, F.F.E., Guerreiro-Tanomaru, J.M., Bosso-Martelo, R., Chavez-Andrade, G.M., Tanomaru-Filho, M. (2018) Solubility, porosity and fluid uptake of calcium silicate-based cements. *Journal of Applied Oral Science*, **26**, e20170565.
- Torres, F.F.E., Guerreiro-Tanomaru, J.M., Bosso-Martelo, R., Espir, C.G., Camilleri, J., Tanomaru-Filho, M. (2019) Solubility, porosity, dimensional and volumetric change of endodontic sealers. *Brazilian Dental Journal*, **30**, 368–373.
- Torres, F.F.E., Pinto, J.C., Figueira, G.O., Guerreiro-Tanomaru, J.M., Tanomaru-Filho, M. (2021) A micro-computed tomographic study using a novel test model to assess the filling ability and volumetric changes of bioceramic root repair materials. *Restorative Dentistry & Endodontics*, **46**, 1–8.
- Torres, F.F.E., Zordan-Bronzel, C.L., Guerreiro-Tanomaru, J.M., Chávez-Andrade, G.M., Pinto, J.C., Tanomaru-Filho, M. (2020) Effect of immersion in distilled water or phosphate-buffered saline on the solubility, volumetric change and presence of voids within new calcium silicate-based root canal sealers. *International Endodontic Journal*, **53**, 385–391.
- Urban, K., Neuhaus, J., Donnermeyer, D., Schäfer, E., Dammaschke, T. (2018) Solubility and pH value of 3 different root canal sealers: a long-term investigation. *Journal of Endodontics*, **44**, 1736–1740.
- Viapiana, R., Flumignan, D.L., Guerreiro-Tanomaru, J.M., Camilleri, J., Tanomaru-Filho, M. (2014) Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *International Endodontic Journal*, **47**, 437–448.

Viola, N.V., Guerreiro-Tanomaru, J.M., Silva, G.F., Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho, M., Cerri, P.S. (2012) Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: Quantitative and immunohistochemical evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, **100 B**, 1773–1781.

Wataha, J.C. (2001) Principles of biocompatibility for dental practitioners. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, **86**, 203–209.

Zhou, H.M., Du T.F., Shen, Y., Wang, Z.J., Zheng, Y.F, Haapasalo, M. (2015) In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. *Journal of Endodontics*, **41**, 56–61.

Zordan-Bronzel, C.L., Torres, F.F.E., Tanomaru-Filho, M., Chávez-Andrade, G.M., Bosso-Martelo, R., Guerreiro-Tanomaru, J.M. (2019a) Evaluation of physicochemical properties of a new calcium silicate-based sealer, Bio-C Sealer. *Journal of Endodontics*, **45**, 1248–1252.

Zordan-Bronzel, C.L., Tanomaru-Filho, M., Rodrigues, E.M., Chávez-Andrade, G.M., Faria, G., Guerreiro-Tanomaru, J.M. (2019b) Cytocompatibility, bioactive potential and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *International Endodontic Journal* **52**, 979–986.

3.2 Publicação 2*

Biocompatibility, bioactive potential, porosity, and interface analysis of root repair calcium silicate cements in a dentin tube model

Abstract

Introduction: Bio-C Repair (BIOC-R) and MTA Repair HP (MTAHP) are root repair calcium silicate cements. The aim of this study was to evaluate biocompatibility bioactivity, porosity, and interface dentin/material of BIOC-R, MTAHP and ZOE Intermediate Restorative Material (IRM) using the dentin tubes model. **Methods:** Dentin tubes filled with materials and empty tubes (control group; CG) were implanted in the subcutaneous tissue of rats for 7, 15, 30, and 60 days. Thickness of capsules, number of inflammatory cells (ICs), immunopositive cells to interleukin-6 (IL-6), osteocalcin (OCN), and von Kossa (calcium deposits) were evaluated. Porosity and interface dentin/material were analyzed using microcomputed tomography (Micro-CT). Data were submitted to ANOVA and Tukey tests ($p < 0.05$). **Results:** IRM capsules showed higher thickness, ICs, and IL-6-immunopositive cells at 7 and 15 days ($p < 0.05$). BIOC-R capsules exhibited higher thickness and ICs than MTAHP at 7 days ($p < 0.05$) and higher IL-6-immunopositive cells at 7 and 15 days ($p < 0.05$). At 30 and 60 days, no significant differences in number of ICs, thickness of the capsule, and number of IL-6-immunopositive cells were observed among the groups ($p > 0.05$). OCN-immunopositive cells, von Kossa-positive, and birefringent structures were only observed in BIOC-R and MTAHP. BIOC-R and IRM presented low porosity, gaps and voids ($p > 0.05$). MTAHP exhibited higher porosity, gaps and voids ($p < 0.05$). **Conclusions:** BIOC-R, MTAHP and IRM are biocompatible materials. However, only BIOC-R and MTAHP have bioactive potential. MTAHP presented the higher porosity and presence of gaps and voids. Bio-C Repair demonstrates properties suitable for use as a root repair cement.

Keywords: Calcium silicate, biocompatibility, root repair materials, x-ray microtomography.

* Artigo nas normas do periódico *Journal of Endodontic* para o qual foi submetido.

Introduction

New calcium-silicate cements are proposed, including ready-to-use materials. Biocompatibility studies in rats are recommended by ISO 10993-6¹ using polyethylene tubes filled with materials²⁻⁴. However, ready-to-use calcium silicate cements present a setting reaction with the moisture of dentin and show interaction with dentinal tubules. Thus, polyethylene tubes present limitations for studies with calcium silicate cements due to the absence of interactions between dentin/material⁵⁻⁷. Therefore, dentine tubes may be more appropriate to evaluate the bioactive potential of calcium silicate materials⁷.

BIO-C Repair (Angelus® Indústria de Produtos Odontológicas S / A, Londrina, Brazil) is a ready-to-use calcium silicate repair cement, presenting similar cytocompatibility and biocompatibility to White MTA^{4,8}, and low volumetric change⁹. MTA repair HP (MTAHP; Angelus® Indústria de Produtos Odontológicas S/A, Londrina, Brazil) is a calcium silicate cement that presents biocompatibility and mineralization ability similar to MTA Angelus¹⁰. MTAHP has adequate setting time, radiopacity, solubility, and alkalization capacity¹¹. However, there are no studies evaluating biocompatibility and bioactivity of these cements on subcutaneous rats using the dentin tube model.

Additionally, an ideal root repair material should have low porosity and presence of voids and gaps in the interface dentine/material. Porosity can affect material behavior and sealing ability over time¹². Micro-computed tomography (Micro-CT) can be used to measure porosity¹³ and to evaluate the interface between the dentin wall and the cement making it possible to obtain the percentage of gaps and voids^{9,14}.

Therefore, this study aimed to evaluate biocompatibility, bioactive potential porosity, and interface of two calcium silicate and a zinc oxide and eugenol cement using dentine tubes filled with the materials. The null hypothesis was that the cements have a similar inflammatory response, bioactive potential, porosity, and presence of gaps and voids.

Material and methods

The study was approved by the Ethical Committee for Animal Research (# 04/2019) and Ethical Committee for Human Research of the University (#12647319.8.0000.5416).

Dentin tubes

Single-rooted human teeth were obtained and root canals were used to prepare dentin tubes, measuring approximately 5 mm in length and 1.3 mm internal diameter, after preparation using #5 Gates Glidden. Specimens were irrigated with 17% EDTA, sodium hypochlorite 1%, and distilled water. After the cleaning protocol, the dentin tubes were autoclaved and filled with the repair materials (Table 1).

Table 1- Repair materials, chemical composition, manufacturer, and proportions

Repair materials	Composition	Manufacturers	Proportion
Bio-C Repair (BIOC-R)	Calcium silicates, calcium aluminate, calcium oxide, zirconium oxide, iron oxide, silicon dioxide, and dispersing agent.	Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brazil	Ready-to-use
MTA Repair HP (MTAHP)	Powder: Tricalcium silicate, dicalcium silicate, tricalcium aluminate, calcium oxide, and calcium tungstate. Liquid: water and plasticizer.	Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brazil	1.2 g: 0.5 mL (powder/ liquid)
Intermediate restorative material (IRM)	Powder: Zinc Oxide, Poly Methacrylate Liquid: Eugenol Acetic Acid 0.5%	Methyl Dentsply DeTrey 99.5%, GmbH, Konstanz, Germany	1 g: 0.2 mL (powder/ liquid)

Animals

Holtzman rats (*Rattus norvegicus albinus*) were housed in an environment with a 12:12 light-dark cycle and controlled temperature ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity ($55 \pm 10\%$), and access to food and water *ad libitum*. The animals were distributed into four groups (n=6): BIOC-R, MTAHP, IRM, and the control group (empty tubes). The animals were anesthetized intraperitoneally with ketamine hydrochloride (80 mg kg^{-1} body weight, Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, Brazil) and xylazine hydrochloride (8 mg kg^{-1} body weight; União Química-Farmacêutica Nacional S/A, Brazil) and disinfected with 5% iodine solution. The materials were inserted into the dentine tubes and implanted in the dorsal subcutaneous pocket created. In each animal, four tubes were implanted (one tube of each group). The animals were euthanized with anesthetic overdose, and the implants with adjacent tissues were removed after 7, 15, 30, and 60 days.

Histological Procedures

After removal, the specimens were immersed for 72 hours in 4% formaldehyde buffered with 0.1 M sodium phosphate (pH 7.2). Subsequently, the specimens were processed and embedded in paraffin. Non-serial longitudinal sections (6 μ m-thick) were stained with hematoxylin-eosin (HE) to estimate the number of inflammatory cells and measure the capsule thickness. The thickness of capsules was measured in three non-serial HE-stained sections per specimen, as previously described⁴. The number of inflammatory cells (ICs) was obtained from three HE-stained sections per specimen in the standardized field²⁻⁴. The analyses were performed using a light microscope (BX-51; Olympus, Tokyo, Japan) with a camera (DP- 71; Olympus) and an image analysis program (Image-Pro Express 6.0 program, Olympus).

Immunohistochemical detection of IL-6 and OCN

For detection of IL-6, the sections were incubated with mouse monoclonal anti-IL-6 antibody (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA; code: ab9324; 1:100) and rabbit anti-OCN antibody (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA; code: SAB 1306277 -40TST; 1:500).

Antigen recovery was performed in heated sodium citrate buffer for 30 min at 94-98 °C. Afterward, the sections were immersed in 5% aqueous hydrogen peroxide to inactive the endogenous peroxidase and were incubated with 2% bovine serum albumin for 30 min. The sections were incubated overnight in a humid chamber at 4°C with anti-IL-6 or anti-OCN antibodies. After washings, the sections were incubated with labelled polymer-HRP (EnVision + Dual Link System-HRP, Dako Inc., Carpinteria, CA, USA; code: K4061); the reactions were revealed with chromogen 3,3'-diaminobenzidine and counterstained with hematoxylin. The number of IL-6- and OCN-immunolabelled cells were counted in standardized fields (at x40 magnification), as previously described²⁻⁴.

von Kossa reaction and analysis of birefringent structures

To detect the calcium deposits in the capsules, the sections were subjected to the von Kossa method, as previously described^{2,3,15-17}. Briefly, the sections were immersed in a 5% silver nitrate solution for 1 hour. After washing, the sections were immersed in 5% sodium hyposulfite solution and stained with picosirius-red.

The birefringent structures in the capsules were evaluated from unstained sections analyzed under polarized illumination²⁻⁴.

Micro-CT analysis

The dentine tubes (n=6) were removed from the subcutaneous rats, and the porosity and dentin-material interface were evaluated in the micro-CT. All groups were assessed compared to the baseline, which the materials were manipulated according to the manufacturers, filled into the dentin tubes, and stored for 48 hours at 37 °C and 95% humidity for a complete set.

Porosity

Samples were assessed by micro-CT (SkyScan 1176), using as parameters: voltage 80 kV, 313 μ A current, pixel size 9 μ m, and 360° rotation with a Cu + Al filter. The porosity of the material was calculated in mm³ and percentage. Reconstruction of the images was performed using NRecon software (V1.6.4,7; Bruker-MicroCT). Each material had the correction parameters for smoothing, beam hardening, and ring artifacts defined. CTAn software (V1.11.8; Bruker-MicroCT) was used to analyze the images. Porosity values for each material and period were evaluated compared with the baseline. A 3D model of the filled cavities was obtained by the CTAn software and visualized and saved using the CTVol program (V2.0; Bruker-MicroCT)⁹.

Dentine-material interface

The 3D distribution of the interface voids in a predefined volume of interest (VOI) was calculated for each group and compared with the baseline. Each 3D VOI was a 40-micron-thick interface volume consisting of the superficial 20 microns of the canal wall dentine and the first 20 microns of the filling material. Thus, voids with a size of 5 μ m inside the VOI were detected by the threshold gray level. 3D models of the voids were created using CTAn software (V1.15.4.0; Bruker-MicroCT, Kontich, Belgium)^{14,18}.

Statistical analysis

All data were statistically analyzed by GraphPad Prism 5 software (Jandel Scientific, Sausalito, CA, USA). The data were submitted to ANOVA followed by the Tukey test. The significance level accepted was $p \leq 0.05$.

Results

HE-stained sections

The photomicrographs showing the capsule thickness of all specimens and periods are presented in Figure 1A-1P. At 7 days, all specimens were surrounded by thick capsules (Fig 1A-1D). However, an intense inflammatory infiltrate was present in the IRM specimens (Fig 1C-1G) that had, at 7 and 15 days, thicker capsules than in other groups (Table 2). BIOC-R and MTAHP specimens had no significant difference at 15 days ($p > 0.05$). At 30 and 60 days, no significant differences were detected in the thickness of capsules among the groups (Table 2).

The photomicrographs showing the inflammatory reaction induced by materials in the connective tissue are presented in Figure 1Q-1X. The highest values of ICs were observed in the IRM specimens ($p < .0001$) at 7 and 15 days (Table 2). At 7 days, the number of ICs was significantly greater in BIOC-R than in MTAHP specimens (Figs. 1Q-1R; Table 2), while, at 15 days, no significant difference ($p > 0.05$) was observed between these groups (Table 2). At 30 and 60 days, had no significant difference in the number of ICs ($p > 0.05$) among BIOC-R, MTAHP, IRM, and CG specimens (Table 2). At 60 days, the capsules showed several fibroblasts and few inflammatory cells (Figs. 1U-1X). A significant reduction in the number of ICs was found in all groups over time (Table 2).

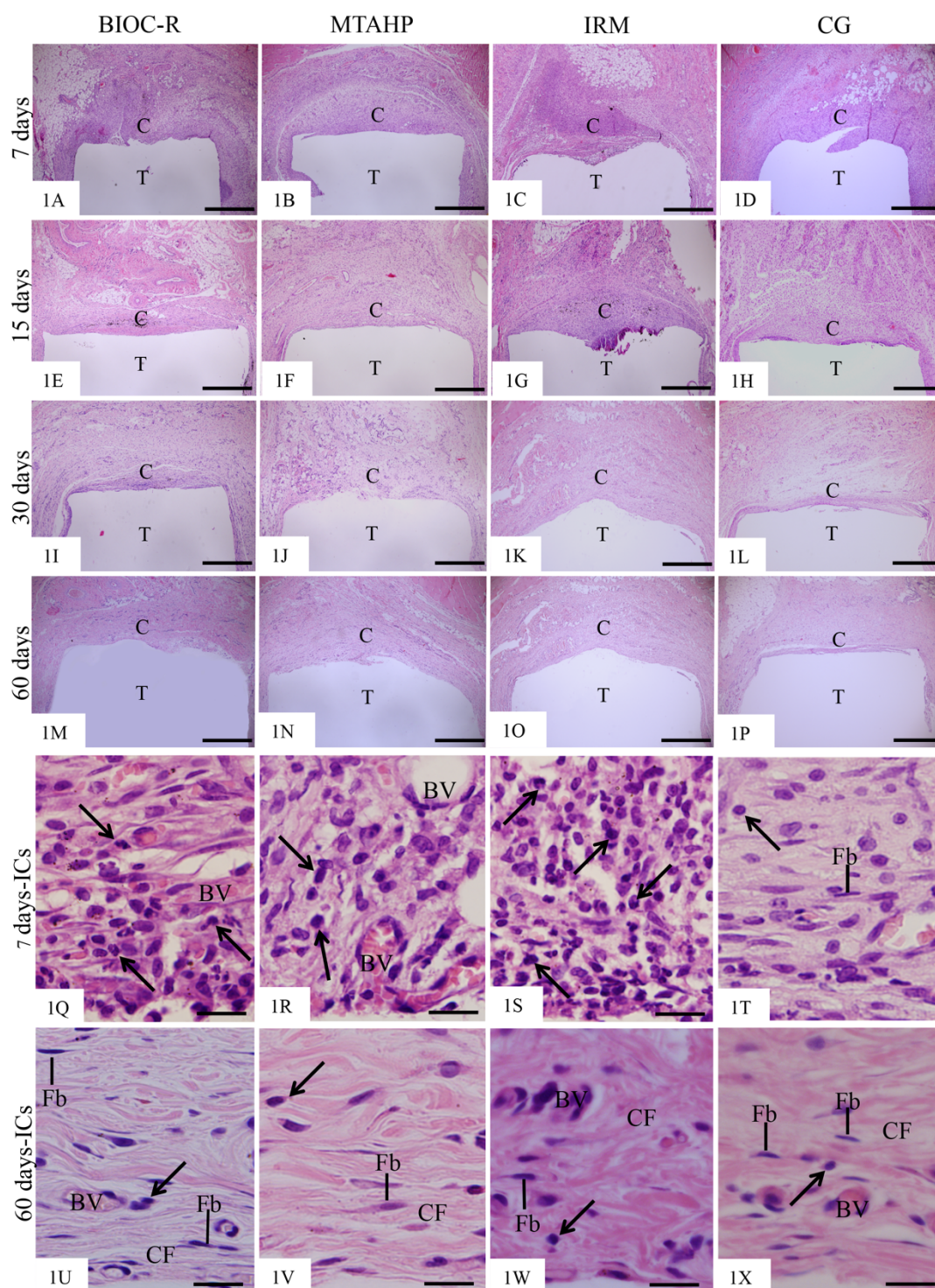


Figure 1A-1P- Photomicrographs of sections showing capsules (C) adjacent to the dentin tubes (T). Figs. 1A-1P – overview of the capsules (C) after 7 (Figs. 1A-1D), 15 (Figs. 1E-1H), 30 (Figs. 1I-1L) and 60 (Figs. 1M-1P) days to the implants. HE. Bar = 900 μ m.

Figure 1Q-1X- Photomicrographs of sections showing capsules adjacent to the tubes implanted in the subcutaneous tissue, at 7 (Figs. 1Q-1T) and 60 (1U-1X) days. Figs. 1Q-1T: Capsules contain inflammatory cells (arrows), mainly lymphocytes, plasma cells, and macrophages. Note that the capsule adjacent to the IRM (Fig. 1S) shows an apparent predominance of inflammatory cells (arrows). BV, blood vessels. Figs. 1U-1X: capsules show typical fibroblasts (Fb) between bundles of collagen fibers (CF); few inflammatory cells (arrows) are seen in the capsules. HE. Bar = 13 μ m

Table 2 - Capsule thickness (μm), number of inflammatory cells (IC) per mm^2 , number of IL-6-immunopositive cells (IL-6), and number of OCN-immunolabelled cells per mm^2 (OCN) in Bio-C Repair, MTA repair HP, IRM and Control after 7, 15, 30, and 60 days. Mean (standard deviation).

Materials				
	Bio-C Repair	MTA repair HP	IRM	Control
Periods				
7 days				
Thickness	499 $\pm$ 36 ^{b,1}	450 $\pm$ 29 ^{c,1}	550 $\pm$ 10 ^{a,1}	360 $\pm$ 38 ^{d,1}
ICs	545 $\pm$ 55 ^{b,1}	417 $\pm$ 56 ^{c,1}	626 $\pm$ 44 ^{a,1}	301 $\pm$ 56 ^{d,1}
IL-6	422 $\pm$ 13 ^{b,1}	333 $\pm$ 14 ^{c,1}	802 $\pm$ 21 ^{a,1}	217 $\pm$ 23 ^{d,1}
OCN	20 $\pm$ 8 ^{a,1}	28 $\pm$ 6 ^{a,1}	-	-
15 days				
Thickness	332 $\pm$ 35 ^{b,2}	308 $\pm$ 24 ^{b,2}	468 $\pm$ 13 ^{a,2}	250 $\pm$ 25 ^{c,2}
ICs	379 $\pm$ 14 ^{b,2}	331 $\pm$ 40 ^{b,2}	494 $\pm$ 29 ^{a,2}	243 $\pm$ 20 ^{c,2}
IL-6	248 $\pm$ 15 ^{b,2}	219 $\pm$ 18 ^{c,2}	613 $\pm$ 28 ^{a,2}	135 $\pm$ 12 ^{d,2}
OCN	35 $\pm$ 8 ^{a,2}	28 $\pm$ 6 ^{a,1}	-	-
30 days				
Thickness	174 $\pm$ 23 ^{a,2}	168 $\pm$ 11 ^{a,3}	176 $\pm$ 5 ^{a,3}	153 $\pm$ 8 ^{a,3}
ICs	211 $\pm$ 25 ^{a,3}	199 $\pm$ 20 ^{a,3}	181 $\pm$ 27 ^{a,3}	164 $\pm$ 13 ^{a,3}
IL-6	102 $\pm$ 17 ^{a,3}	109 $\pm$ 16 ^{a,3}	115 $\pm$ 12 ^{a,3}	109 $\pm$ 8 ^{a,2}
OCN	54 $\pm$ 8 ^{a,3}	50 $\pm$ 12 ^{a,2}	-	-
60 days				
Thickness	122 $\pm$ 11 ^{a,4}	121 $\pm$ 7 ^{a,4}	120 $\pm$ 14 ^{a,4}	92 $\pm$ 10 ^{a,4}
ICs	139 $\pm$ 25 ^{a,4}	113 $\pm$ 19 ^{a,4}	131 $\pm$ 15 ^{a,4}	95 $\pm$ 15 ^{a,4}
IL-6	54 $\pm$ 4 ^{a,4}	50 $\pm$ 8 ^{a,4}	76 $\pm$ 20 ^{a,4}	56 $\pm$ 9 ^{a,3}
OCN	96 $\pm$ 9 ^{a,4}	70 $\pm$ 11 ^{b,3}	-	-

Comparison between groups in the same period is indicated by superscript letters on the line.

Same letters = no statistically significant difference.

Superscript numbers indicate the comparison between periods in the same group in the columns; same numbers = no statistically significant difference.

Control= dentin tube without the materials

Tukey's test ($p \leq 0.05$)

Immunoexpression of IL-6 and OCN

The photomicrographs showing the immunoexpression of IL-6 in the capsules of all groups and time points are presented at Figure 2. At 7 and 15 days, several IL-6-immunolabelled inflammatory cells were seen in all specimens (Figs. 2A-2H), while few immunostained inflammatory cells were found after 30 and 60 days (Figs. 2I-2P). According to Table 2, at 7 and 15 days, the number of IL-6-immunolabelled cells was significantly greater in IRM specimens than in other groups ($p < 0.05$). Moreover, the immunoexpression was greater significantly in BIOCR than in MTAHP. At 30 and 60 days, no significant difference in the immunoexpression of IL-6 was observed among the groups. From 7 to 60 days, a significant reduction in the immunoexpression of IL-6 was detected in the capsules of all groups ($p < 0.05$).

The photomicrographs showing the immunoexpression of OCN in the capsules of all groups are presented in Figure 3A-3H. In all periods, OCN-immunolabelled cells were observed in BIOCR and MTAHP specimens. In contrast, no OCN-immunolabelled cell was seen in the IRM and GC groups (Figs. 3A-3B; 3E-3F). According to Table 2, no significant difference in the number of OCN-immunolabelled cells was detected between BIOCR and MTAHP specimens at 7, 15, and 30 days. At 60 days, the immunoexpression of OCN was significantly greater in BIOCR than in MTAHP specimens. From 7 to 60 days, an increase in the immunoexpression of OCN was detected in BIOCR and MTAHP specimens ($p < 0.05$).

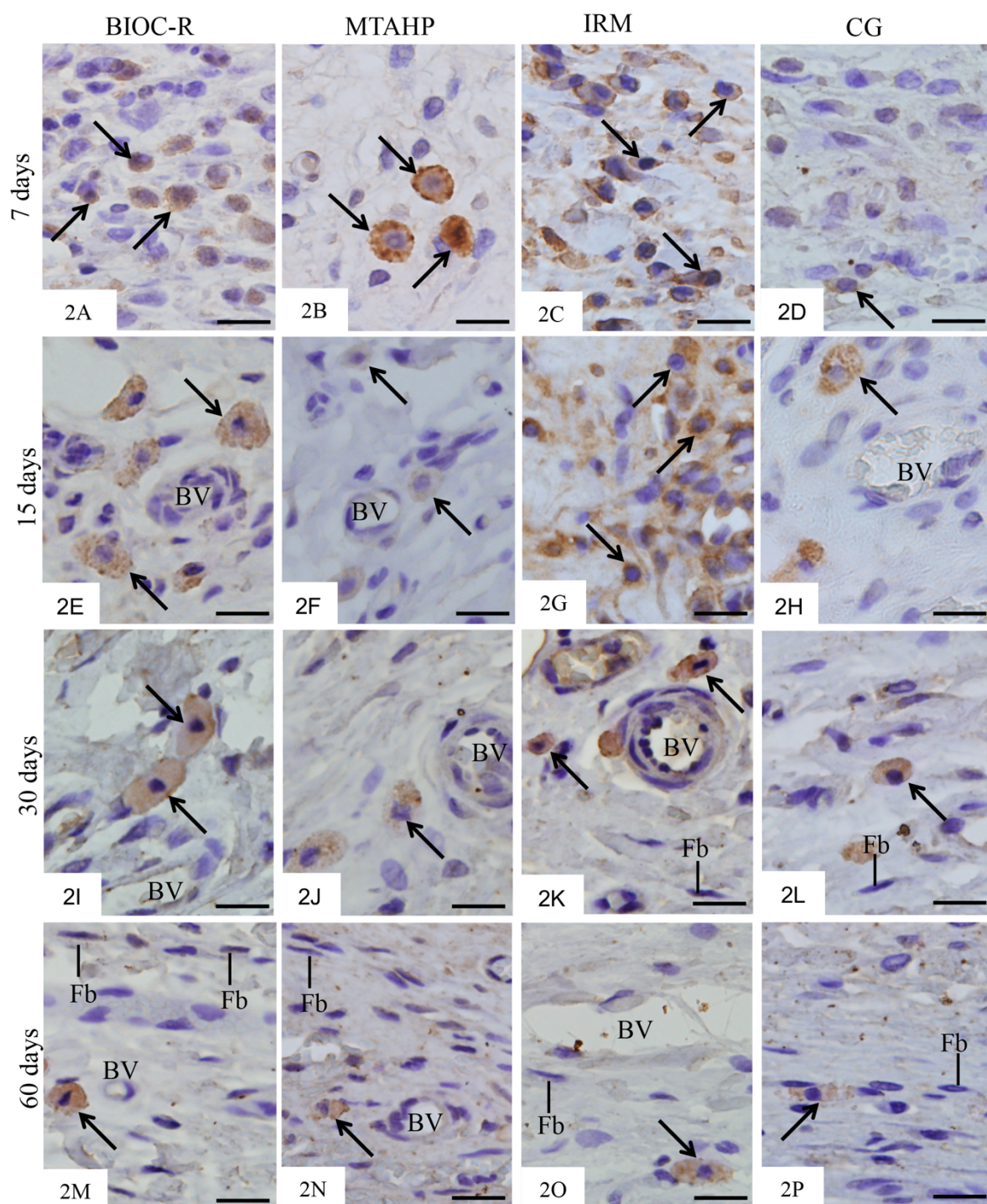


Figure 2 - Photomicrographs of sections showing capsules at 7 (Figs. 2A-2D), 15 (2E-2H), 30 (2I-2L) and 60 (Figs. 2M-2P) days. The sections were subjected to immunohistochemistry for detection of IL-6 (in brown-yellow color) and counterstained with hematoxylin. Several immunolabelled inflammatory cells (arrows) are seen in the capsules, at 7 and 15 days (2A-2H). Figs 2I-2P (30 and 60 days) - few immunostained inflammatory cells (arrows) are present in the capsules. Fb, immunostained fibroblasts. Bar= 13 μm

von Kossa reaction and birefringent structures

In all periods, the capsules of BIOCR and MTAHP exhibited von Kossa-positive structures (Figs. 3I-3L) and birefringent structures (Figs. 3M-3P). In IRM and CG groups, no von Kossa-positive and birefringent structures were present in the capsules (data not shown).

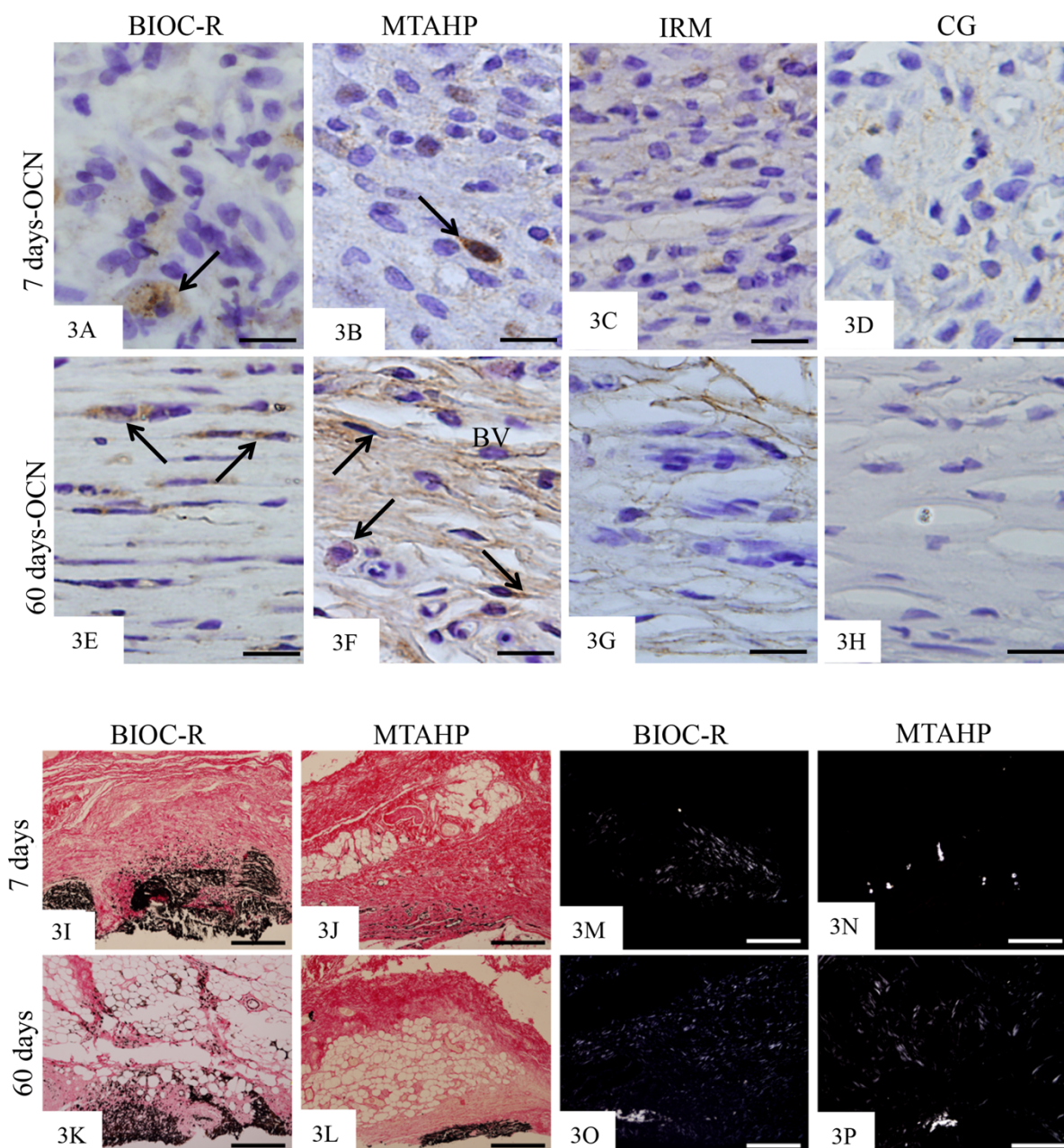


Figure 3A-3H - Photomicrographs of sections showing capsules adjacent to the tubes implanted in the subcutaneous tissue for 7 (Figs. 3A-3D) and 60 (Figs. 3E-3H) days. The sections were subjected to immunohistochemistry for detection of osteocalcin (brown-yellow color) and counterstained with hematoxylin. The capsules of BIOCR and MTAHP groups contain immunolabelled fusiform/elliptical cells (arrows). In capsules of IRM and CG specimens, no immunolabelled cells are observed (Fig. 3G and 3H). Bar= 13 µm
Figure 3I-3P - Photomicrographs showing sections submitted to von Kossa reaction and counterstained with picrosirius-red. The capsules of the Bio-C Repair and MTA repair HP exhibit positive structures to von Kossa method (black/brown color) at 7(Figs 3I-3J) and 60 (3K-3L) days. Figs. 3M-3P – unstained sections analyzed under polarized illumination. Birefringent deposits are present in the capsules adjacent to the materials. Bar = 285 µm

Porosity

As shown in Table 3, the porosity values increased at 60 days compared with the baseline ($p < 0.05$). MTAHP showed the highest porosity at 30 and 60 days ($p < 0.05$). Bio-C Repair and IRM exhibited similar porosity values in all periods ($p > 0.05$). The 3D models created in the CTVox program with the different materials are presented in Figure 4.

Dentine-material interface

The Table 3 shows the interface analysis of the cements. All groups showed higher values in the percentage of voids at 60 days compared to the baseline ($p < 0.05$). MTAHP showed the highest porosity ($p < 0.05$), except at baseline. Bio-C Repair and IRM exhibited a similar percentage of voids in all-time points ($p > 0.05$). Images captured from CTAn software are presented in Figure 4.

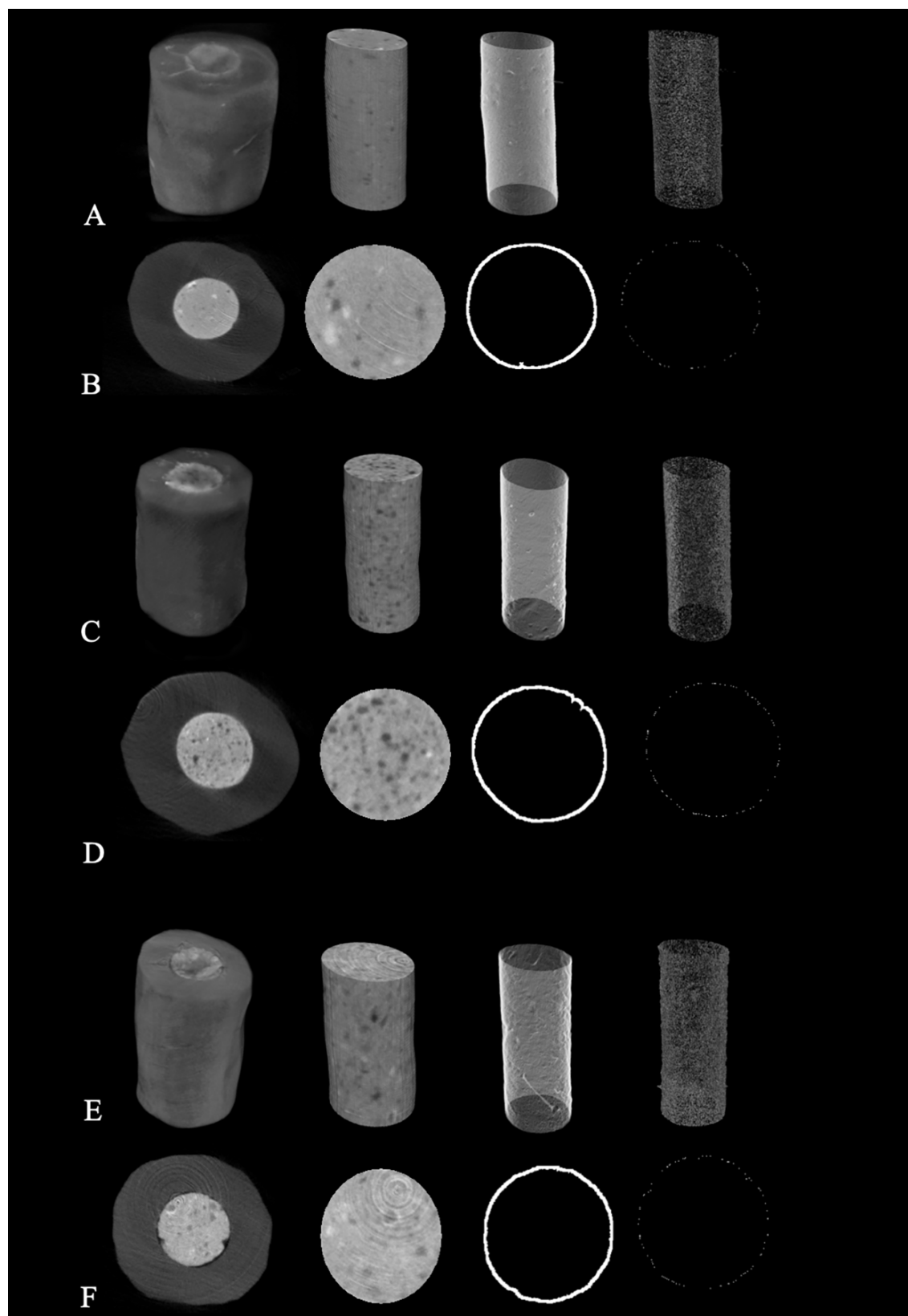


Figure 4 - 3D models created with the CTVox program, representing the porosity of (A) Bio-C Repair, (C) MTA repair HP, and (E) IRM. Microtomographic images captured with the CTAn program, representing of the presence of voids and gaps in the interface dentin/material of (B) Bio-C Repair, (D) MTA repair HP and (F) IRM.

Table 3 - Porosity and interface (voids) in the different time intervals (mean and standard deviation) observed in evaluated materials.

Materials				
Period		Bio-C Repair	MTA repair HP	IRM
Porosity (%)				
Baseline		0.83 ($\pm$ 0.18) ^{C, a}	0.98 ($\pm$ 0.97) ^{D, a}	0.83 ($\pm$ 0.12) ^{C, a}
7 days		0.93 ($\pm$ 0.15) ^{C, a}	0.97 ($\pm$ 0.15) ^{D, a}	0.81 ($\pm$ 0.31) ^{C, a}
15 days		1.97 ($\pm$ 0.81) ^{B, a}	2.33 ($\pm$ 0.63) ^{C, a}	1.92 ($\pm$ 0.19) ^{B, a}
30 days		2.96 ($\pm$ 0.39) ^{A, b}	3.97($\pm$ 0.43) ^{B, a}	2.30 ($\pm$ 0.13) ^{B, b}
60 days		3.45 ($\pm$ 0.27) ^{A, b}	5.20 ($\pm$ 0.21) ^{A, a}	3.3 ($\pm$ 0.31) ^{A, b}
Interface (%)				
Baseline		1.46 ($\pm$ 0.39) ^{B, a}	1.55 ($\pm$ 0.17) ^{C, a}	1.51 ($\pm$ 0.12) ^{C, a}
7 days		1.61 ($\pm$ 0.55) ^{B, b}	2.71 ($\pm$ 0.82) ^{C, a}	0.92 ($\pm$ 0.28) ^{C, b}
15 days		1.78 ($\pm$ 0.06) ^{B, b}	2.42 ($\pm$ 0.37) ^{C, a}	1.37 ($\pm$ 0.48) ^{C, b}
30 days		2.24 ($\pm$ 0.77) ^{B, b}	4.30 ($\pm$ 1.00) ^{B, a}	2.52 ($\pm$ 0.69) ^{B, b}
60 days		3.85 ($\pm$ 1.07) ^{A, b}	6.22 ($\pm$ 1.16) ^{A, a}	3.82 ($\pm$ 0.56) ^{A, b}

ABC Different capital letter in the same column indicate statistically significant difference among the periods ($p < 0.05$).

abcd Different lower case letters on the same row indicate statistically significant difference among the sealers ($p < 0.05$).

Baseline= sealers after complete setting (37 ± 1 °C, $95 \pm 5\%$ relative humidity)

Discussion

The null hypothesis was rejected since BIOC-R and MTAHP initially induced a lower inflammatory reaction than IRM. Although at 60 days, all the materials had a similar inflammatory response in the subcutaneous tissue. No bioactive potential was observed in the capsules around IRM specimens. Moreover, MTAHP presented higher porosity, gaps, and voids than BIOC-R and IRM.

In the present study, dentin tubes were used to evaluate biocompatibility and bioactivity of materials since ready-to-use calcium silicate cements present setting reaction with the moisture of the dentine. Additionally, dentin tubes allow to assess the interactions between dental structure and calcium silicate materials, such as an interfacial layer with tag-like structures at the cement-dentine interface⁸.

The materials induced the formation of thick capsules with a high density of inflammatory cells, mainly lymphocytes and macrophages, and enhanced IL-6

immunoexpression at 7 days. The IL-6 is produced in response to aggressions and plays an essential role in the inflammatory response^{4, 17,18}. The CG exhibited the lowest ICs, IL-6, and capsule thickness values at 7 and 15 days and may be related to the trauma of surgical procedure^{5,6,20}.

BIOC-R had greater ICs, IL-6, and capsule thickness than MTAHP at 7 days. BIOC-R and MTAHP are calcium silicate cements, and the difference in the inflammatory reaction may be related to the difference in their chemical composition⁸. After 15 days, both materials had no difference in ICs and thickness of the capsule. However, BIOC-R and MTAHP had greater values than in CG due to the alkaline pH from calcium silicate materials^{16,19}, that stimulate the recruitment of ICs and pro-inflammatory cytokines production, such as IL-6^{4,21}. At 30 and 60 days, BIOC-R, MTAHP and CG had no difference, suggesting that materials are biocompatible.

IRM is zinc oxide and eugenol-based cement commonly used as a control for comparisons with calcium silicate cements^{9,12}. IRM presented a severe inflammatory response with the highest density of ICs, IL-6, and thick capsules at 7 and 15 days. From the 30th day, no significant difference among BIOC-R, MTAHP, IRM, and CG specimens was observed, in agreement with other studies^{22,23}. IRM shows cytotoxic effect due to the eugenol in its composition^{24,25}, which could be related to the initial inflammatory response as observed in the present study.

The bioactive potential of materials was assessed by the von Kossa method, analysis of birefringence, and OCN immunoexpression in the capsules, since the bioactivity is related to the potential of a material to stimulate mineralization tissue formation²⁶. von Kossa-positive and birefringent structures were only observed in BIOC-R and MTAHP groups, indicating the precipitation of calcium in these specimens. The capsules around these materials also exhibited immunoexpression of OCN. Considering that OCN is a glycoprotein secreted by mineralized-tissue producing cells, which can bind to the calcium during the mineralization process¹⁷, it is possible to suggest that BIOC-R and MTAHP materials present bioactive potential in the connective tissue of rat subcutaneous. In fact, studies have demonstrated that calcium silicate materials release calcium ions^{8,10}, which have an important role in tissue repair and hard tissue formation²⁷. On the other hand, no evidence of calcium precipitation or immunoexpression of OCN was observed around IRM specimens, indicating that this material does not present bioactive potential.

The presence of low porosity, gaps, and voids in the materials in contact with tissue fluids²⁸ are desirable to provide a long-term seal and prevent microbial and fluid leakage¹³, avoiding the treatment failure²⁸. Our results showed a low porosity and no significant

differences in the gaps and voids values between BIOC-R and IRM, corroborating with previous study⁹. The suitable filling capacity and the low solubility of zinc oxide and eugenol cement and BIOC-R has been reported previously²⁹, which could be related to the low porosity and interfacial adaptability of IRM¹², since solubility and porosity may be associated³⁰. The highest values in the porosity, gaps, and voids observed at 60 days in MTAHP specimens may be related to the solubility of this cement^{9,31}. Porosity can occur as a function of spaces in unhydrated cement³², affecting the stability, integrity, and durability of the materials³³.

In this study, MTAHP exhibited a higher porosity, gaps, and voids than BIOC-R and IRM. However, MTAHP and BIOC-R presented bioactive potential and biocompatibility. Since the root repair cements must have appropriate physicochemical and biological properties, BIOC-R can be suggested as an alternative root repair cement.

Conclusion

BIOC-R, MTAHP and IRM are biocompatible materials. However, only BIOC-R and MTAHP have bioactive potential. MTAHP presented a greater porosity, gaps and voids than BIOC-R. BIOC-R demonstrates properties suitable for use as a root repair cement.

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

References

1. International Organization for Standardization. *ISO 10993-6: Biological Evaluation of Medical Devices Part 6: Testes for Local Effects after Implantation*. 2016.
2. Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Lopes CS, Cerri PS, Guerreiro Tanomaru JM. Evaluation of the biological properties of two experimental calcium silicate sealers: an *in vivo* study in rats. *Int Endod J*. 2021; 54:100-111
3. Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and bioactive potential of new calcium silicate-based endodontic sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *J Endod*. 2020; 46:1470–1477.
4. Delfino MM, Abreu JLJ, Lopes CS, et al. Comparison of Bio-C Pulpo and MTA Repair HP with White MTA: effect on liver parameters and evaluation of biocompatibility and bioactivity in rats. *Int Endod J*. 2021; 54: 1597–1613.
5. Holland R, de Souza V, Nery M, et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod*. 2002; 28: 173-176.

6. Dreger LAS, Felipe TW, Reyes-Carmona JF, et al. Mineral trioxide aggregate and portland cement promote biomineralization in vivo. *J Endod.* 2012; 38: 324-329.
7. Reyes-Carmona JF., Felipe MS., Felipe WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *J Endod.* 2009; 35: 731–736.
8. Benetti F, Queiroz ÍOA, Cosme-Silva L, et al. Cytotoxicity, biocompatibility and biomineralization of a new ready-for-use bioceramic repair material. *Braz Dent J.* 2019; 30: 325-332.
9. Torres FFE, Pinto JC, Figueira GO, et al. A micro-computed tomographic study using a novel test model to assess the filling ability and volumetric changes of bioceramic root repair materials. *Restor Dent Endod.* 2021; 46: 1–8.
10. Cintra LTA, Benetti F, Queiroz ÍOA, et al. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *J Endod.* 2017; 43: 774–778.
11. Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, et al. Physicochemical, biological, and antibacterial evaluation of tricalcium silicate-based reparative cements with different radiopacifiers. *Dent Mater.* 2021; 37: 311–320.
12. Camilleri J, Grech L, Galea K, et al. Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. *Clin Oral Investig.* 2014; 18:1437–1446.
13. Torres FFE, Guerreiro-Tanomaru JM, Bosso-Martelo R, et al. Solubility, porosity and fluid uptake of calcium silicate-based cements. *J Appl Oral Sci.* 2018; 26: e20170465
14. Gandolfi MG, Parrilli AP, Fini M, et al. 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with Thermafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. *Int Endod J.* 2013; 46: 253–263.
15. Silva GF., Bosso R, Ferino RV, et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: Evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(12):4336–4345.
16. Silva GF., Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, et al. Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Investig.* 2015; 19: 2015–2025.
17. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, Silva GF, et al. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012; 100: 1773-1781.

18. Torres FFE, Zordan-Bronzel CL, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Effect of immersion in distilled water or phosphate-buffered saline on the solubility, volumetric change and presence of voids within new calcium silicate-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2020; 53: 385-391.
19. da Fonseca TS, da Silva GF, Tanomaru-Filho M, et al. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J.* 2016; 49: 145-53.
20. Holland R, de Souza V, Nery MJ., et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999; 25: 161-166.
21. Saraiva JA, da Fonseca TS, da Silva GF, et al. Reduced interleukin-6 immunoexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. *Biomed Mater.* 2018; 13: 035002.
22. Blackman R, Gross M, Seltzer S. An evaluation of the biocompatibility of a glass ionomer-silver cement in rat connective tissue. *J Endod.* 1989; 15: 76-79.
23. Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, et al. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine. *J Endod.* 2006; 32:1094-1096.
24. Meryon DS, Jakeman JK. The effects in vitro of zinc released from dental restorative materials. *Int Endod J.* 1985; 18: 191-198
25. Jeng JH, Hahn LJ, Lu EJ, et al. Eugenol triggers different pathobiological effects on human oral mucosal fibroblasts. *J Dent Res.* 1994; 73: 1050-1055.
26. Bohner M, Lemaître J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials.* 2009; 30: 281–312
27. Giraud T, Jeanneau C, Rombouts C, et al. Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. *Dent Mater.* 2019; 1: 24-35.
28. Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MAH., et al. Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2014; 47: 120-126.
29. Torres FFE, Bosso-Martelo R, Espir CG, et al. Evaluation of physicochemical properties of root-end filling materials using conventional and Micro-CT tests. *J App Oral Sci.* 2017; 25: 374–380.
30. Gandolfi MG, Siboni F, Botero T, et al. Calcium silicate and calcium hydroxide materials for pulp Capping: fiointeractivity, porosity, solubility and bioactivity of current formulations. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2015;13: 43-60.

31. Guimarães BM, Prati C, Duarte MAH, et al. Physicochemical properties of calcium silicate-based formulations MTA Repair HP and MTA Vitalcem. *J Appl Oral Sci.* 2018;26: e2017115.
32. Khalil I, Naaman A, Camilleri J. Investigation of a novel mechanically mixed mineral trioxide aggregate (MM-MTATM). *Int Endod J.* 2015; 48: 757-767.
33. Mutal L, Gani O. Presence of pores and vacuoles in set endodontic sealers. *Int Endod J.* 2005; 38: 690-696.

4 DISCUSSÃO

Este estudo realizou a avaliação de propriedades biológicas, como biocompatibilidade e potencial bioativo, e físico-químicas, tais como porosidade e interface dentina/material de materiais biocerâmicos utilizando tubos de dentina humana em subcutâneo de ratos visando maior proximidade da aplicação clínica, uma vez que materiais biocerâmicos apresentam interação material/dentina. Biocompatibilidade e potencial bioativo de cimentos obturadores à biocerâmicos foram avaliados em comparação ao cimento AH Plus. E também de materiais reparadores biocerâmicos em comparação com IRM. Para avaliação da biocompatibilidade foram realizados a mensuração do número de células inflamatórias, da espessura das cápsulas adjacentes aos tubos implantados e do número de células imunopositivas para IL-6. Já para análise do potencial bioativo, foram avaliados o número de células positivas para osteocalcina, a presença de estruturas positivas ao método de von Kossa e a presença de estruturas birrefringentes. Todos os testes foram avaliados nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias.

A análise de propriedades físico-químicas como porosidade e interface material/dentina é importante para avaliação do potencial comportamento selador do material¹³⁴. Micro-CT foi utilizado para avaliação da porosidade e interface dentina/material.

No presente estudo, os cimentos obturadores: Bio-C Sealer, Sealer Plus BC e TotalFill BC Sealer apresentaram redução gradual e significativa no número de células inflamatórias, na espessura das cápsulas adjacentes aos tubos implantados no decorrer do tempo e no número de células IL-6-imunopositivas com decorrer do tempo. Aos 60 dias, esses materiais apresentaram valores de nº de células inflamatórias, espessura de cápsula e células IL-6-imunopositivas similares ao grupo controle, semelhantes aos achados de Silva et al.^{29,24} que avaliaram o Bio-C Sealer, Sealer Plus BC e TotalFill BC Sealer em tubos de polietileno. AH Plus é um cimento a base de resina epóxi, considerado padrão ouro, devido a suas propriedades físico-químicas e biológicas. Neste estudo, AH Plus apresentou maior espessura de cápsula, densidade de células inflamatórias e células IL-6-imunopositivas, resultados semelhantes encontrados em estudos prévios^{29,108}. Esse processo inflamatório pode estar relacionado com presença da resina epóxi e aminas na composição^{108,141}.

IRM é cimento à base de óxido de zinco e eugenol comumente usado como controle para comparações com cimentos de silicato de cálcio. Foi observada resposta inflamatória mais severa, com uma maior densidade de células inflamatórias, células IL-6-imunopositivas e cápsulas espessas aos 7 e 15 dias, após o 30º dia, não foi encontrada diferença significativa entre os espécimes Bio-C Repair, MTA repair HP, IRM e grupo controle, concordando com

outros estudos^{142,143}. As cápsulas de Bio-C Repair exibiram maior espessura e células inflamatórias do que MTA repair HP em 7 dias e mais células IL-6-imunopositivas em 7 e 15 dias. Aos 30 e 60 dias, não foram observadas diferenças significativas no número de células inflamatórias, na espessura da cápsula e no número de células IL-6-imunopositivas entre Bio-C Repair, MTA repair HP e grupo controle, demonstrando ser cimentos biocompatíveis, resultados semelhantes a estudos realizados com tubos de polietileno^{27,60}.

A bioatividade de um material decorre quando o mesmo interage quimicamente com os tecidos estimulando reparação por tecido mineralizado¹⁴⁴. A bioatividade foi avaliada pela combinação da técnica histoquímica de von Kossa combinada com a reação imuno-histoquímica da osteocalcina; apenas o método de von Kossa não é apropriado para a identificação e quantificação de minerais semelhantes a ossos¹⁴⁵. A osteocalcina tem sido usada como marcador de osteoblastos maduros e pode se ligar ao cálcio que participa do processo de mineralização¹⁵.

Os cimentos Bio-C Sealer, Sealer Plus BC, TotalFill BC Sealer, Bio-C Repair e MTA repair HP apresentaram, em todos os períodos analisados, imunomarcção para osteocalcina e apresentaram estruturas positivas para o método de von Kossa. Através da técnica de birrefringência, que detectam calcita amorfa, tais cimentos apresentaram, em todos os períodos analisados, estruturas irregulares, localizadas nas cápsulas e no decorrer do tecido. De fato, materiais à base de silicato de cálcio são considerados materiais bioativos pois favorecem a formação de hidroxiapatita por meio do processo de hidratação dos silicatos e liberam íons de cálcio, apresentando pH alcalino e papel na indução de mineralização¹⁴⁶⁻¹⁵⁰.

AH Plus exibiu positividade para o método de von Kossa devido à liberação desse material de cálcio^{29,151} e apresentou estruturas birrefringentes. No entanto, o AH Plus não apresentou marcação positiva para osteocalcina em nenhum período, sugerindo ausência de bioatividade, concordando com estudos anteriores²⁹. Assim como IRM que não apresentou imunomarcção para osteocalcina, nem estruturas positivas para o método de von Kossa, não demonstrando bioatividade.

A porosidade está relacionada com a dureza e resistência dos materiais¹⁵², afetando a estabilidade, integridade e durabilidade dos cimentos endodônticos^{136,153}. Bio-C Sealer, Sealer Plus BC e TotalFill BC Sealer e MTA repair HP apresentaram uma maior porosidade, o que pode estar correlacionada a uma maior solubilidade desses materiais^{104,110}, uma vez que solubilidade e porosidade estão relacionadas. Além de uma alta porosidade, MTA repair HP apresentou uma porcentagem alta de vazios comparada ao Bio-C Repair e IRM, estando relacionado com a alta solubilidade deste cimento.

A baixa porosidade e a baixa porcentagem de vazio nos materiais são desejáveis para proporcionar uma vedação de longo prazo e evitar o vazamento microbiano¹³⁶, consequentemente, evitando o insucesso do tratamento¹⁵⁴. Uma porcentagem semelhante de vazios foi observada para os cimentos Bio-C Sealer, Sealer Plus BC, TotalFill BC Sealer e AH Plus, o que pode estar relacionado com a alta viscosidade e o pequeno tamanho de partícula desses cimentos^{138,155}. Nossos resultados corroboram com estudos anteriores, que compararam cimentos biocerâmicos com AH Plus, e não foi observada diferença entre eles¹¹⁰. Também Bio-C Repair e IRM apresentaram baixa porosidade e valores de vazios similares, corroborando com estudo anterior⁸².

5 CONCLUSÕES

Os cimentos obturadores biocerâmicos Bio-C Sealer, Sealer Plus BC, TotalFill BC Sealer, podem ser considerados biocompatíveis por induzirem uma resposta inflamatória de intensidade leve, favorecendo o tecido tecidual. Além disso, esses cimentos demonstraram apresentar bioatividade. O AH Plus apresentou reação inflamatória de severa a moderada e não demonstrou bioatividade. Bio-C Sealer, Sealer Plus BC e TotalFill BC Sealer apresentaram maior porosidade que AH Plus, mas porcentagem semelhantes de vazios de interface em relação ao AH Plus.

Os cimentos reparadores biocerâmicos Bio-C Repair e MTA repair HP apresentaram biocompatibilidade e bioatividade. IRM demonstrou ser biocompatível, porém não apresentou bioatividade. MTA repair HP apresentou maior porosidade e presença de vazios de interface comparada ao Bio-C Repair e IRM.

REFERÊNCIAS¹

1. Shenoy A, Shenoy N. Dental ceramics: an update. *J Conserv Dent*. 2010; 13(4): 195.
2. Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: past, present and for the future. *J Eur Ceram Soc*. 2008; 28(7): 1319–27.
3. Candeiro GTDM, Correia FC, Duarte MAH, Ribeiro-Siqueira DC, Gavini G. Evaluation of radiopacity, pH, release of calcium ions, and flow of a bioceramic root canal sealer. *J Endod*. 2012; 38(6): 842–5.
4. Koch K, Brave D. A new day has dawned: the increased use of bioceramics in endodontics. *Dentaltown*. 2009 apr; 39–43.
5. Surya SR, Jadhav GR, Gathani KM, Kotadia P. Bioceramics in endodontics: a review. *J Ista Univ Facul Dent*. 2017; 51(3 suppl 1): 128–37.
6. Leal F, De-Deus G, Brandão C, Luna AS, Fidel SR, Souza EM. Comparison of the root-end seal provided by bioceramic repair cements and white MTA. *Int Endod J*. 2011; 44(7): 662–8.
7. Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater*. 2015; 31(4): 351–70.
8. Koch KA, Brave DG. Bioceramics, part I: the clinician's viewpoint. *Dent Today* 2012; 31(1): 130–135.
9. Wang Z. Bioceramic materials in endodontics. *Endodontic Topics*. 2015; 32(1): 3–30.
10. Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white Portland Cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *J Endod*. 2009; 35(5): 731–6.
11. Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J*. 2006; 39(10): 747–54.
12. Bohner M, Lemaître J. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials*. 2009; 30(12): 281–312.
13. Thomson T, Berry J, Somerman M, Kirkwood K. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2003; 29(6): 407–12.
14. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*. 1990; 143(3): 420–30.

¹ 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>.

15. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012; 100(7): 1773–81.
16. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent*. 2001; 86(2): 203–9.
17. Siqueira- Junior J, Lopes H. Endodontia: biologia e técnica. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
18. 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.
19. Tanomaru-Filho M, Luis MR, Leonardo MR, Tanomaru JMG, Silva LAB. Evaluation of periapical repair following retrograde filling with different root-end filling materials in dog teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102(1): 127–32.
20. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. The effect of curing conditions on the physical properties of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Int Endod J*. 2012; 45(4): 326–36.
21. Zhou HM, Shen Y, Zheng W, Li L, Zheng YF, Haapasalo M. Physical properties of 5 root canal sealers. *J Endod*. 2013; 39(10): 1281–6.
22. Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, 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.
23. Silva GF, Bosso R, Ferino RV., Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, 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.
24. Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Lopes CS, Cerri PS, Guerreiro Tanomaru JM. Evaluation of the biological properties of two experimental calcium silicate sealers: an in vivo study in rats. *Int Endod J*. 2021; 54(1): 100-11.
25. Olsson B, Sliwkowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod*. 1981; 7(8): 355-67.
26. Bósio CC, Felipe GS, Bortoluzzi EA, 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.

27. Delfino MM, Abreu Jampani JL, Lopes CS, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E et al. Comparison of Bio-C Pulpo and MTA Repair HP with white MTA: effect on liver parameters and evaluation of biocompatibility and bioactivity in rats. *Int Endod J*. 2021; 54(9): 1597–613.
28. Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Immunoinflammatory response and bioactive potential of GuttaFlow, Bioseal and MTA Fillapex in the rat subcutaneous tissue. *Sci Rep*. 2020; 10(7173): 1–15.
29. Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF da, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and bioactive potential of new calcium silicate–based endodontic sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *J Endod*. 2020; 46(10): 1470–7.
30. Saraiva J, Fonseca T, Silva GF, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru J, Tanomaru-Filho M et al. Reduced interleukin-6 immunoexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. *Biomed Mater*. 2018; 13(3): 035002.
31. Fonseca TS, Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J*. 2016; 49(2): 145–53.
32. Motwani N, Ikhar A, Nikhade P, Chandak M, Rathi S, Dugar M, et al. Premixed bioceramics: a novel pulp capping agent. *J Conserv Dent*. 2021; 24(2): 124–9.
33. Hørsted P, Fejerskov O, Johannsen G. A model for experimental endodontics by transplanting human dental roots subcutaneously to rats. *Scand J Dent Res*. 1980; 88(5): 412-7
34. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Bernabé PFE, Dezan 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.
35. Holland R, de Souza V, Nery M, Bernabé PFE, Otoboni-filho J, Dezan-junior E et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod*. 2002; 28(3): 173-6.
36. Torabinejad M, White JD. Tooth filling material and method of use. US patent. 1995; (19): 1–11.
37. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 1999; 25(3): 197–205.
38. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod*. 1993; 19(11): 541–4.
39. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2005; 31(2): 97-100.

40. Tanomaru JMG, Tanomaru-Filho M, Hotta J, Watanabe E, Ito IY. Antimicrobial activity of endodontic sealers based on calcium hydroxide and MTA. *Acta Odontol Latinoam*. 2008; 21(2): 147–51.
41. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-part III: clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod*. 2010; 36(3): 400–13.
42. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 2010; 36(1): 16–27.
43. Mente J, Geletneky B, Ohle M, Koch MJ, Friedrich Ding PG, Wolff D et al. Mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: an analysis of the clinical treatment outcome. *J Endod*. 2010; 36(5): 806–13.
44. Camilleri J. Investigation of Biodentine as dentine replacement material. *J Dent*. 2013; 41(7): 600–10.
45. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A et al. Response of human dental pulp capped with Biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2013; 39(6): 743–7.
46. Kim JR, Nosrat A, Fouad AF. Interfacial characteristics of Biodentine and MTA with dentine in simulated body fluid. *J Dent*. 2015; 43(2): 241–7.
47. Xuereb M, Sorrentino F, Damidot D, Camilleri J. Development of novel tricalcium silicate-based endodontic cements with sintered radiopacifier phase. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(5): 967–82.
48. Tay FR, Pashley DH, Rueggeberg FA, Loushine RJ, Weller RN. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the Portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. *J Endod*. 2007; 33(11): 1347–51.
49. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod*. 2006; 32(6): 569–72.
50. Camilleri J. Color stability of white mineral trioxide aggregate in contact with hypochlorite solution. *J Endod*. 2014; 40(3): 436–40.
51. Kohli MR, Yamaguchi M, Setzer FC, Karabucak B. Spectrophotometric analysis of coronal tooth discoloration induced by various bioceramic cements and other endodontic materials. *J Endod*. 2015; 41(11): 1862–6.
52. Możyńska J, Metlerski M, Lipski M, Nowicka A. Tooth discoloration induced by different calcium silicate-based cements: a systematic review of in vitro studies. *J Endod*. 2017; 43(10): 1593–601.

53. Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, da Fonseca TS, Bernardi MIB, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M et al. Zirconium oxide and niobium oxide used as radiopacifiers in a calcium silicate-based material stimulate fibroblast proliferation and collagen formation. *Int Endod J*. 2017; 50(2): e95–e108.
54. Zordan-Bronzel CL, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Chávez-Andrade GM, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM. Cytocompatibility, bioactive potential and antimicrobial activity of an experimental calcium silicate-based endodontic sealer. *Int Endod J*. 2019; 52(7): 979–86.
55. Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, Viola KS, Bosso-Martelo R, Chavez-Andrade GM et al. Physicochemical, biological, and antibacterial evaluation of tricalcium silicate-based reparative cements with different radiopacifiers. *Dent Mater*. 2021; 37(2): 311–20.
56. Húngaro Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD arc, Vivan RR, Guerreiro Tanomaru JM, Filho MT, de Moraes IG. Radiopacity of Portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod*. 2009; 35(5): 737–40.
57. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FLC, Duarte MAH, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(1): 83–90.
58. Torres FFE, Jacobs R, EzEldeen M, Guerreiro-Tanomaru JM, dos Santos BC, Oliveira ÉL et al. Micro-computed tomography high resolution evaluation of dimensional and morphological changes of 3 root-end filling materials in simulated physiological conditions. *J Mater Sci Mater Med*. 2020; 31(2): 14.
59. Oliveira LV, Souza GL, Silva GR, Magalhães TEA, Freitas GAN, Turrioni AP et al. Biological parameters, discolouration and radiopacity of calcium silicate-based materials in a simulated model of partial pulpotomy. *Int Endod J*. 2021; 54(11): 2133–44.
60. Benetti F, Queiroz ÍO de A, Cosme-Silva L, Conti LC, de Oliveira SHP, Cintra LTA. Cytotoxicity, biocompatibility and biomineralization of a new ready-for-use bioceramic repair material. *Braz Dent J*. 2019; 30(4): 325–32.
61. Ghilotti J, Sanz JL, López-García S, Guerrero-Gironés J, Pecci-Lloret MP, Lozano A et al. Comparative surface morphology, chemical composition, and cytocompatibility of Bio-C Repair, Biodentine, and ProRoot MTA on hDPCs. *Materials*. 2020; 13(9): 1–13.
62. López-García S, Lozano A, García-Bernal D, Forner L, Llena C, Guerrero-Gironés J et al. Biological effects of new hydraulic materials on human periodontal ligament stem cells. *J Clin Med*. 2019; 8(8): 1216.
63. Klein-Junior CA, Zimmer R, Dobler T, Oliveira V, Marinowic DR, Özkömrür A et al. Cytotoxicity assessment of Bio-C Repair Íon+: a new calcium silicate-based cement. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2021; 15(3): 152–6.

64. Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, de Araújo Lopes JM, Penha de Oliveira SH, Sivieri Araújo G et al. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *J Endod.* 2017; 43(5): 774–8.
65. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C et al. Biocompatibility of new pulp-capping materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on human dental pulp stem cells. *J Endod.* 2018; 44(1): 126–132.
66. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C et al. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *Int Endod J.* 2017; 50(2): e63–e72.
67. Ferreira CMA, Sassone LM, Gonçalves AS, de Carvalho JJ, Tomás-Catalá CJ, García-Bernal D et al. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 1–11.
68. Dorn SO, Gartner AH. Retrograde filling materials: a retrospective success-failure study of amalgam, EBA, and IRM. *J Endod.* 1990; 16(8): 391–3.
69. Bondra DL, Hartwell GR, MacPherson MG, Portell FR. Leakage in vitro with IRM, high copper amalgam, and EBA cement as retrofilling materials. *J Endod.* 1989; 15(4): 157–60.
70. Nicholls E. Retrograde filling of the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1962; 15(4): 463–73.
71. Torabinejad M, Lee SJ, Hong CU. Apical marginal adaptation of orthograde and retrograde root end fillings: a dye leakage and scanning electron microscopic study. *J Endod* 1994; 20(8): 402–7.
72. Tronstad L, Wennberg A. In vitro assessment of the toxicity of filling materials. *Int Endod J.* 1980; 13(3): 131–8.
73. Chong BS, Owadally ID, Ford TRP, Wilson RF. Cytotoxicity of potential retrograde root-filling materials. *Dent Traumatol.* 1994; 10(3): 129–33.
74. Maher WP, Johnson RL, Hess J, Steiman HR, City T. Biocompatibility materials retrograde ferret canine. Amalgam and IRM. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992; 73(6): 738–45.
75. Bodrumlu E. Biocompatibility of retrograde root filling materials: a review. *Aust Endod J.* 2008; 34(1): 30–5.
76. Ford TRP, Andreasen JO, Dorn SO, Kariyawasam SP. Effect of super-EBA as a root end filling on healing after replantation. *J Endod.* 1995; 21(1): 13–5.

77. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater.* 2013; 29(2): e20–e28.
78. Camilleri J, Grech L, Galea K, Keir D, Fenech M, Formosa L et al. Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(5): 1437–46.
79. Wang Z, Ma J, Shen Y, Haapasalo M. Acidic pH weakens the microhardness and microstructure of three tricalcium silicate materials. *Int Endod J.* 2015; 48(4): 323–32.
80. Chong BS, Pitt Ford TR, Hudson MB. A prospective clinical study of mineral trioxide aggregate and IRM when used as root-end filling materials in endodontic surgery. *Int Endod J.* 2009; 42(5): 414–20.
81. Lindeboom JAH, Frenken JWFH, Kroon FHM, van den Akker HP. A comparative prospective randomized clinical study of MTA and IRM as root-end filling materials in single-rooted teeth in endodontic surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005; 100(4): 495–500.
82. Torres FFE, Pinto JC, Figueira GO, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. A micro-computed tomographic study using a novel test model to assess the filling ability and volumetric changes of bioceramic root repair materials. *Restor Dent Endod.* 2021; 46(1): 1–8.
83. Torres FFE, Guerreiro-Tanomaru JM, Pinto JC, Tanomaru-Filho M. Effect of different dimensions of test samples on the volumetric change assessment of endodontic materials. *Braz Dent J.* 2021; 32(1): 42–7.
84. Tobón-Arroyave SI, Restrepo-Pérez MM, Arismendi-Echavarría JA, Velásquez-Restrepo Z, Marín-Botero ML, García-Dorado EC. Ex vivo microscopic assessment of factors affecting the quality of apical seal created by root-end fillings. *Int Endod J.* 2007; 40(8): 590–602.
85. Meryon D, Jakeman J. The effects in vitro of zinc released from dental restorative materials. *Int Endod J.* 1985; 18(3): 211–8.
86. Jeng JH, Hahn LJ, Lu E, Wang Y, Kuo MYP. Eugenol triggers different pathobiological effects on human oral mucosal fibroblasts 1. *J Dent Res.* 1994; 73(5): 1050–5.
87. Al-Hiyasat AS, Al-Sa'eed OR, Darmani H. Quality of cellular attachment to various root-end filling materials. *J Appl Oral Sci.* 2012; 20(1): 82–8.
88. Chang SW, Lee SY, Kum KY, Kim EC. Effects of ProRoot MTA, Bioaggregate, and Micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod.* 2014; 40(1): 113–8.

89. Wälivaara D-Å, Abrahamsson P, Isaksson S, Salata LA, Sennerby L, Dahlin C. Periapical tissue response after use of intermediate restorative material, gutta-percha, reinforced zinc oxide cement, and mineral trioxide aggregate as retrograde root-end filling materials: a histologic study in dogs. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 70(9): 2041-7.
90. Torabinejad M, Pitt Ford TR, Abedi HR, Kariyawasam SP, Tang H-M. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. *J Endod.* 1998; 24(7): 468-71.
91. Gundam S, Patil J, Venigalla B, Yadanaparti S, Maddu R, Gurram S. Comparison of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate, glass ionomer cement and intermediate restorative material as root-end filling materials, using scanning electron microscope: an in vitro study. *J Conserv Dent.* 2014; 17(6): 566-70.
92. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod.* 1995; 21(6): 295-9.
93. Tang H, Torabinejad M, Kettering J. Leakage evaluation of root end filling materials using endotoxin. *J Endod.* 2002; 28(1): 5-7.
94. Bhatia S, Jain A, Sood H, Jain K. Comparative study of sealing ability of different filling materials for root end: an in vitro evaluation. *Dent J Adv Stud.* 2021; 9(01): 22-6.
95. Koch K. Bioceramic technology-the game changer in endodontics. *Art Dent.* 2011; 3(41): 164-73.
96. Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares, princípios técnicos e biológicos. 4 ed. São Paulo: Artes médicas; 2005.
97. Grossman LI. Prevention in Endodontic Practice. *J Am Dent Assoc.* 1971; 82(2): 395-6.
98. Abedi HR, Ingle JJ. Mineral trioxide aggregate: a review of a new cement. *J Calif Dent Assoc.* 1995; 23(11): 36-9.
99. Torabinejad M, Higa RK, McKendry DJ, Pitt Ford TR. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. *J Endod.* 1994; 20(4): 159-63.
100. Morinaga K, Nakagawa K-I, Carr Gb. Tissue reactions after intraosseous implantation of three retrofilling materials. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2003; 44(1): 1-7.
101. Malhotra S, Hegde MN, Shetty C. Bioceramic technology in endodontics. *J Adv Med Med Res.* 2014; 4(12): 2446-54.

102. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Pinto JC, Santos-Junior AO, Tavares KIMC, Guerreiro-Tanomaru JM. Micro-computed tomographic evaluation of a new system for root canal filling using calcium silicate-based root canal sealers. *Restor Dent Endod.* 2020; 45(3): e34.
103. Tanomaru-Filho M, Torres FFE, Pinto JC, Guerreiro-Tanomaru JM, Pereira MC, Filho MT et al. Flow, filling ability and apical extrusion of new calcium silicate-based sealers: a micro-computed tomographic study. *Dent Oral Biol Craniofac Res.* 2020; 3(3): 1–6.
104. Zordan-Bronzel CL, Esteves Torres FF, Tanomaru-Filho M, Chávez-Andrade GM, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of physicochemical properties of a new calcium silicate-based sealer, Bio-C Sealer. *J Endod.* 2019; 45(10): 1248–52.
105. Okamura T, Chen L, Tsumano N, Ikeda C, Komasa S, Tominaga K et al. Biocompatibility of a high-plasticity, calcium silicate-based, ready-to-use material. *Materials.* 2020; 13(21): 4770.
106. López-García S, Pecci-Lloret MR, Guerrero-Gironés J, Pecci-Lloret MP, Lozano A, Llena C et al. Comparative cytocompatibility and mineralization potential of Bio-C sealer and TotalFill BC Sealer. *Materials.* 2019; 12(19): 1–12.
107. Barbosa VM, Pitondo-Silva A, Oliveira-Silva M, Martorano AS, Rizzi-Maia C de C, Silva-Sousa YTC et al. Antibacterial activity of a new ready-to-use calcium silicate-based sealer. *Braz Dent J.* 2020; 31(6): 611–6.
108. Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, de Oliveira PHC, Conti LC, Azuma MM, de Oliveira SHP et al. Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. *Braz Oral Res.* 2019; 33(42): 1–9.
109. Mendes AT, da Silva PB, Só BB, Hashizume LN, Vivan RR, da Rosa RA et al. Evaluation of physicochemical properties of new calcium silicate-based sealer. *Braz Dent J.* 2018; 29(6): 536–40.
110. Torres FFE, Zordan-Bronzel CL, Guerreiro-Tanomaru JM, Chávez-Andrade GM, Pinto JC, Tanomaru-Filho M. Effect of immersion in distilled water or phosphate-buffered saline on the solubility, volumetric change and presence of voids within new calcium silicate-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2020; 53(3): 385–91.
111. Chang SW, Lee SY, Kang SK, Kum KY, Kim EC. In vitro biocompatibility, inflammatory response, and osteogenic potential of 4 root canal sealers: Sealapex, Sankin Apatite root sealer, MTA Fillapex, and IRoot SP root canal sealer. *J Endod.* 2014; 40(10): 1642–8.
112. Rodríguez-Lozano FJ, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Forner L, Moraleda JM. Evaluation of cytocompatibility of calcium silicate-based endodontic sealers and their effects on the biological responses of mesenchymal dental stem cells. *Int Endod J.* 2017; 50(1): 67–76.

113. Zhang W, Li Z, Peng B. Assessment of a new root canal sealer's apical sealing ability. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107(6): e79-82.
114. 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 silicate-based endodontic sealers. *J Endod.* 2017; 43(12): 2097–101.
115. Zhang H, Shen Y, Ruse ND, Haapasalo M. Antibacterial activity of endodontic sealers by modified direct contact test against *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2009; 35(7): 1051–5.
116. Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium silicate-based canal filling material. *Int Endod J.* 2010; 43(9): 769–74.
117. Colombo M, Poggio C, Dagna A, Meravini MV, Riva P, Trovati F et al. Biological and physico-chemical properties of new root canal sealers. *J Clin Exp Dent.* 2018; 10(2): e120–6.
118. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J.* 2013; 46(9): 808–14.
119. Carvalho CN, Grazziotin-Soares R, de Miranda Candeiro GT, Martinez LG, de Souza JP, Oliveira PS et al. Micro push-out bond strength and bioactivity analysis of a bioceramic root canal sealer. *Iran Endod J.* 2017; 12(3): 343–8.
120. Santos JM, Coelho CM, Sequeira DB, Marques JA, Pereira JF, Sousa V et al. Subcutaneous implantation assessment of new calcium-silicate based sealer for warm obturation. *Biomedicines.* 2021; 9(1): 24.
121. Garrido ADB, Lia RCC, França SC, da Silva JF, Astolfi-Filho S, Sousa-Neto MD. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copaifera multijuga oil-resin. *Int Endod J.* 2010; 43(4): 283–91.
122. Siqueira JF, Rêças IN, Valois CRA. Apical sealing ability of five endodontic sealers. *Aust Endod J.* 2001; 27(1): 33–5.
123. Viapiana R, Flumignan DL, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Physicochemical and mechanical properties of zirconium oxide and niobium oxide modified Portland cement-based experimental endodontic sealers. *Int Endod J.* 2014; 47(5): 437–48.
124. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. The effects of dentine pretreatment on the adhesion of root-canal sealers. *Int Endod J.* 2002; 35(10): 859–66.
125. Tanomaru-Filho M, Jorge ÉG, Guerreiro Tanomaru JM, Gonçalves M. Radiopacity evaluation of new root canal filling materials by digitalization of images. *J Endod.* 2007; 33(3): 249–51.

126. Sonntag D, Ritter A, Burkhart A, Fischer J, Mondrzyk A, Ritter H. Experimental amine-epoxide sealer: a physicochemical study in comparison with AH Plus and EasySeal. *Int Endod J*. 2015; 48(8): 747–56.
127. Leonardo M, Silva L, Filho M, Bonifacio K, Ito I. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod*. 2000; 26(7): 391-4.
128. Silveira CMM, Pinto SCS, Zedebski R de AM, Santos FA, Pilatti GL. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J*. 2011; 22(1): 21-7.
129. Gomes-Filho JE, Gomes BPFA, Zaia AA, Ferraz CR, Souza-Filho FJ. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers using subcutaneous implants. *J Appl Oral Sci*. 2007; 15(3): 186-94.
130. Loushine BA, Bryan TE, Looney SW, Gillen BM, Loushine RJ, Weller RN et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed bioceramic root canal sealer. *J Endod*. 2011; 37(5): 673–7.
131. Zoufan K, Jiang J, Komabayashi T, Wang YH, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and EndoSequence BC sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; 112(5): 657–61.
132. Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, Ferreira LL, Massunari L, Bueno CRE et al. Evaluation of the cytotoxicity and biocompatibility of new resin epoxy-based endodontic sealer containing calcium hydroxide. *J Endod*. 2017; 43(12): 2088–92.
133. Kebudi Benezra M, Schembri Wismayer P, Camilleri J. Interfacial characteristics and cytocompatibility of hydraulic sealer cements. *J Endod*. 2018; 44(6): 1007–17.
134. Celikten B, Jacobs R, de Faria Vasconcelos K, Huang Y, Shaheen E, Nicolielo LFP et al. Comparative evaluation of cone beam CT and micro-CT on blooming artifacts in human teeth filled with bioceramic sealers. *Clin Oral Investig*. 2019; 23(8): 3267–73.
135. Torres FFE, Guerreiro-Tanomaru JM, Bosso-Martelo R, Chavez-Andrade GM, Tanomaru Filho M. Solubility, porosity and fluid uptake of calcium silicate-based cements. *J Appl Oral Sci*. 2018; 26(0): 1-8.
136. Torres FFE, Guerreiro-Tanomaru JM, Bosso-Martelo R, Espir CG, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Solubility, porosity, dimensional and volumetric change of endodontic sealers. *Braz Dent J*. 2019; 30(4): 368–73.
137. Gandolfi MG, Parrilli AP, Fini M, Prati C, Dummer PMH. 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with Thermafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. *Int Endod J*. 2013; 46(3): 253–63.
138. Huang Y, Orhan K, Celikten B, Orhan AI, Tufenkci P, Sevimay S. Evaluation of the sealing ability of different root canal sealers: a combined SEM and micro-CT study. *J Appl Oral Sci*. 2018; 26(0): 1-8.

139. Vergaças JHN, Lima CO, Barbosa AFA, Vieira VTL, Santos Antunes H, Silva EJNL. Marginal gaps and voids of three root-end filling materials: a microcomputed tomographic study. *Microsc Res Tech.* 2022; 85(2): 617–22.
140. International Organization for Standardization. ISO 6876: dental root canal sealing materials. Geneva, Switzerland, 2012.
141. Zhou HM, Du TF, Shen Y, Wang ZJ, Zheng YF, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity of calcium silicate-containing endodontic sealers. *J Endod.* 2015; 41(1): 56–61.
142. Blackman R, 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.
143. Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine. *J Endod.* 2006; 32(11): 1094–6.
144. Rincon M. Special issue on interleukin-6 (IL-6). *Int J Biol Sci.* 2012; 8(9): 1225–6.
145. Bonewald LF, Harris SE, Rosser J, Dallas MR, Dallas SL, Camacho NP et al. von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif Tissue Int.* 2003; 72(5): 537–47.
146. Trope M, Bunes A, Debelian G. Root filling materials and techniques: bioceramics a new hope? *Endodontic Topics.* 2015; 32(1): 86–96.
147. Khalil WA, Abunasef SK. Can mineral trioxide aggregate and nanoparticulate EndoSequence root repair material produce injurious effects to rat subcutaneous tissues? *J Endod.* 2015; 41(7): 1151–6.
148. Camps J, Jeanneau C, el Ayachi I, Laurent P, About I. Bioactivity of a calcium silicate-based endodontic cement (BioRoot RCS): interactions with human periodontal ligament cells in vitro. *J Endod.* 2015; 41(9): 1469–73.
149. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J.* 2010; 43(10): 917–29.
150. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Chemical-physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *Int Endod J.* 2012; 45(6): 571–9.
151. Borges RP, Sousa-Neto MD, Versiani MA, Rached-Júnior FA, De-Deus G, Miranda CES et al. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and an epoxy resin-based sealer after a solubility test. *Int Endod J.* 2012; 45(5): 419–28.
152. Dieter G. Elements of the theory of plasticity. Mechanical metallurgy: London; 1988.
153. Mutal L, Gani O. Presence of pores and vacuoles in set endodontic sealers. *Int Endod J.* 2005; 38(10): 690–6.

154. Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Marciano MA, Bramante CM et al. Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2014; 47(2): 120-6.
155. Celikten B, Uzuntas CF, Orhan AI, Orhan K, Tufenkci P, Kursun S et al. Evaluation of root canal sealer filling quality using a single-cone technique in oval shaped canals: an in vitro micro-CT study. *Scanning*. 2016; 38(2): 133–40.
156. 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.
157. Puchtler H, Meloan SN. Demonstration of phosphates in calcium deposits: A modification of von Kossa's reaction. *Histochem*. 1978; 56(3–4): 177–85.

APÊNDICE A – METODOLOGIA DETALHADA DA PUBLICAÇÃO 1 e 2

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (processo nº 04/2019) e Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara - Brasil. # 4.402.773 /CAAE:12647319.8.0000.5416).

Animais

Foram utilizados neste estudo ao total 56 ratos adultos jovens, da linhagem Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*) por período de avaliação (7,15,30 e 60 dias), pesando em média 270-300 gramas, oriundos do Biotério Central do Campus de Araraquara (UNESP). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas de polietileno (40x30x15 cm), 4 animais por gaiola, forradas com maravalha, em temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55\pm 10\%$) controladas e fotoperíodo de 12 horas, no Biotério da Faculdade de Odontologia (UNESP-Araraquara), onde receberão ração (Guabi Nutri Labor, Brasil) e água *ad libitum*. Para evitar o desconforto e a manutenção da higiene dos animais, foi realizada a limpeza das gaiolas e bebedouro, além da troca da maravalha, no mínimo, três vezes por semana. Os animais foram distribuídos por 9 grupos, com $n=6$ (sendo utilizado 6 amostras de cada implante para cada período). **Publicação 1:** Bio-C Sealer (BIOC; Angelus, Londrina, Brasil); Sealer Plus BC (SP; MK Life, Porto Alegre, Brasil), TotalFill BC Sealer (TF; FKG, La Chaux-de fonds, Suíça), AH Plus (AHP; Denstply, Konstanz, Alemanha) e Grupo Controle (GC; tubos de dentina vazios). **Publicação 2:** Bio-C Repair (BIOC- R, Angelus, Londrina, Brasil), MTA repair HP (MTAHP, Angelus, Londrina, Brasil), Material Restaurador Intermediário (IRM; Denstply, Delaware, Estados Unidos da América) e Grupo Controle (GC, tubos vazios de polietileno). A Tabela 1 descreve a procedência, composição química e proporção utilizada no preparo dos materiais.

Tabela 1- Materiais biocerâmicos, fabricante, composição química e proporção

Material	Composição	Fabricante/Proporção
Bio C-Sealer (BIOC)	Silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente de dispersão.	Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brasil (Material pronto para uso)
Sealer Plus BC (SP)	Dissilicato de cálcio, trissilicato de cálcio nanoparticulado, óxido de zircônio.	MK LIFE, Porto Alegre, Brasil (Material pronto para uso)
AH Plus (AHP)	Pasta A: resina epóxi; tungstênio de cálcio; óxido de zircônio; aerosil e óxido de ferro. Pasta B: amina adamantana; N, N-Dibercil-5-oxanonano-diamina-1,9; TCD-Diamina; tungstato de cálcio; óxido de zircônio; aerosil e óleo de silicone.	Dentsply, De Trey, Konstanz, Alemanha 1:1
TotalFill BC Sealer (TF)	Óxido de zircônia, silicato de cálcio, fosfato de cálcio monobásico, hidróxido de cálcio e agentes espessantes e preenchimento.	FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça (Material pronto para uso)
Bio-C Repair (BIOC-R)	Silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente de dispersão.	Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brasil (Material pronto para uso)
MTA repair HP (MTAHP)	Pó: Silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio e tungstato de cálcio. Líquido: água e plastificante.	Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brasil 1,2 g pó: 0,5 mL de líquido
Material Restaurador Intermediário (IRM)	Pó: Óxido de Zinco, Poli Metacrilato de Metila Líquido: Eugenol 99,5%, Ácido Acético 0,5%	Dentsply, Delaware, EUA 1,0 g pó: 0,2 mL de líquido

Fonte: Elaboração própria.

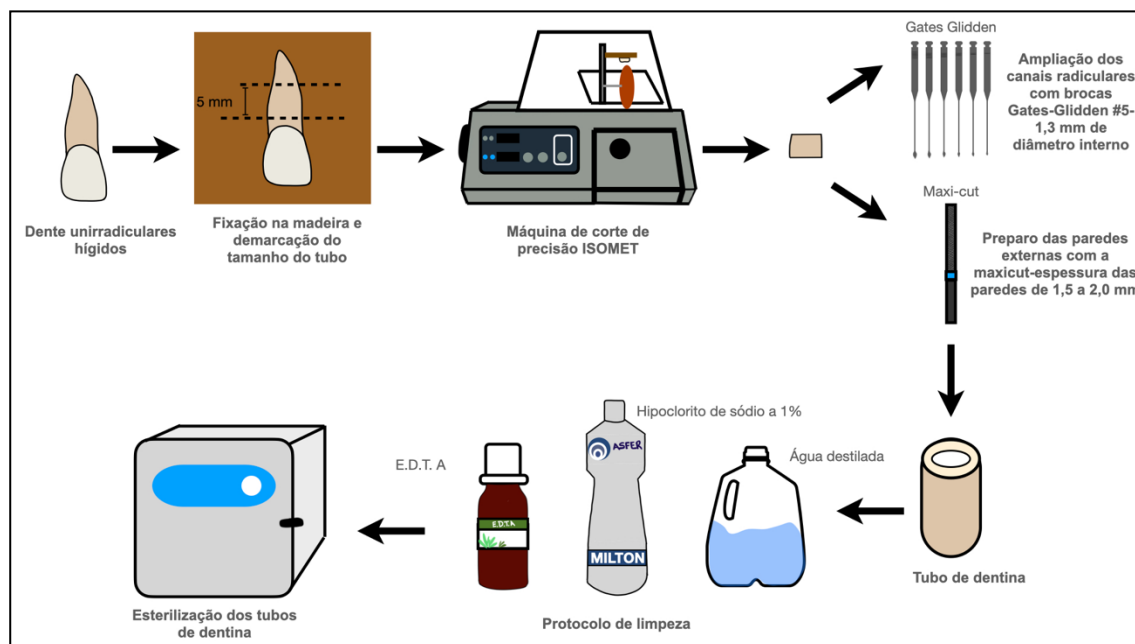
Obtenção e preparo dos tubos de dentina

Dentes uniradiculares, provenientes do Banco de Dentes da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, foram utilizados para confecção de 216 tubos de dentina (Figura 1), que foram obtidos após cortes transversais na porção coronária e apical, com auxílio da ISOMET (Buehler, Lake Bluff, NY), máquina de corte de precisão, permitindo a padronização do comprimento dos tubos de dentina com aproximadamente 5 mm. Os canais radiculares de cada tubo de dentina foram ampliados com brocas Gates-Glidden número 5 para padronização de 1,3 mm de diâmetro interno e espessura das paredes de 1,5 a 2,0 mm, posteriormente, lavados com água destilada e esterilizados na autoclave.

Os tubos de dentina, antes da implantação, passaram por um protocolo de limpeza para remoção da lama dentinária, com irrigação de EDTA 17% e hipoclorito de sódio a 1% por 3

minutos, e posteriormente, foram lavados com água destilada, secos, autoclavados e preenchidos com os materiais experimentais e grupo controle com tubos de dentina vazios (Figura 2).

Figura 1- Fluxograma ilustrando a confecção dos tubos de dentina humana



Fonte: Elaboração própria.

Figura 2- Tubos de dentina humana



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

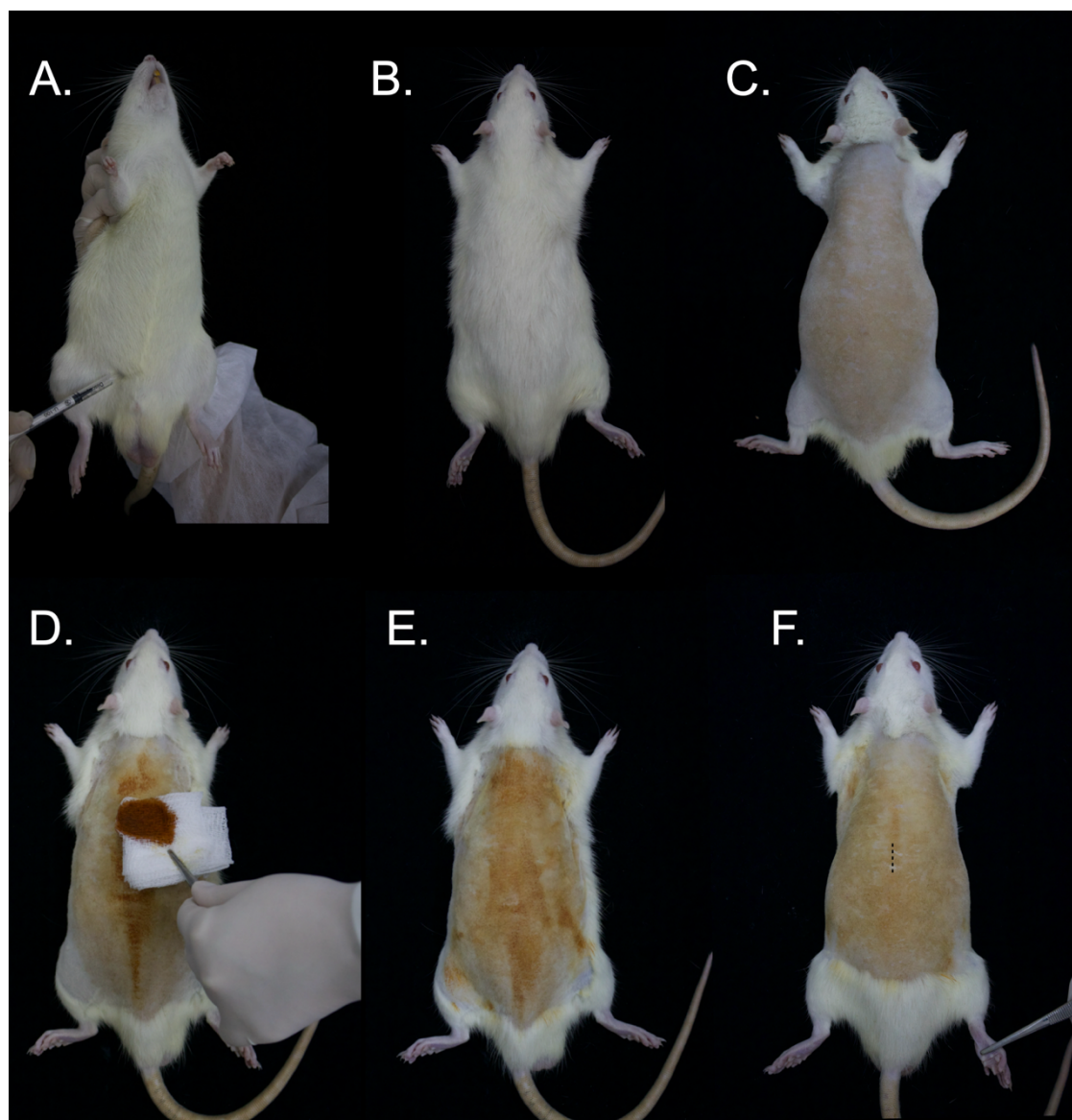
Implantação subcutânea- procedimento cirúrgico.

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal (Figura 3A) com uma seringa e agulha de insulina com uma associação 0,08 mL de cloridrato de cetamina 10% (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) e 0,04 mL de cloridrato de xilazina 2% (União Química Farmacêutica Nacional S / A, São Paulo, São Paulo, Brasil) por

100 g de peso corporal. Após a sedação, foi realizada a tricotomia (Figura 3C) e assepsia com solução de iodo a 5% da região dorsal do animal (Figura 3D), foi realizada uma incisão de 2 cm com uma lâmina de bisturi nº 15 (Fibra Cirúrgica, Joinville, Santa Catarina, Brasil), orientando-se na direção da cabeça para a cauda. O tecido foi divulsionado com tesoura de ponta romba e, posteriormente, em cada animal, quatro tubos de dentina (um tubo de cada grupo) foram colocados na bolsa criada no subcutâneo de cada animal de maneira que sua posição fosse alternada nos animais, ou seja, a implantação dos tubos foi realizada no sistema de “rodízio” (Figuras 4 e 5).

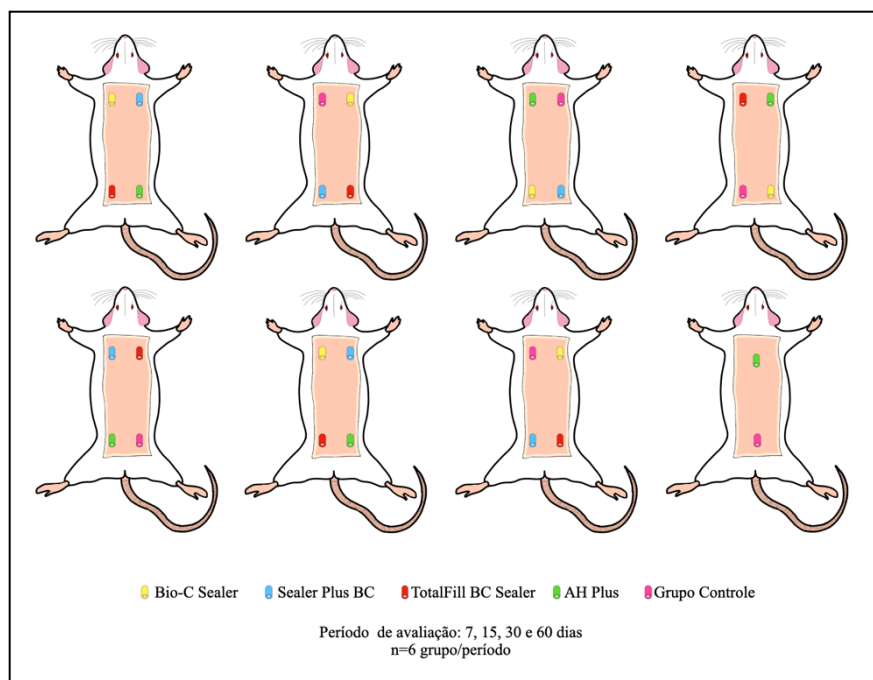
Tubos de dentina foram implantados nos animais (quatro implantes em cada animal). O local da pele incisada foi suturado com pontos simples com fio de seda 4-0 (Ethicon Inc., São José dos Campos, São Paulo, Brasil). Os animais, então foram observados até a recuperação da anestesia, colocados em gaiolas, devidamente identificados de acordo com o grupo e o período experimental. Para minimizar o desconforto pós-operatório dos animais, foi administrada dipirona sódica, na dosagem de 0,03 mg para cada 100 g de peso corporal. Após 7, 15, 30 e 60 dias de implantação, os animais em cada período foram anestesiados e os implantes com os tecidos adjacentes foram removidos. Subsequentemente, os animais foram sacrificados com uma overdose de anestésico

Figura 3 - 3A. Rato sendo anestesiado via intraperitoneal; 3B: após anestesia; 3C: tricotomia da região dorsal; 3D/E: assepsia com solução de iodo a 5%; 3F: animal pronto para implantação dos tubos; verificação da analgesia na pata traseira



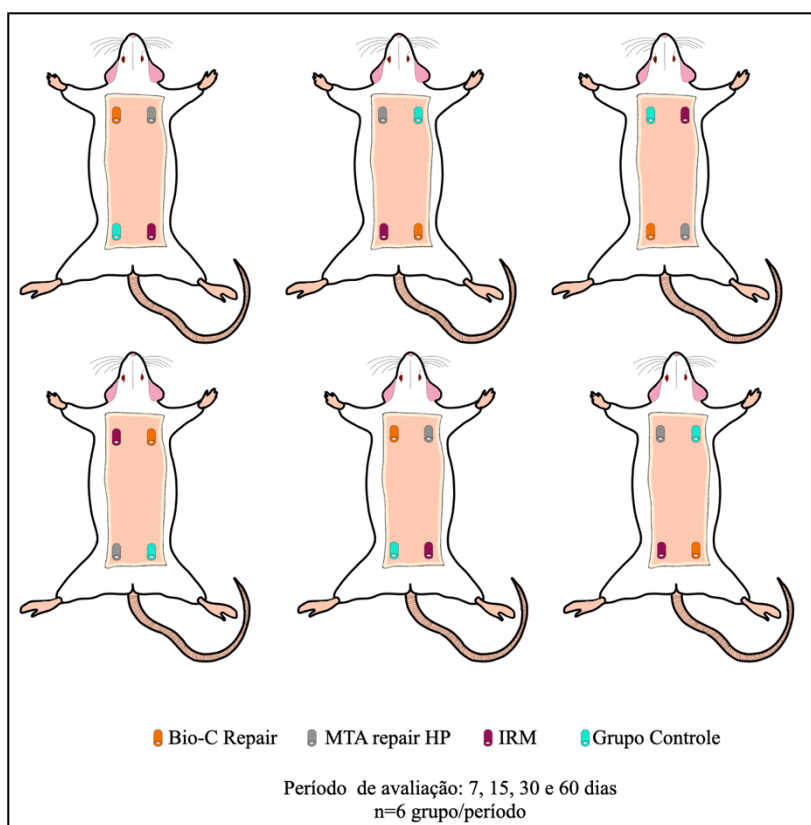
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 4- Organograma ilustrando os locais de implantação no dorso de cada animal e a alternância no sítio de implantação de cada material da publicação 1



Fonte: Elaboração própria.

Figura 5- Organograma ilustrando os locais de implantação no dorso de cada animal e a alternância no sítio de implantação de cada material da publicação 2



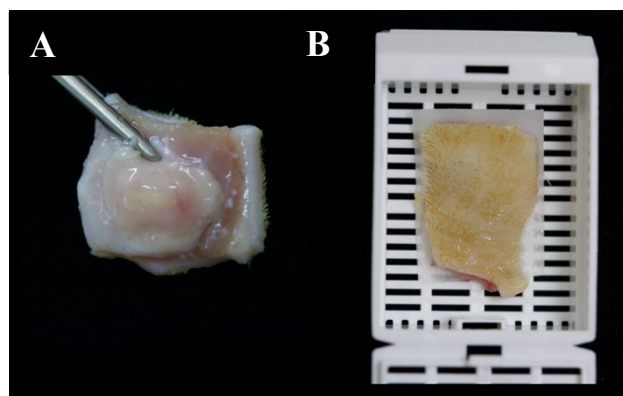
Fonte: Elaboração própria.

Processamento histológico

Os tubos de dentina juntamente com tecidos circunjacentes foram removidos, armazenados em cassetes com a identificação do grupo e período (Figura 6) e, imediatamente, fixados com solução de formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1 M com pH 7,2, durante 48 horas. Após fixação, as peças foram desidratadas, diafanizadas, embebidas em parafina líquida (60°C) para inclusão durante 4 horas com 3 trocas de parafina. Subsequentemente, as amostras foram incluídas em parafina sendo posicionada para obtenção dos cortes longitudinais dos implantes. Após a inclusão, o tubo de dentina foi cuidadosamente removido com auxílio de uma lâmina de bisturi e o seu espaço foi preenchido com parafina. Usando um micrótomo rotativo (Leica, modelo RM2125 RST, Heidelberg, Alemanha) e navalhas de aço inoxidável descartáveis (Leica, modelo 818, Heidelberg, Alemanha), cortes com 6 µm de espessura foram colados em lâminas de vidro; em cada lâmina foram colocadas dois cortes. A adesão dos cortes às lâminas de vidro foi realizada em estufa a 60 ° C durante, aproximadamente, 45 min.

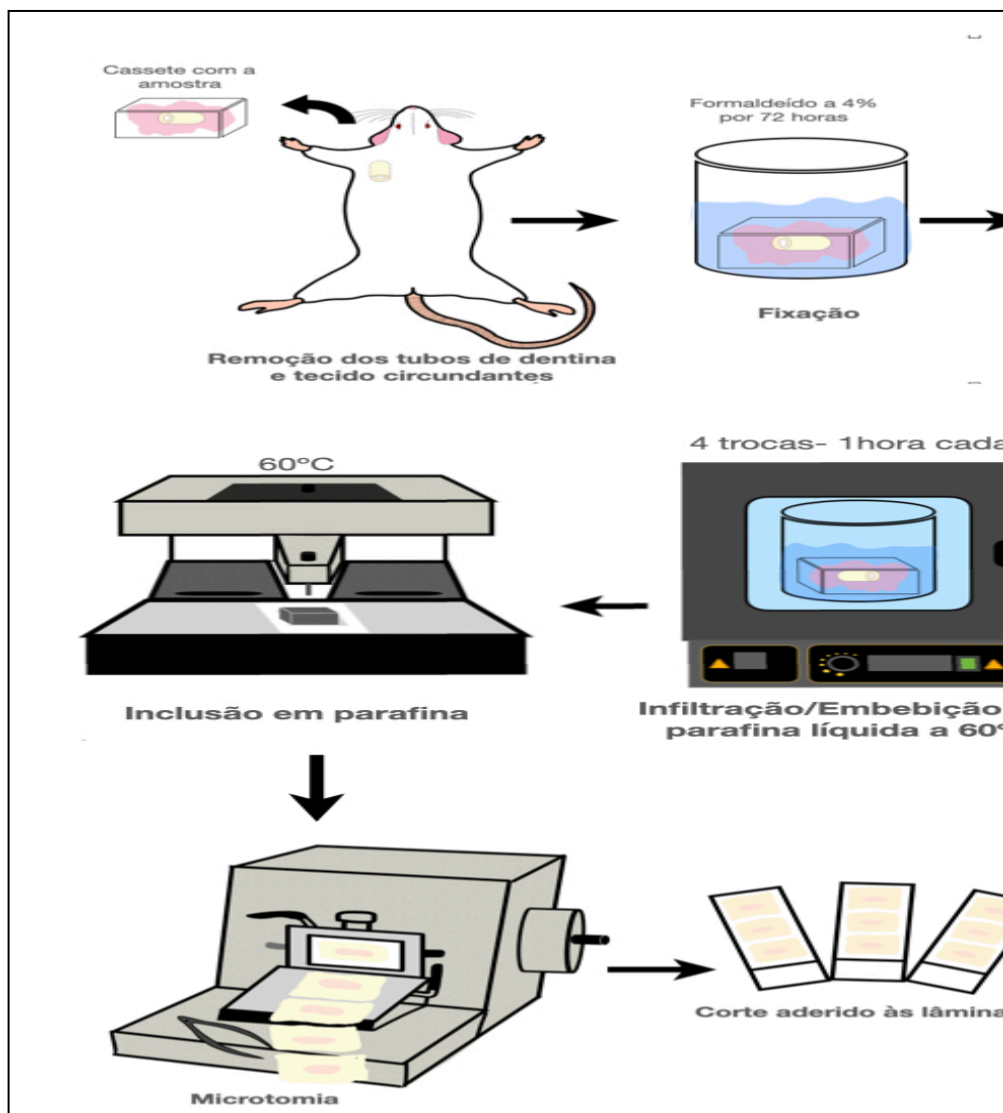
Cinco lâminas contendo cortes não seriados foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise morfológica, mensuração da espessura da cápsula, estimativa do número de células inflamatórias. Três cortes não seriados foram submetidos ao von Kossa para avaliar a presença de cálcio nas cápsulas. Ainda, cortes foram desparafinizados e montados para análise sob luz polarizada. Os cortes aderidos as lâminas tratadas com 3-aminopropiltriethoxisilano 4% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) foram submetidos as reações de imunohistoquímica para detecção de interleucina-6 (IL-6) e osteocalcina (OCN) (Figura 7)¹⁻³.

Figura 6- 6A: Tubo de dentina implantado juntamente com o tecido circundante removido; 6B: espécime na cassete após a remoção



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 7- Fluxograma ilustrando o processamento histológico das amostras e as análises realizadas



Fonte: Elaboração própria.

Avaliação da biocompatibilidade

- Análise morfológica dos cortes corados com HE

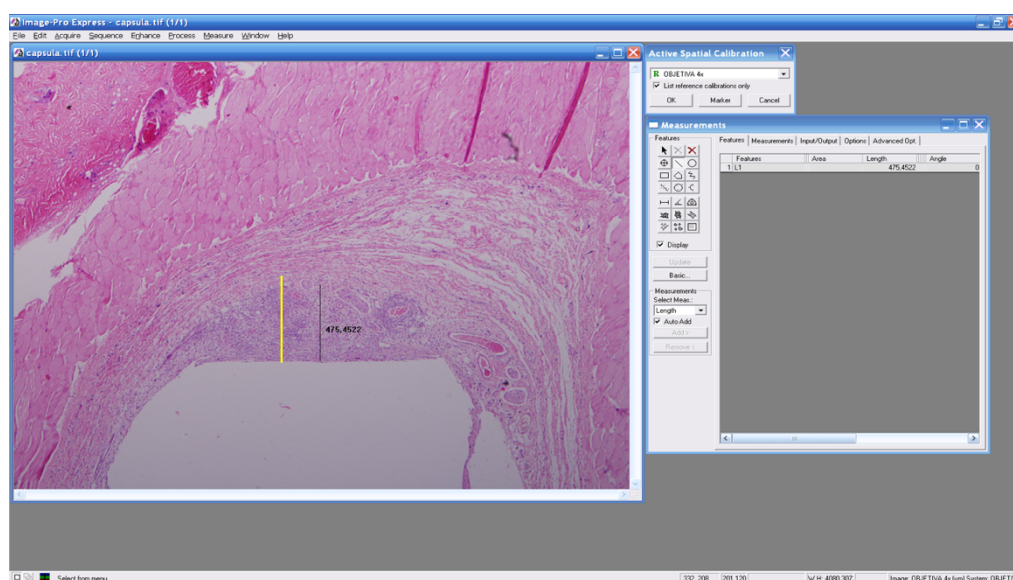
Na análise descritiva foram considerados os principais constituintes das cápsulas, como tipos de células inflamatórias, foram identificadas células como linfócitos, mastócitos, neutrófilos, além da presença de fibras de colágeno, vasos sanguíneos e extensão da reação inflamatória. Para estimar se os tecidos adjacentes foram danificados e a extensão da reação inflamatória, a espessura das cápsulas foi mensurada. A análise e captura das imagens foram realizadas com um microscópio Olympus (modelo BX 51, Olympus, Tóquio, Japão) com uma câmera digital acoplada (DP-72, Olympus, Tóquio, Japão). As análises quantitativas foram

realizadas com o auxílio de um sistema de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus, Tóquio, Japão). A análise foi realizada por um examinador treinado e “cego” aos grupos¹⁻³.

- Mensuração da espessura das cápsulas

Em cada amostra, a espessura da cápsula foi medida a partir de três cortes de cada animal não seriados corados com HE (a menor distância entre os cortes foi de 100 μm). Em cada corte, a imagem foi capturada com a objetiva de 4x (aumento final de 65x). As imagens foram transferidas para um sistema de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus) para mensuração e, inicialmente foi realizado a calibração do sistema, considerando o aumento da imagem. Com auxílio do sistema de imagem, uma linha foi traçada da superfície da cápsula adjacente à luz do tubo implantado até o limite com os tecidos adjacentes. Essa linha foi traçada considerando a porção central da cápsula adjacente a abertura do tubo (Figura 8). O valor fornecido pelo programa foi registrado em micrômetros (μm), em cada corte. Em cada implante, a espessura da cápsula foi calculada a partir da média dos valores obtidos nos três cortes. Em cada grupo, foi calculada a média em cada período¹⁻³.

Figura 8- Imagens do programa Image – Pro Express 6.0, Olympus – Japão, utilizado para mensuração da cápsula. A tela inicial do programa, temos a imagem que foi analisada, calibrada em objetiva de 4x e realizada a mensuração



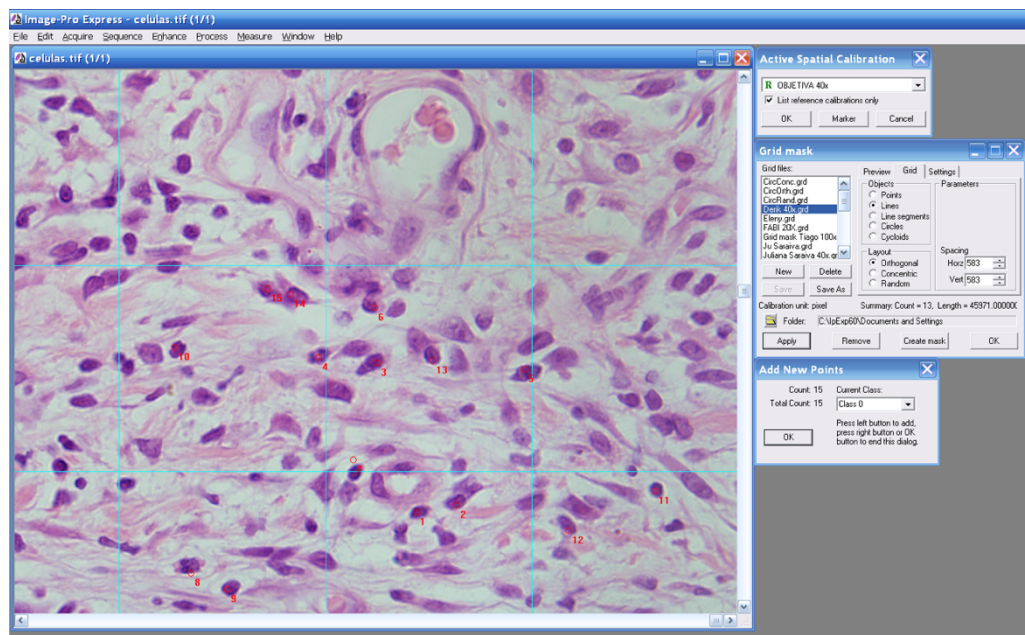
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

- Densidade numérica de células inflamatórias

Em cada implante, o número de células inflamatórias foi estimado em três cortes não seriados (com intervalo mínimo entre os cortes de 100 μm) corados com HE. Em cada corte, um campo padronizado (0,09 mm^2) da cápsula adjacente à abertura dos tubos implantados foi capturado com microscópio de luz (Olympus, modelo BX-51) com aumento de 695x. Dessa maneira, em cada amostra, o número de células inflamatórias foi computado em um campo total de 0,27 mm^2 .

As imagens foram mensuradas com um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus, Tóquio, Japão) e o número de células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e macrófagos) foi computado. Características morfológicas como núcleo multilobulado (neutrófilos), célula arredondada com núcleo esférico com cromatina condensada refletindo numa forte coloração pela hematoxilina (linfócitos), células elípticas com núcleo excentricamente localizado no citoplasma (plasmócitos) e células com núcleo irregular (macrófagos) foram usadas para identificar as células inflamatórias⁴⁻⁶. Com auxílio do sistema de análise de imagens, as células identificadas como células inflamatórias foram computadas pelo operador e o sistema numera sequencial (Figura 9). Assim, o número de células inflamatórias por mm^2 foi estimado em cada espécime. Esta análise foi realizada em todos os espécimes de todos os grupos e períodos.

Figura 9- Imagens do programa Image – Pro Express 6.0, Olympus – Japão, utilizado para quantificação de células inflamatórias. A tela inicial do programa, temos a imagem que foi analisada, calibrada em objetiva de 40x e realizada a quantificação. A imagem está com uma grade aplicada sobre ela para orientar durante a quantificação das células, as quais também são demarcadas na própria imagem



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

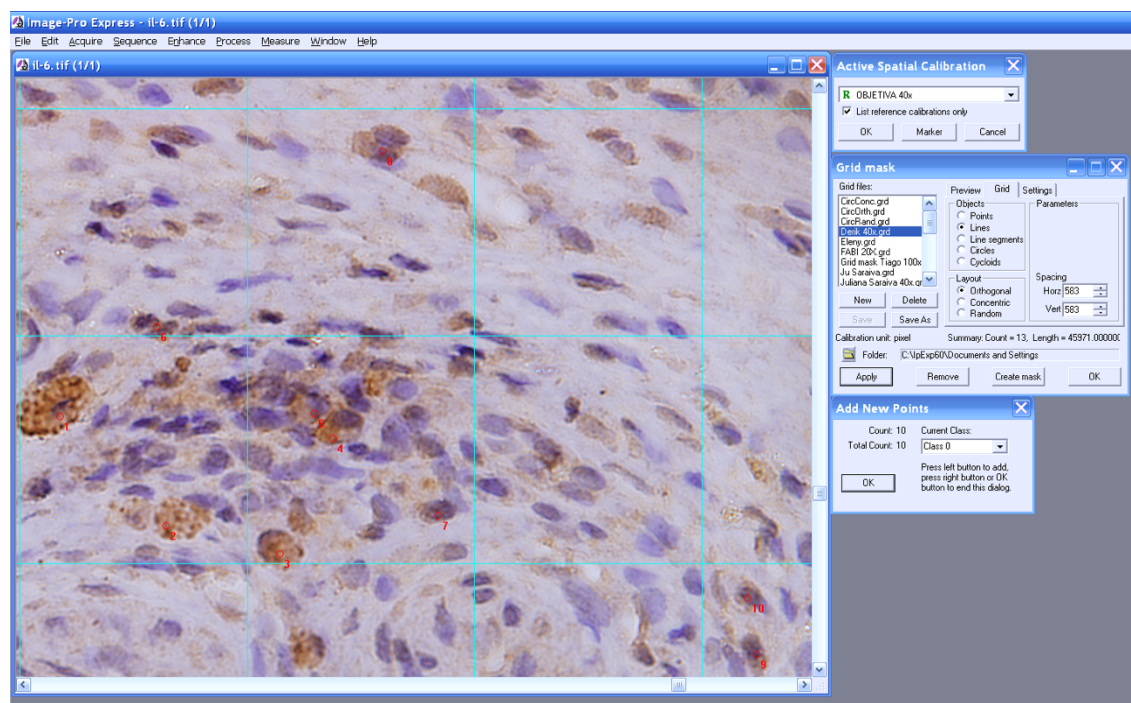
-Reação imuno-histoquímica para detecção de IL-6

Para a detecção de IL-6, foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo anti-IL-6 (Abcam Inc., Cambridge, MA, EUA; código: ab9324). Após desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001 M com pH 6,0 e submetidos e aquecidos a 98° C em micro-ondas por 30 minutos recuperação antigênica. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas em tampão Tris-HCl 0,05 M com pH 7,4 e, em seguida, imersas em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 5%, sendo duas trocas da solução por 10 minutos cada, para o bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes, então foram lavados novamente e incubados com albumina do soro bovino a 2% (BSA; Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA), por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados overnight (16 a 18 horas) em câmara úmida a 4°C (geladeira) com anticorpo primário de camundongo anti-IL-6 (Abcam, Cambridge Science, Cambridge, UK; código Ab 9324) na diluição de 1: 100. Posteriormente, os cortes passaram por 4 lavagens (5 min cada) em tampão Tris-HCl por 20 minutos e em seguida, os cortes foram incubados por 1 hora com anticorpo secundário IgG anti-camundongo biotilado (LSAB, Dako Inc., Carpinteria, Califórnia, EUA) em temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram lavados em tampão TRIS-HCl, e a atividade da peroxidase foi revelada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Dako Inc., Carpinteria,

Califórnia, EUA; código: K3468) por 3 minutos. Ao final os cortes foram contraincubados com hematoxilina de Carazzi, desidratados, diafanizados e montados para análise ao microscópio de luz. Como controle negativo, alguns cortes foram submetidos a todas as etapas exceto a incubação com anticorpo primário, onde serão incubados com soro não imune.

Para verificar se havia diferenças entre os grupos e períodos, o número de células imunopositivas (em castanho) foi computado nas cápsulas de todos os espécimes. Utilizando uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão) em aumento de 40x (ampliação final de 695x), uma área padrão de 0,09 mm² do tecido adjacente à abertura do tudo implantado foi capturada. O número de células imunopositivas foi processado em um programa de análise de imagens (Image Pro-Express 6.0, Olympus, Tóquio, Japão), as células imunopositivas à IL-6 foram computadas em cada campo e o número de células imunopositivas por mm² de cápsula foi calculado em cada amostra (Figura 10) e, posteriormente, a média por grupo em cada período foi calculada⁵⁻⁷.

Figura 10- Imagens do programa Image – Pro Express 6.0, Olympus – Japão, utilizado para quantificação da citocina IL-6. A tela inicial do programa, temos a imagem que foi analisada, calibrada em objetiva de 40x e realizada a quantificação. A imagem está com uma grade aplicada sobre ela para orientar durante a quantificação das citocinas, as quais também são demarcadas na própria imagem



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Avaliação da bioatividade

-Imuno-histoquímica para detecção de osteocalcina

Cortes aderidos às lâminas silanizadas dos tubos no subcutâneo foram desparafinizado, hidratados e aquecidos para recuperação antigênica através da imersão em citrato de sódio 0,001 M aquecido (96-98 ° C) a pH 6,0 sob tratamento de microondas por 10 min. Após o resfriamento, os cortes foram lavados em tampão fosfato de sódio (PBS 50mM + NaCl 200mM, pH 7,3), a peroxidase endógena foi inativada pela imersão em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 5% durante 30 min, no escuro. Posteriormente às lavagens com tampão Tris-HCl, as seções foram incubadas com BSA a 3% por 30 minutos a temperatura ambiente. Subsequentemente os cortes foram incubados com anticorpo anti-osteocalcina de coelho primário (1: 500, código SAB1306277; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) por 16 horas em câmara úmida a 4 ° C (geladeira). Após a incubação, foram realizadas lavagens com o tampão, e os cortes foram incubadas com polímero HRP marcado com camundongo / coelho (EnVision + Dual Link System-HRP, Dako Inc., Carpinteria, CA, EUA; K4061) e incubado com anticorpo anti-IgG de camundongo secundário biotilado (sistema Kit Vectastain ABC, Vector laboratories Inc., EUA) por 1 hora em temperatura ambiente. A imunorreação foi revelada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Dako Inc., Carpinteria, Califórnia, EUA) por 3 min. Os cortes então, foram contracolorados com hematoxilina de Carazzi e montados em meio resinoso (Permount®, Fisher Scientific, New Jersey, USA). Como controle negativo, alguns cortes contendo os tubos no subcutâneo serão submetidos ao mesmo procedimento, porém, os cortes serão incubados em soro bovino sem o anticorpo primário.

O número de células marcadas imunologicamente com osteocalcina foi obtido em todas as amostras. Um campo padronizado (0,09 mm²) da cápsula foi capturado com uma objetiva de 40x (ampliação final de 695x). Usando um programa de análise de imagem, imagem (Image Pro-Express 6.0, Olympus), as células imunopositivas à OCN (em castanho) foram computadas em cada campo e o número de células imunopositivas por mm² de cápsula foi calculado em cada amostra e, posteriormente, a média por grupo em cada período foi calculada⁵⁻⁷.

-Técnica de von Kossa e estruturas birrefringentes

Em cada espécime, três cortes não seriados foram submetidos à reação de von Kossa que detecta depósitos de cálcio^{8,9}, em preto/castanho nas cápsulas. Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos em solução resfriada (a 4° C) de nitrato de prata a 5% por 1 hora sob lâmpada incandescente (100 Watts). As lâminas foram rapidamente lavadas em água

destilada e, a seguir, imersas em solução de hipossulfito de sódio a 5% por 5 min. Após lavagem em água destilada por 5 min, os cortes foram corados com picrosirius-red^{5,10} e montados em meio resinoso (Permout®, Fisher Scientific, New Jersey, EUA). A reação histoquímica de von Kossa foi realizada em todos os implantes de todos os grupos e períodos e analisadas ao microscópio de luz (Figura 16; Olympus, modelo BX-51).

Cortes desparafinizados (sem coloração) foram montados em meio resinoso e foram analisados sob iluminação polarizada (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão) para verificar se as cápsulas continham estruturas birrefringentes, sugestivas de calcita amorfa^{1,2,11}.

Avaliação da porosidade e interface dentina/material

-Preparo das amostras

As amostras (n=6 períodos/materiais) utilizadas para as análises da porosidade e interface no micro-CT foram as mesmas que estavam no subcutâneo dos ratos, os tubos de dentina contendo os materiais foram removidos e cada tubo foi armazenado de acordo com o material e o período em uma estufa a 37°C com 95% de umidade. Como controle (baseline) foram utilizados outros tubos de dentina com os materiais recém espatulados de acordo com as instruções dos fabricantes e armazenados por 24 horas em uma estufa a 37°C com 95% de umidade para completo tempo de presa.

Porosidade

A análise de porosidade por micro-CT foi realizada com base em um estudo anterior^{135,136}. As amostras foram avaliadas por micro-CT (SkyScan 1176), utilizando como parâmetros tensão de 80 kV, corrente de 313 μ A, tamanho do pixel de 9 μ m e rotação de 360° com filtro de Cu + Al. A porosidade do material foi calculada em mm³ e porcentagem. A reconstrução das imagens foi realizada com o software NRecon (V1.6.4,7; Bruker-MicroCT).

Cada material teve os parâmetros de correção para suavização, endurecimento do feixe e artefatos de anel definidos. O software CTAn (V1.11.8; Bruker-MicroCT) foi usado para analisar as imagens. Os valores de porosidade para cada material e período foram avaliados em comparação como baseline. Um modelo 3D das cavidades preenchidas foi obtido pelo software CTAn e visualizado e salvo usando o programa CTVol (V2.0; Bruker-MicroCT).

-Interface dentina/material

O método utilizado para avaliar as diferenças nas porcentagens de vazios na interface entre a superfície dentinária das paredes do canal radicular e os materiais obturadores foi baseado em estudos anteriores^{12,13}. A distribuição 3D dos vazios da interface em um volume de interesse predefinido (VOI) foi calculada para cada grupo e comparada com a linha de base. Cada VOI 3D era um volume de interface de 40 microns de espessura consistindo dos 20 microns superficiais da dentina da parede do canal e os primeiros 20 microns do material obturador. Assim, vazios com tamanho de 5µm dentro do VOI foram detectados pelo nível de cinza limiar. Modelos 3D dos vazios foram criados usando o software CTAn (V1.15.4.0; Bruker-MicroCT, Kontich, Bélgica).

Análise estatística

A análise estatística foi obtida através do programa GraphPad Prism 5 software (Jandel Scientific, Sausalito, CA, USA). Os dados obtidos pelas análises da biocompatibilidade e bioatividade foram avaliados pelo two-way ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Os dados obtidos pelas análises de porosidade e interface foram submetidos ao one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Ambos com nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

Referências do Apêndice A

1. Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Lopes CS, Cerri PS, Guerreiro Tanomaru JM. Evaluation of the biological properties of two experimental calcium silicate sealers: an in vivo study in rats. *Int Endod J*. 2021; 54(1): 100-11.
2. Delfino MM, Abreu Jampani JL, Lopes CS, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E et al. Comparison of Bio-C Pulpo and MTA Repair HP with white MTA: effect on liver parameters and evaluation of biocompatibility and bioactivity in rats. *Int Endod J*. 2021; 54(9): 1597–613.
3. Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF da, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and bioactive potential of new calcium silicate-based endodontic sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *J Endod*. 2020; 46(10): 1470–7.
4. Silva GF, Bosso R, Ferino RV., Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, 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.
5. Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Immunoinflammatory response and bioactive potential of GuttaFlow, Bioseal and MTA Fillapex in the rat subcutaneous tissue. *Sci Rep*. 2020; 10(7173): 1–15.

6. Fonseca TS, Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J*. 2016; 49(2): 145–53.
7. Saraiva J, Fonseca T, Silva GF, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru J, Tanomaru-Filho M et al. Reduced interleukin-6 immunoexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. *Biomed Mater*. 2018; 13(3): 035002.
8. 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.
9. Puchtler H, Meloan SN. Demonstration of phosphates in calcium deposits: A modification of von Kossa's reaction. *Histochem*. 1978; 56(3–4): 177–85.
10. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: Quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012; 100(7): 1773–81.
11. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Bernabé PFE, Dezan 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.
12. Torres FFE, Zordan-Bronzel CL, Guerreiro-Tanomaru JM, Chávez-Andrade GM, Pinto JC, Tanomaru-Filho M. Effect of immersion in distilled water or phosphate-buffered saline on the solubility, volumetric change and presence of voids within new calcium silicate-based root canal sealers. *Int Endod J*. 2020; 53(3): 385-91.
13. Gandolfi MG, Parrilli AP, Fini M, Prati C, Dummer PMH. 3D micro-CT analysis of the interface voids associated with Thermafil root fillings used with AH Plus or a flowable MTA sealer. *Int Endod J*. 2013; 46(3): 253–63.

APÊNDICE B – SUBMISSÃO DOS ARTIGOS

Os artigos resultantes deste estudo já foram submetidos para tais revistas e os mesmos se encontram na seguinte situação:



International Endodontic Journal - Manuscript ID IEJ-22-00039

De: International Endodontic Journal
 Para: tanomaru@uol.com.br ,tanomaru@foar.unesp.br
 Cópia:
 Cópia oculta:
 Assunto: International Endodontic Journal - Manuscript ID IEJ-22-00039
 Enviada em: 24/01/2022 | 15:23
 Recebida em: 24/01/2022 | 15:23

24-Jan-2022

Dear Prof. Tanomaru-Filho

Your manuscript entitled "Evaluation of biocompatibility, bioactivity, porosity, and interface of bioceramic ready-to-use sealers using a dentin-tube model" has been successfully submitted online to the International Endodontic Journal.

Your manuscript ID is IEJ-22-00039.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the Editorial Office for questions. If there are any changes in your postal or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/iej> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Centre after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/iej>.

Thank you for submitting your manuscript to the International Endodontic Journal.

Kind regards

Hal Duncan
 Editor, International Endodontic Journal
 iej.office@wiley.com

International Endodontic Journal



Evaluation of biocompatibility, bioactivity, porosity, and interface of bioceramic ready-to-use sealers using a dentin-tube model

Journal:	International Endodontic Journal
Manuscript ID	IEJ-22-00039
Wiley - Manuscript Type:	Original Scientific Article
Keywords:	Biocompatibility, Bioactivity, Calcium silicate, Root canal filling material, Physicochemical properties, X-ray microtomography

SCHOLARONE™
 Manuscripts



Submission Confirmation for Biocompatibility, bioactive potential, porosity, and interface analys...

De: The Journal of Endodontics
 Para: tanomaru@uol.com.br
 Cópia:
 Cópia oculta:
 Assunto: Submission Confirmation for Biocompatibility, bioactive potential, porosity, and interface analys...
 Enviada em: 31/01/2022 | 12:47
 Recebida em: 31/01/2022 | 12:47

Dear Dr. Tanomaru-Filho,

Your submission entitled "Biocompatibility, bioactive potential, porosity, and interface analysis of root repair calcium silicate cements in a dentin tube model" has been received by the Journal of Endodontics.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Journal of Endodontics web site as an author.

The URL is <https://www.editorialmanager.com/joe/>

Your username is: tanomaru@uol.com.br

Can't remember your password?

To reset your password please try to sign in and click 'continue'. On the next screen click the 'forgot password' link and follow the steps to reset your password.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to the Journal of Endodontics.

Kind regards,

Journal of Endodontics

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/joe/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Journal of Endodontics

Biocompatibility, bioactive potential, porosity, and interface analysis of root repair calcium silicate cements in a dentin tube model --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JOE-22-75
Article Type:	Basic Research - Biology
Keywords:	Calcium silicate; biocompatibility; root repair materials; x-ray microtomography
Corresponding Author:	Mário Tanomaru-Filho, PhD Araraquara School of Dentistry Araraquara, SP BRAZIL
First Author:	Rafaela Nanami Handa Inada, MSc

ANEXO A- CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (CEUA)



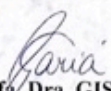
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE, POTENCIAL BIOATIVO, ALTERAÇÃO VOLUMÉTRICA E INTERFACE DENTINA/MATERIAL DE NOVOS CIMENTOS REPARADORES E ENDODÔNTICOS BIOCERÂMICOS*", registrada com o nº 04/2019, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Mário Tanomaru Filho** – 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 18/10/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Março/2022
Espécie/linhagem	Rato – Holtzman (Rattus norvegicus albinus)
Nº de animais	92
Peso/Idade	270g – 300g adultos jovens
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP



Prof.ª Dra. GISELE FARIA
1º Coordenador Substituto da CEUA

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.four@unesp.br • home page: http://www.four.unesp.br

ANEXO B- CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA DE SERES HUMANO (CEP)



ODONTOLOGIA - CAMPUS
ARARAQUARA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da biocompatibilidade, potencial bioativo, alteração volumétrica e interf. dentina/material de novos cimentos reparadores e endodônticos biocerâmicos

Pesquisador: Mario Tanomaru Filho

Área Temática:

Versão: 2

AAE: 12647319.8.0000.5416

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

Autorizador Principal: FUND COORD DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.402.773

Continuação do Parecer: 4.402.773

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda APROVADA em reunião de 13 de novembro de 2020.

O pesquisador deverá encaminhar relatórios parciais a cada 01 (um) ano até o prazo final da pesquisa, quando deverá encaminhar o relatório final.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1655064_E1.pdf	27/10/2020 18:06:13		Aceito
Outros	relatorio_parcial.pdf	27/10/2020 17:54:14	Mario Tanomaru Filho	Aceito
Cronograma	cronograma_de_execucao_novo.docx	27/10/2020 16:56:51	Mario Tanomaru Filho	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	24/04/2019 19:14:18	Mario Tanomaru Filho	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	02/04/2019 12:56:29	Mario Tanomaru Filho	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracao_dentes.pdf	01/04/2019 18:09:08	Mario Tanomaru Filho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado.doc	01/04/2019 17:53:18	Mario Tanomaru Filho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Lab_conf.pdf	30/01/2019 15:08:01	Mario Tanomaru Filho	Aceito
Outros	despesas.pdf	30/01/2019 15:01:44	Mario Tanomaru Filho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	compromisso.pdf	30/01/2019 15:00:48	Mario Tanomaru Filho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Lab_morfo.pdf	30/01/2019 14:58:43	Mario Tanomaru Filho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Lab_micro.pdf	30/01/2019 14:57:52	Mario Tanomaru Filho	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	nao_ressarcimento.pdf	30/01/2019 14:56:27	Mario Tanomaru Filho	Aceito

Continuação do Parecer: 4.402.773

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Material_biologico.pdf	30/01/2019 14:56:05	Mario Tanomaru Filho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Lab_mat.docx	30/01/2019 14:53:49	Mario Tanomaru Filho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensa_tcle.pdf	30/01/2019 14:05:08	Mario Tanomaru Filho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 17 de Novembro de 2020

Assinado por:
Andréa Gonçalves
(Coordenador(a))

Não autorizo publicação deste trabalho pelo prazo de dois anos.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 22 de março de 2024.

Rafaela Nanami Handa Inada