



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



Roberto Almela Hoshino

**Biocompatibilidade e potencial bioativo de cimentos endodônticos com
silicato de cálcio**

Araraquara
2020



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



Roberto Almela Hoshino

Biocompatibilidade e potencial bioativo de cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para Obtenção do grau de Doutor em Odontologia na Área de Endodontia

Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Araraquara
2020

Hoshino, Roberto Almela

Biocompatibilidade e potencial bioativo de cimentos endodônticos NeoMTA Plus e MTA Fillapex no subcutâneo de ratos / Roberto Almela Hoshino.-Araraquara: [s.n.], 2020. 70 f.; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia
Orientador: Prof. Dr. Paulo Sergio Cerri

1. Endodontia 2. Materiais dentários 3. Teste de materiais 4. Imuno-Histoquímica 5. Interleucina-6. I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB/5646
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Biocompatibilidade e potencial bioativo de cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de doutor em Odontologia

Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

2º Profª. Drª. Raquel Assed Bezerra Segato

3º Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva

3º Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

5º Profª. Drª. Gisele Faria

Araraquara, 24 de abril de 2020

Dados Curriculares

Roberto Almela Hoshino

NASCIMENTO: 10 de Outubro de 1990 – São José do Rio Preto – SP

FILIAÇÃO:

- Roberto Kioshi Hoshino
- Rosangela Maria Almela Hoshino

2009-2013: Graduação em Odontologia pelo Centro Universitário do Norte Paulista, UNORP, São José do Rio Preto – SP.

2014-2016: Mestrado em Odontologia, área de concentração em Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara.

Dedico esta tese às pessoas mais importantes da minha vida...

À **Deus**

Não há palavras que possam descrever minha gratidão. Obrigado pelo dom da vida, pela família maravilhosa e pelas pessoas especiais que estão ao redor. Toda a minha jornada foi abençoada com conquista.

Aos meus queridos pais, **Roberto e Rosangela**, exemplos de luta, dignidade e honestidade. Obrigado pela sua força, por sua dedicação, por toda a sua capacidade de compreensão, por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida. Esta vitória é nossa!

À minha irmã, **Isis**, pela convivência todos esses anos e que mesmo à distância sempre me ajudou e torceu pela minha vitória.

À minha noiva, **Daniely**, que me fez acreditar que sonhos são possíveis de serem realizados, mesmo quando todas as adversidades da vida dizem que não.

Ao meu amigo, **Prof. Dr. Guilherme**, admiro o senhor, além de ser um excelente profissional clínico, é também um formidável professor, ensina com carinho e amor. Agradeço imensamente por todas as oportunidades, aprendizado e pela confiança depositada.

A **Prof. Dra. Estela Sasso Cerri**, agradeço por todas as oportunidades, aprendizado, confiança, por sanar minhas dúvidas durante as aulas na graduação e pela ajuda na correção dos artigos!

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, pelas orientações teóricas, pela paciência, pelas palavras de alívio e conforto, por ter se tornado um grande amigo para a vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, nesse curto período, tive o privilégio de conviver e aprender muito com o senhor, mesmo diante de momentos adversos sempre se mostrou uma pessoa de grande competência e de integridade. Agradeço imensamente pelo carinho, respeito e pela orientação. Sua ajuda foi imprescindível para a concretizado desse estudo. Sinto me privilegiado por ser seu orientado. Em momentos difíceis, diante das minhas fraquezas e das incertezas, o senhor me aconselhou, transmitiu calma, segurança e amparo. Sei que estou muito distante de ter cumprido todas as suas expectativas, mas espero ter feito pelo menos o mínimo para honrar a confiança em mim depositada. Muito obrigado por tudo.

Ao **Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho**, sua generosidade, humildade, bondade, ética e conhecimento. Agradeço por todas as oportunidades, aprendizado e pela confiança em mim depositada.

Ao **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, sua generosidade, humildade, bondade, ética, conhecimento e paciência. Agradeço por me orientar no mestrado e por todas as lições transmitidas.

Aos colegas **Flavia, Fabi, Tiago Fonseca, Saraiva e Mateus** pela boa convivência e por estarem sempre dispostos a me ajudar. Sabemos bem que a Pós-graduação é feita de momentos bons, ruins e péssimos. Somos muitas vezes incumbidas de árduas tarefas, que faz duvidarmos da nossa própria capacidade. Apesar de estamos cercadas por diversas pessoas, que são nossos colegas e amigos de Pós-graduação, poucos estende uma mão amiga. Diante das minhas incertezas,

medos e momentos que eu não poderia fraquejar, vocês estiveram lá para me apoiar. Sou imensamente grato por isso e pela amizade

Aos colegas **Flavia, JP e Mateus Delfino**, admiro a determinação de vocês, o compromisso com a pós-graduação e a coragem de não se deixarem se deter diante dos obstáculos. A presença de vocês torna o departamento mais alegre e produtivo. Obrigada pela ajuda, amizade, risos e momentos descontraídos.

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.

"Olho para minhas mãos, descubro nela a leveza para alcançar o detalhe, a força exata para interferir na dor, a impermanência necessária para atingir o mais difícil, a sensibilidade que percebe o que não pode ser dito. No sorriso descubro a perfeição, que faz de minhas mãos um instrumento. A simplicidade que torna claro o mais difícil. A sensibilidade que me diz tudo sem nada dizer. Gestos, sorrisos, e expressões que unem dom e desejo, auxílio e agradecimento, odontologia e arte."

Autor desconhecido

Lista de Figuras

Figuras 1A e 1B: Preparação dos tubos de polietileno.....	27
Figuras 2A e 2B. Proporções de mistura dos cimentos	28
Figuras 3A, 3B e 3C : Inserção do tubo de polietileno	29
Figura 4: Fluxograma mostrando o planejamento experimental	30
Figuras 5A, 5B, 5C: Remoção do tubo de polietileno	30
Figura 6: Fluxograma mostrando as etapas do processamento histológico	31
Figuras 7A, 7B e 7C: Etapas do processamento histológico	32
Figura 8: Programa Image-Pro Express 6.0	33
Figura 9A e 9B: Imagens evidenciando a espessura das cápsulas.....	34
Figura 10: Quantificação das células positivas à IL-6 (em castanho) usando o programa Image-Pro Express 6.0 (Olympus – Japão)	35
Figura 11: - Imagem do programa <i>ImageJ</i> utilizado para a mensuração do colágeno birrefringente	37
Figuras 12A-12F: Fotomicrografias de cortes de cápsulas após 7 e 15 dias	41
Figuras 13A-13M: Fotomicrografias de cortes de cápsulas após 30 dias e gráficos	42
Figuras 14A-14M: Cortes submetidos à imuno-histoquímica e gráfico	45
Figuras 15A-15M: Cortes submetidos ao picrossirius-red e gráfico	48
Figuras 16A-16J: von Kossa e Cortes Não Corados Analisados Sob Luz Polarizada.....	51

Lista de Abreviaturas

Betazoid DAB: cromógeno 3.3-diaminobenzidina

BR: Brasil

Bi₂O₃: Óxido de bismuto

BSA: Bovine Serum Albumin

BV: Vaso sanguíneo

C: Cápsulas

Ca⁺²: Cálcio

CA: Califórnia

CaSO₄: Sulfato de cálcio

CaWO₄: Tungstato de cálcio

CEUA: Comitê de Ética no uso de animais.

CF: Feixes de fibras de colágeno

CP: Cimento Portland

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA: Estados Unidos da América

Fb: Fibroblastos

GC: Célula gigante multinucleada

FOAr: Faculdade de Odontologia de Araraquara

FL: Flórida

GraphPad Prism: GraphPad Software

hDPSCs: Células-tronco da polpa dental humana

HE: Hematoxilina e Eosina.

I: Espaço dos tubos de polietileno

ISO: International Organization for Standardization

IL-6: Interleucina 6

mm²: Milímetro quadrado

MTA: Agregado Trióxido Mineral

NaOCl: hipoclorito de sódio

OH⁻: Hidroxila

pH: Potencial Hidrogeniônico

Ru: Rússia

Saos-2: Células humanas semelhantes a osteoblastos

SiO₂: Sílica

Ta₂O₅: Óxido de tântalo

Tris-HCl: Tris(hidroximetil)aminometano HCl:Ácido clorídrico

µm: micrometro

3CaO•SiO₂:Silicato tricálcico

2CaO•SiO₂: Silicato dicálcico

PR: Paraná

Hoshino RA. Biocompatibilidade e potencial bioativo de cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a reação tecidual e bioatividade provocada por NeoMTA Plus e MTA Fillapex em subcutâneo de ratos. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para este estudo foram utilizados 60 ratos Holtzman, sendo distribuídos aleatoriamente em três grupos (n= 20): NeoMTA Plus (Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, EUA), MTA Fillapex (Angelus Ciência e Tecnologia, Londrina - PR – Brasil) e Controle (tubos de polietileno vazios). Para avaliar a reação tecidual provocada pelos materiais, foram implantados tubos de polietileno preenchidos com os cimentos endodônticos no tecido conjuntivo do subcutâneo na região dorsal dos ratos. No grupo controle (GC), tubos de polietileno vazios foram implantados. Após os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, cinco animais de cada grupo por período foram eutanasiados e os tubos implantados com os tecidos adjacentes foram removidos e submetidos ao processamento para inclusão em parafina. A partir dos cortes corados com HE, foram realizadas análises morfológicas, mensuração da espessura da cápsula e densidade numérica de células inflamatórias. Os cortes foram também submetidos à reação imuno-histoquímica para detecção de interleucina-6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória, e o número de células imunopositivas foi computado. A quantidade de colágeno nas cápsulas foi estimada a partir de cortes submetidos ao método do picrosirius-red e analisados sob luz polarizada. A bioatividade dos cimentos endodônticos foi avaliada por meio da reação histoquímica von Kossa e a análise sob luz polarizada. Os dados foram submetidos à ANOVA a dois critérios e teste post hoc de Tukey ($p < 0,05$). **RESULTADOS:** Aos 7 dias, as cápsulas ao redor do NeoMTA Plus e MTA Fillapex exibiram maior número de células inflamatórias do que no GC. No entanto, não foi observada diferença significativa no número de células inflamatórias entre o NeoMTA Plus e o GC ($p = 0,1117$) aos 60 dias. Nesse período, não foi detectada diferença significativa no número de células inflamatórias entre as amostras NeoMTA Plus e MTA Fillapex ($p = 0,4062$), embora tenha sido observada uma maior imunoexpressão de IL-6 no MTA Fillapex ($p = 0,0353$). De 7 para 60 dias, observou-se uma redução significativa na espessura das cápsulas do NeoMTA Plus e MTA Fillapex em paralelo ao aumento significativo no colágeno. As estruturas von Kossa positivas e birrefringentes foram observadas nas cápsulas adjacentes aos cimentos endodônticos. **CONCLUSÕES:**

Considerando que o NeoMTA Plus e o MTA Fillapex são biocompatíveis e exibem bioatividade, estes cimentos endodônticos podem ser uma alternativa viável para uso clínico.

Palavras – chave: Endodontia. Materiais dentários. Teste de materiais. Imuno-Histoquímica. Interleucina-6.

Hoshino RA. Biocompatibility and bioactive potential of endodontic sealers based on calcium silicate [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

To evaluate the tissue reaction and bioactivity caused by NeoMTA Plus and MTA Fillapex in connective tissue of subcutaneous. **MATERIAL AND METHODS:** For this study, 60 Holtzman male rats were used, which were randomly distributed in three groups (n = 20): NeoMTA Plus (Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, USA), MTA Fillapex (Angelus Ciência e Tecnologia, Londrina - PR - Brazil) and Control (empty polyethylene tubes). To verify the tissue reaction caused by root canal sealers, the polyethylene tubes were filled with endodontic sealers and were implanted into dorsal subcutaneous tissues. In the control group (CG), empty polyethylene tubes were implanted. After 7, 15, 30 and 60 days, five animals from each group per period were sacrificed and implants surrounded by tissues were removed and processed for paraffin-embedding. From HE-stained sections, the morphological analysis, measurement of capsule thickness and numerical density of inflammatory cells were carried out. Sections were also subjected to immunohistochemical reaction to detect interleukin-6, a pro-inflammatory cytokine, and the number of immunopositive cells was computed. The amount of collagen in the capsules was measured in the sections stained with picosirius-red method and analyzed under polarized light. The bioactivity of endodontic sealers was evaluated by von Kossa histochemical reaction and the analysis of under polarized light. The data were submitted to two-way ANOVA and post-hoc Tukey test ($p < 0.05$). **RESULTS:** At 7 days, the capsules around NeoMTA Plus and MTA Fillapex exhibited a greater number of inflammatory cells than in the CG. However, no significant difference was observed in the number of inflammatory cells between NeoMTA Plus and CG ($p = 0.1137$) at 60 days. In this period, significant difference in the number of inflammatory cells was not also detected between NeoMTA Plus and MTA Fillapex specimens ($p = 0.4062$), although a higher IL-6-immunoexpression was observed in the MTA Fillapex specimens ($p = 0.0353$). From 7 to 60 days, a significant reduction in the capsule thickness of NeoMTA Plus and MTA Fillapex was observed in parallel to a significant increase in the collagen. von Kossa-positive and birefringent structures were observed in the capsules of root canal sealers. These findings indicate that NeoMTA Plus and MTA Fillapex can be a viable alternative

for clinical use since these endodontic sealers are biocompatible and exhibit bioactivity.

Keywords: Endodontics. Dental materials. Materials testing. Immuno-histochemistry. Interleukin-6.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 PROPOSIÇÃO	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
4 MATERIAL E MÉTODO	26
4.1 Material	26
4.2 Método	28
4.3 Processamento Histológico	31
4.4 Análise da Reação Inflamatória nas Cápsulas	32
4.4.1 Densidade numérica de células inflamatórias	32
4.4.2 Mensuração da espessura da cápsula	33
4.4.3 Detecção imuno-histoquímica da IL-6	34
4.4.4 Densidade numérica de células positivas à IL-6	35
4.4.5 Mensuração do colágeno birrefringente	36
4.5 Análises para Avaliar a Capacidade de Bioatividade dos Cimentos Endodônticos	37
4.5.1 Reação histoquímica von Kossa	37
4.5.2 Análise dos cortes não corados com luz polarizada	38
4.6 Análise Estatística	38
5 RESULTADO	39
5.1 Descrição Morfológica, Densidade Numérica de Células Inflamatórias e Espessura das Cápsulas	39
5.2 Interleucina-6	44
5.3 Conteúdo de Colágeno	47
5.4 von Kossa e Cortes Não Corados Analisados Sob Luz Polarizada	50
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A	69
ANEXO B	70

1 INTRODUÇÃO

Os materiais à base de silicato de cálcio são amplamente atraentes na odontologia devido às suas propriedades biológicas e físico-químicas¹⁻³. Os materiais à base de silicato tricálcico têm sido amplamente estudados, pois estimulam o reparo tecidual permitindo a deposição de tecido mineralizado^{4,5}. Embora seja um material biocompatível e utilizado para diversas aplicações, dentre elas no tratamento de perfuração de furca ou radicular, retro-obturação em microcirurgia apical, capeamento pulpar, pulpotomia e reparo radicular⁶⁻⁸, o Agregado de Trióxido Mineral (MTA) apresenta algumas desvantagens⁶. Sua consistência após a manipulação impede sua inserção no canal radicular⁹. Para superar essas desvantagens, os fabricantes realizaram alterações na sua composição química, bem como na proporção de diferentes veículos e componentes nos materiais à base de silicato tricálcico. Os cimentos endodônticos à base de MTA contêm principalmente silicato tricálcico e bicálcico⁴, com adição de agentes radiopacificantes, óxido de tântalo e tungstato de cálcio. Os cimentos endodônticos à base de MTA são designados como bioativos quando possuem a capacidade de desenvolver uma ligação estável com tecidos vivos via a deposição de hidroxiapatita¹⁰, ou seja, em contato com fluidos biológicos formam uma camada interfacial na superfície do material, na interface material/dentina e nos túbulos dentinários¹⁰. Acredita-se que essa camada interfacial contendo cristais de apatita pode reduzir a microinfiltração e aumentar a força de tração, melhorando a adaptação e induzindo a remineralização^{11,12}.

O NeoMTA Plus é um material bioativo composto por partículas finas de tricálcio e silicato bicálcico, tantalita, sulfato de cálcio e sílica, conforme indicado pelo fabricante com um curto tempo de endurecimento e não promove a pigmentação da dentina¹³. Além do cimento em pó, o NeoMTA Plus contém um gel à base de água que, de acordo com a proporção pó-gel misturado, fornece um material com consistência variada⁷. Assim, o material com consistência fluida pode ser usado como preenchimento de canal radicular, enquanto uma mistura densa é indicada como cimento obturador de canais radiculares^{7,14}. Um estudo *in vitro* avaliou o efeito do NeoMTA Plus espesso (material de reparo) em cultura de células humanas semelhantes a osteoblastos (Saos-2) e demonstrou que esse material induz a formação de nódulos mineralizados, indicando um potencial bioativo^{6,15}.

A primeira versão do MTA Fillapex (Angelus Dental Industry S/A, Londrina, Brasil) consistia em aproximadamente 13,2% de silicato tricálcico¹⁶, com adição de resina natural, resina salicilada, óxido de bismuto, nanopartículas de sílica e pigmentos^{17,18}. Segundo o fabricante, as propriedades do MTA Fillapex incluem boa radiopacidade, bom tempo de trabalho e facilidade de manuseio¹⁸. Como o óxido de bismuto inibe várias propriedades, incluindo a proliferação celular¹⁹, esse radiopacificador foi substituído pelo tungstato de cálcio na tentativa de melhorar suas propriedades biológicas. Embora o MTA Fillapex com tungstato de cálcio tenha promovido inicialmente um infiltrado inflamatório moderado no tecido conjuntivo subcutâneo, foi observada uma redução na imunexpressão da interleucina-6, uma citocina pró-inflamatória ao longo do tempo. Além disso, o índice apoptótico nas cápsulas ao redor das amostras MTA Fillapex foi semelhante ao do grupo controle após 60 dias de implantação, indicando que a integridade estrutural dos tecidos é recuperada com o decorrer do tempo²⁰. Assim, considerando que escassos são os estudos envolvendo NeoMTA Plus e o MTA Fillapex com o tungstato de cálcio, torna-se oportuno a avaliação da reação tecidual e bioatividade destes cimentos à base de silicato de cálcio. A hipótese nula foi de que o selante NeoMTA Plus não seria biocompatível e não apresentaria potencial bioativo.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a reação tecidual provocada por NeoMTA Plus em comparação ao MTA Fillapex em subcutâneo de ratos. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar morfológica e quantitativamente o processo inflamatório induzido por NeoMTA Plus e MTA Fillapex.
- Analisar a imunoexpressão para interleucina-6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória, nas cápsulas adjacentes ao NeoMTA Plus e comparar ao MTA Fillapex.
- Investigar se ocorre o processo de substituição da reação inflamatória por tecido conjuntivo denso nas cápsulas formadas em resposta aos implantes de NeoMTA Plus e MTA Fillapex em subcutâneo de ratos.
- Avaliar o potencial bioativo dos materiais, utilizando o método histoquímica von Kossa e a análise de estruturas birrefringentes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Na terapia endodôntica, a eliminação de micro-organismos dos canais radiculares, bem como a prevenção de futuras infecções após a obturação dos canais radiculares estão diretamente relacionados ao sucesso do tratamento²¹⁻²³. Após preparo e desinfecção do canal radicular^{23,24}, o cimento deve preencher irregularidades do sistema de canais radiculares, procurando minimizar a desadaptação entre as paredes dentinárias e o guta-percha²⁶, impedindo a recolonização, multiplicação e crescimento de micro-organismos residuais^{27,28}. Além disso, os cimentos endodônticos devem apresentar excelente selamento, estabilidade dimensional, tempo de trabalho adequado, baixa solubilidade aos fluídos tissulares, adequada adesão às paredes do canal, fácil inserção e remoção, radiopacidade, baixo custo²⁹, ação bactericida e/ou bacteriostática³⁰ e biocompatibilidade³¹.

Os cimentos endodônticos podem ser classificados em diferentes grupos, de acordo com seus principais componentes³², tais como óxido de zinco e eugenol, hidróxido de cálcio, resina epoxica, silicato de cálcio. A composição dos cimentos endodônticos desempenha um papel de suma importância em diversas propriedades, tais como físicas, químicas, mecânica, antimicrobiana e biocompatibilidade¹⁸.

Estudos têm sido desenvolvidos para associar as propriedades biológicas do MTA a um material obturador^{14,33-36}. Em 2011, foi lançado no mercado o MTA Fillapex (Angelus Ciência e Tecnologia, Londrina - PR – Brasil), com a proposta, de acordo com o fabricante, de oferecer um cimento endodôntico à base de MTA, portanto, com as propriedades biológicas deste material. O MTA Fillapex é constituído por 20-25% de resina salicilato, 20-25% de diluente para resina, 20-25% de trióxido de bismuto, dióxido de silício 1-5% e dióxido de titânio 1-10%³⁶ e 13,2% de silicato tricálcico-cálcio¹⁶.

Estudos têm reportado que o MTA Fillapex exibe escoamento adequado, bom selamento, baixa solubilidade^{38,39}, boa radiopacidade⁴⁰, fornece um pH alcalino⁴¹, favorecendo a atividade antimicrobiana¹⁴, tornando o meio desfavorável para proliferação e sobrevivência bacteriana⁴². A biocompatibilidade e bioatividade deste cimento baseia-se na produção de matriz, proliferação e indução de células ósseas⁴², estímulo a formação de cristais de apatita⁴⁴. No entanto, são conflitantes os resultados relacionados às propriedades desse cimento⁴⁵⁻⁴⁹. Há evidências de que este cimento

apresenta citotoxicidade⁴³, reação inflamatória intensa após 10, 30 e 60 dias de implantação no subcutâneo de ratos⁴⁶, baixa adesão a dentina⁵⁰ e alta solubilidade⁴⁰. Resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que, embora inicialmente este material induza uma resposta inflamatória significativa, há redução da reação e a formação de cápsulas finas contendo fibras de colágeno. Além disso, as cápsulas formadas em resposta ao MTA Fillapex com óxido de bismuto (Bi_2O_3) apresentaram uma redução acentuada no número de células positivas à interleucina-6 (IL-6) em comparação ao AH Plus, após 60 dias aos implantes⁵¹. Um inconveniente deste cimento é o fato deste induzir alterações das propriedades ópticas em dentes humanos⁵². A pigmentação da estrutura dentária também pode ser decorrente da interação química das substâncias que este cimento endodôntico contém, como por exemplo o Bi_2O_3 , com as principais soluções irrigadores utilizadas no tratamento endodôntico, à base de hipoclorito de sódio⁵³. No entanto, estes cimentos apresentam baixo teor de MTA (13,2%) sugerindo que sejam incapazes de liberar quantidades favoráveis de íons Ca^+ , comprometendo a sua resposta tecidual⁶⁸.

O Bi_2O_3 confere a radiopacidade aos materiais⁵⁴, propriedade responsável por distinguir as estruturas anatômicas adjacentes, tais como, dentina e osso alveolar, dos materiais obturadores⁵⁵. No entanto, altera a microestrutura das partículas causando diversas falhas internas no cimento⁵⁶, aumentando a porosidade e a solubilidade e, consequentemente, contribuindo para a redução da resistência mecânica do material⁵⁷. Assim, o uso de radiopacificadores substitutos ao Bi_2O_3 vem sendo estudado⁵⁸⁻⁶¹. Mais recentemente, a composição do MTA Fillapex foi reformulada pela substituição do Bi_2O_3 por tungstato de cálcio (CaWO_4). De acordo com o fabricante, a reformulação proporciona alta radiopacidade, baixa expansão de presa, baixa solubilidade em contato com os fluidos tissulares, excelente viscosidade para obtenção de canais radiculares, não altera a cor da estrutura dental, e não interfere com os materiais de restauração resinosos. O CaWO_4 , extraído do mineral chileíta, possui partículas globulares⁶⁰ e é adquirido por meio da mistura estequiométrica de óxido de cálcio, carbonato de cálcio e ácido tungstênico⁶².

O CaWO_4 quando utilizado como radiopacificador do cimento Portland (CP), não interfere com a reação do CP mantendo as propriedades físicas e químicas deste cimento^{17,63}, o que pode contribuir para o sucesso no tratamento endodôntico. Em associação a cimentos de silicato de cálcio, essa substância fornece alta resistência à compressão⁶⁴, baixa solubilidade, radiopacidade superior à dentina⁶³, tempo de

presa semelhante ao MTA¹⁷, porosidade menor que 5 μm^{60} e ação antimicrobiana⁶⁵.

No entanto, foi reportado que a incorporação desse agente radiopacificador ao cimento Portland pode ocasionar a formação de falhas, permitindo a infiltração de bactérias⁶⁶. Além disso, foi relatado que o CaWO_4 pode aumentar a solubilidade de um cimento endodôntico à base de resina epóxica⁶⁷, ocasionando um alto potencial citotóxico devido a ativação do componente resinoso. Portanto, ainda são necessários estudos para melhor elucidar as alterações que o MTA Fillapex contendo o CaWO_4 pode promover quando em contato com os tecidos, particularmente, o tecido conjuntivo presente na região periapical.

Devido as propriedades biológicas do material à base de silicato, Avalon Biomed Inc, Bradenton, FL) lançou no mercado o MTA Plus⁶⁹, sistema composto por partículas inorgânicas de silicato tricálcico e óxido de bismuto. Este material possui indicações para capeamento pulpar, pulpotomia, cimento obturador (pulpectomia), apexificação, selamento de perfurações e reabsorção interna e externa. O MTA Plus possui resistência à *washout* superior ao MTA- Angelus e cimento Portland, sendo justificado pela força de coesão entre as partículas de atração adjacentes e pela presença de um polímero solúvel em água presente no gel⁷⁰. A resistência do MTA Plus à compressão é semelhante a exibida pelo MTA⁶⁹.

O MTA Plus apresenta baixa citotoxicidade as células de polpa humana, e estimula a formação de nódulos de mineralização *in vitro*⁷¹. O Bi_2O_3 , radiopacificador encontrado na formulação do MTA Plus, quando hidratado com água ou solução salina balanceada de Hank, apresenta na superfície do material, microtrinca, lixiviação do hidróxido de cálcio e descalcificação parcial do silicato de cálcio hidratado⁷². O MTA Plus apresenta maior porosidade e solubilidade quando hidratado em água em comparação ao ProRoot MTA⁷³. Além disso, um ensaio biológico *in vitro* constatou que os MTA Plus branco e cinza apresentam citotoxicidade⁷⁴.

Em 2014, considerando as desvantagens da adição do Bi_2O_3 , foi lançado no mercado o NeoMTA Plus, com composição semelhante ao MTA Plus, porém com a substituição do Bi_2O_3 pelo óxido de tântalo (Ta_2O_5), como radiopacificador. O tântalo trata-se de um metal altamente radiopaco devido a seu elevado número atômico (72)⁷⁵, utilizado na área da saúde no tratamento de superfície de implantes⁷⁵⁻⁷⁷, placas e membranas ortopédica devido à sua inércia^{76,78}. Um estudo demonstrou que o NeoMTA Plus quando utilizado como material reparador induz a formação do hidróxido de cálcio, sendo indicado para o tratamento de dentes imaturos, por

favorecer a formação de pontes de dentina e a formação continuada da raiz, bem como fornece boa radiopacidade com valor ao redor de 5 mm Al⁷⁹ e possui tempo de presa prolongado e maior liberação de hidroxila em comparação ao MTA Plus⁷. Este material reparador induz a atividade de fosfatase alcalina e a formação de nódulos mineralizados quando avaliados em cultura de células da linhagem Saos-2¹⁵.

O gel fornece ao cimento facilidade de manipulação com consistência variada, possibilitando sua utilização como cimento endodôntico ou material retrobturador¹⁴. O NeoMTA Plus possui alto grau de penetrabilidade nos túbulos dentinários¹⁴ e apresenta excelente adaptação marginal em obturação retrógada³⁶. A exposição à solução irrigante de hipoclorito de sódio (NaOCl) não reduz a sua resistência à compressão⁸⁰, propriedade importante quando utilizado em situações clínicas, tais como tratamento de polpa vital e barreiras coronais⁸¹. No entanto, o mesmo estudo apontou que há redução nesta propriedade quando utilizado a solução irrigante de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)⁸⁰. Os testes biológicos apontam um grau adequado de citocompatibilidade em células-tronco da polpa dental humana (hDPSCs) e boas taxas de migração celular^{2,43}. Quando avaliado com consistência de material reparador em subcutâneo de ratos e testados em períodos longos não foram observados granulomas, células gigantes ou abscessos, o que foi semelhante ao grupo controle e mostrou biocompatibilidade⁸². O NeoMTA Plus em contato com os tecidos pulpare e periapicais em cães permitiu a neoformação óssea e de cimento e o reparo pulpar em até 90 dias¹.

Em suma, os cimentos MTA Fillapex contendo o CaWO₄ como radiopacificador e NeoMTA Plus constituem alternativas disponíveis atualmente para uso clínico e há escassez de trabalhos que avalie o NeoMTA Plus em consistência de cimento obturador. Portanto, a avaliação é importante para dar suporte biológico ao seu uso bem como melhor entender a cascata de eventos celulares causada pelos materiais endodônticos. A biocompatibilidade do cimento endodôntico é uma das condições básicas para o sucesso do tratamento endodôntico e reparo da região periodontal⁸³. Uma vez que, em contato com a região periapical o cimento endodôntico pode liberar substâncias, que estimulam a migração e a diferenciação das células inflamatórias, ocasionadas pela irritação, degeneração ou necrose tecidual^{84,85}.

Um dos métodos para avaliar a biocompatibilidade de cimentos endodônticos é a utilização de implantes em subcutâneo de ratos. O uso de implantes de tubos de polietileno tem como objetivo avaliar a reação do tecido conjuntivo subcutâneo

ocasionada por diferentes materiais³². A metodologia utilizada neste estudo é recomendada por organizações internacionais como *American National Standar/American Dental Associations Standard No. 41*⁸⁶ e *International Organization for Standardization – ISO 10993 (2016)*⁸⁷, que buscam a uniformização.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

O protocolo da presente pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOAr/UNESP (Processo CEUA nº 11/2017).

Foram utilizados 60 ratos *Holtzman*, adultos jovens, machos, pesando em média 200g (aproximadamente 75 dias), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP). Os animais foram mantidos no Biotério do Subsolo do Prédio de Biomorfológicas da Faculdade de Odontologia (UNESP-Araraquara) em gaiolas de polietileno forradas com maravalha, com temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) controladas, e o fotoperíodo de 12 horas. Os animais receberam ração (Guabi Nutri Labor, Brasil) e água *ad libitum*. A maravalha das gaiolas foi trocada, no mínimo, três vezes por semana; a limpeza das gaiolas e bebedouro foram também realizadas, a fim de manter a higiene do seu ambiente e, portanto, evitar desconforto aos animais.

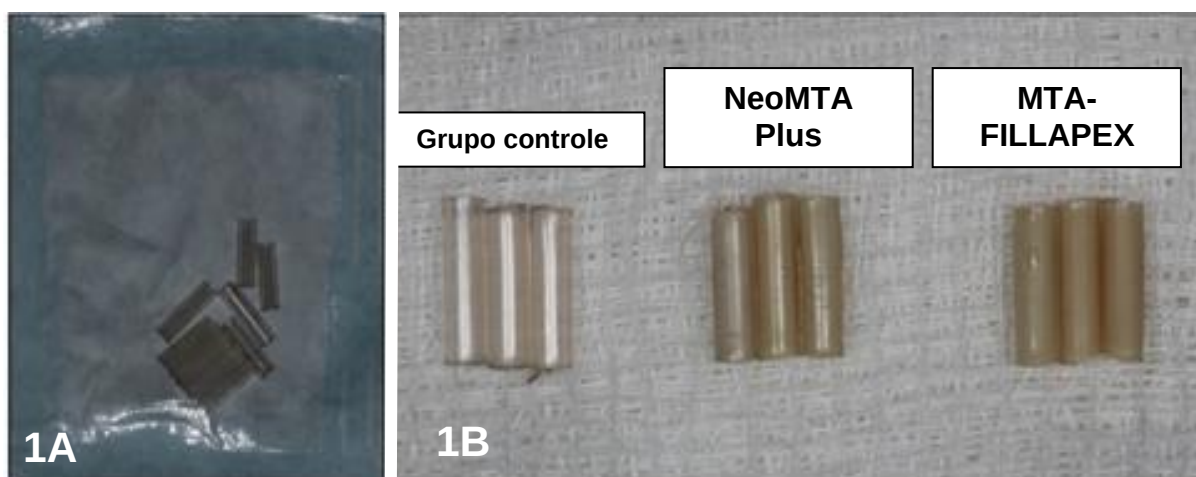
Os animais foram distribuídos equitativamente em três grupos: NeoMTA Plus, MTA Fillapex e controle (GC, tubos de polietileno vazios) (Figuras 1A e 1B). As respectivas composições e marcas comerciais destes produtos estão relacionadas no Quadro 1. As proporções do MTA Fillapex (pasta/pasta) e a pesagem do pó do NeoMTA Plus estão ilustradas nas Figuras 2A e 2B.

Quadro 1 – Composição, proporção usada na mistura dos cimentos e dados referentes a sua fabricação

Cimentos	Composição	Relação pó/líquido	Fabricante
NeoMTA Plus	Pó: Silicato tricálcico ($3\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), óxido de tântalo ($\text{Ta}_2\text{O}_5$), silicato dicálcico ($2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$), sulfato de cálcio ($\text{CaSO}_4$) e sílica ($\text{SiO}_2$). Líquido: gel à base de água com agentes espessantes e polímeros solúveis em água.	1 colher de pó; 3 gotas de gel. Consistência fluida	Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, EUA.
MTA-FILLAPEX	Pasta Base: Resina salicilato, resina natural, tungstato de cálcio, sílica nanoparticulada, pigmentos. Pasta Catalisadora: Resina diluente, mineral trióxido agregado, sílica nanoparticulada, pigmentos.	Proporção de mistura de 1:1.	Angelus Ciência e Tecnologia, Londrina - PR – BR.

Fonte: Elaboração própria.

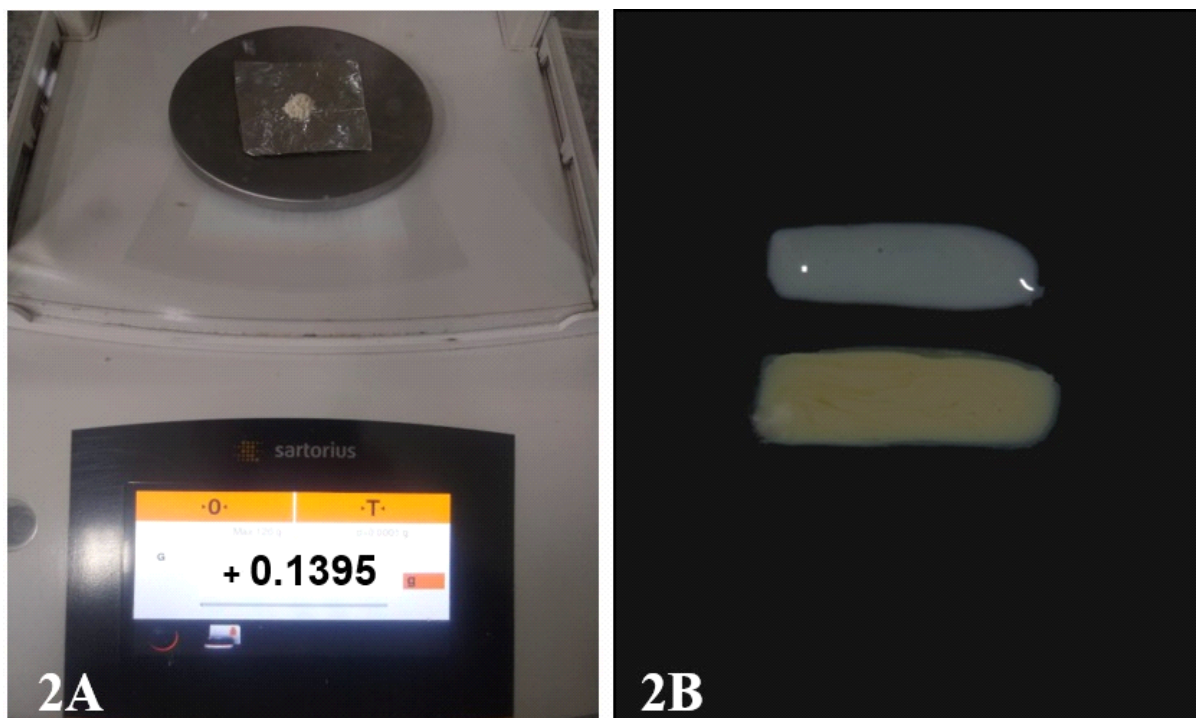
Figuras 1A e 1B - Preparação dos tubos de polietileno



1A e 1B - Preparação dos tubos de polietileno; **1A** – Tubos de polietileno previamente esterilizado com óxido de etileno. **1B** – Tubos de polietileno usados nos grupos controle (GC), NeoMTA Plus e MTA Fillapex para a inserção no subcutâneo de ratos.

Fonte: Elaboração própria.

Figuras 2A e 2B - Proporções de mistura dos cimentos



2A e 2B - Representam as proporções de mistura dos cimentos NeoMTA Plus e MTA Fillapex. **2A** – Proporção de pó do cimento NeoMTA Plus (pó/gel); **2B** Proporção de mistura do cimento MTA Fillapex (pasta/pasta).

Fonte: Elaboração própria.

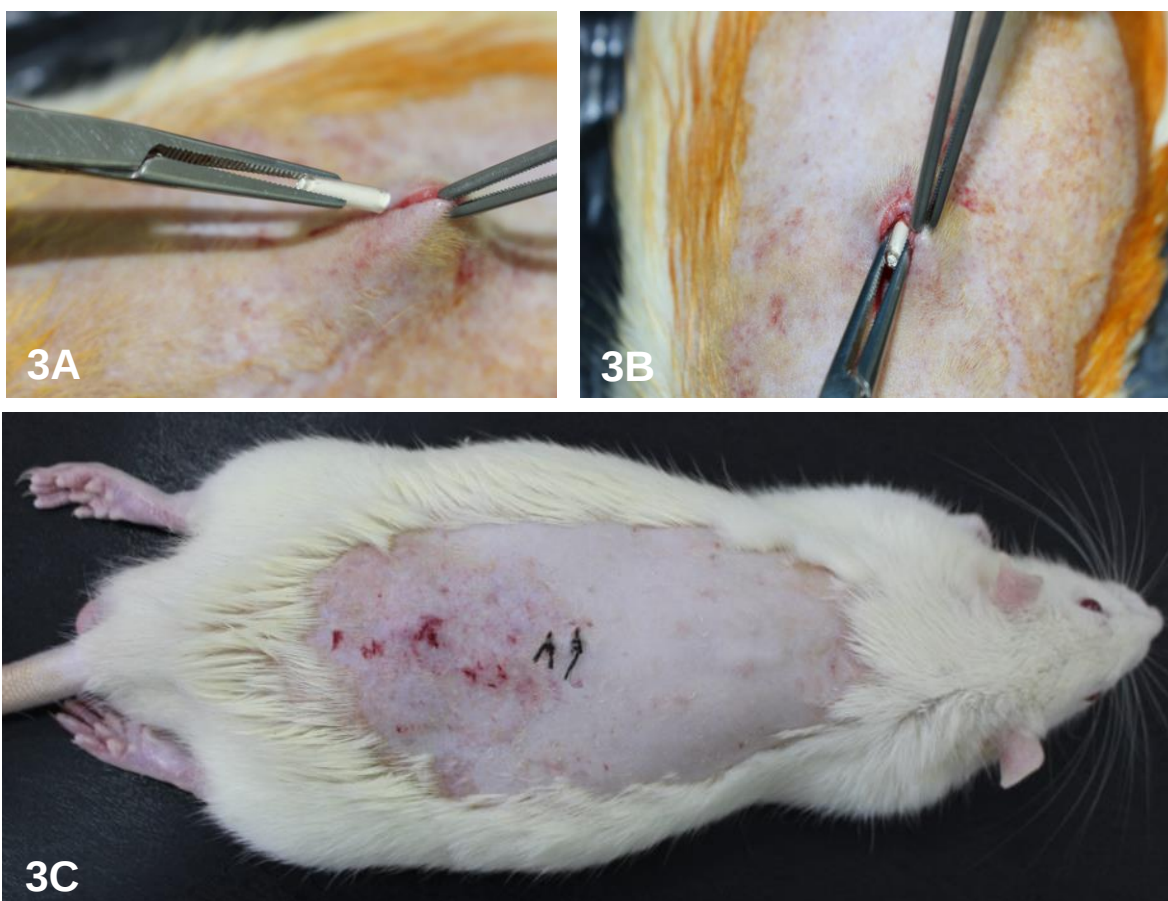
4.2 Método

Os animais foram anestesiados com 0,08 mL/100 g (80 mg/kg) de peso corporal de cloridrato de cetamina a 10% (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil), associada a 0,04 mL/100 g (8 mg/kg) de peso corporal de cloridrato de xilazina a 2% (União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, SP, Brasil), administrada com seringa e agulha de insulina por via intraperitoneal.

Os materiais foram manipulados e inseridos em tubos de polietileno (Embramed Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil) medindo 10 mm de comprimento x 1,5 mm de diâmetro, previamente esterilizado com óxido de etileno ³² (Figura 1A). Além disso, tubos de polietileno vazios (Grupo Controle) também foram implantados. Após a tricotomia e assepsia com solução de iodo a 5%, com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15 (Fibra Cirúrgica, Joinville, SC, Brasil) foi realizada uma incisão na pele com aproximadamente 1,5 cm no sentido craniocaudal. A pele foi divulsionada com tesoura de ponta romba, para a obtenção de uma bolsa no subcutâneo para colocação do implante. O tubo preenchido com um dos materiais ou

os tubos vazios foram implantados (1 tubo em cada animal), no subcutâneo dorsal (Figuras 3A e 3B). O local da incisão foi suturado em pontos simples utilizando fio de seda (Seda 4-0, ETHICON, São José dos Campos, SP, Brasil) (Figura 3C). Os animais foram, então, colocados em gaiolas, devidamente identificados de acordo com o grupo e o período de eutanásia sendo observados até a recuperação da anestesia. Conforme mostra a Figura 4, após 7, 15, 30 e 60 dias à implantação dos tubos de polietileno, os animais foram sacrificados com “overdose” de solução anestésica (cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina) para a remoção dos implantes com os tecidos circundantes (Figuras 5A, 5B e 5C). Foram realizados 5 implantes para cada grupo para cada período, totalizando o uso de 15 animais por período (Figura 4).

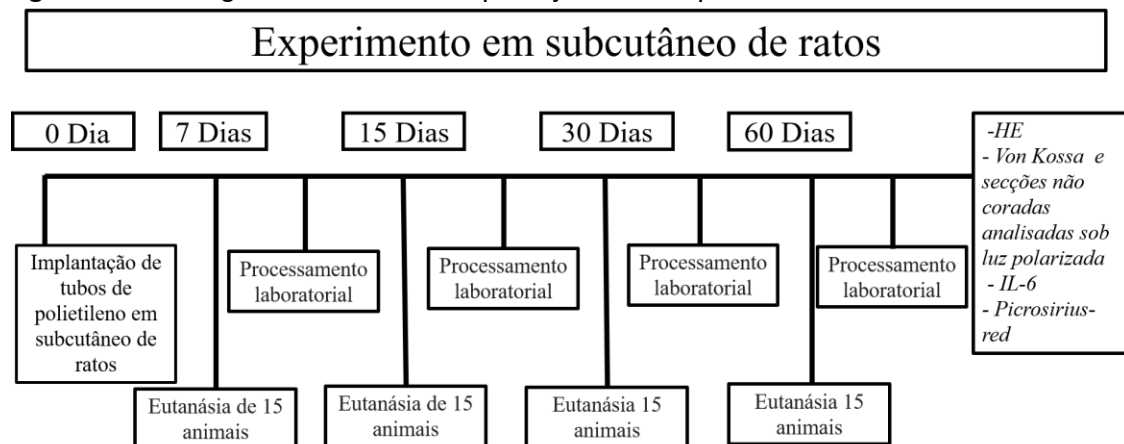
Figuras 3A, 3B e 3C – Inserção do tubo de polietileno



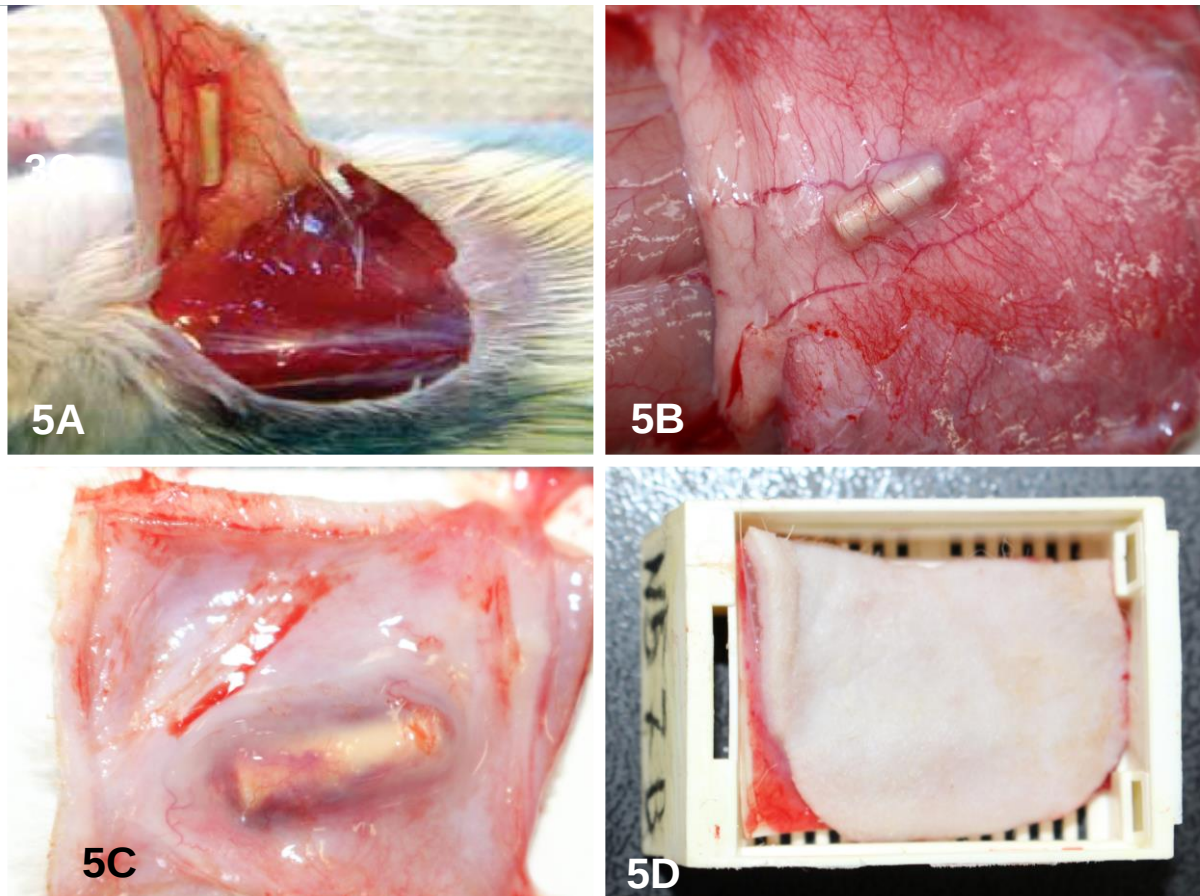
3A, 3B e 3C – Inserção do tubo de polietileno inserido no subcutâneo de rato.

3A e 3B – Tubo de polietileno sendo inserido no subcutâneo do rato. **3C** - Sutura realizada após inserção do tubo de polietileno.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 4 – Fluxograma mostrando o planejamento experimental

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figuras 5A, 5B e 5C - Remoção dos tubos de polietileno

5A, 5B e 5C - Remoção dos tubos de polietileno inseridos no subcutâneo do rato após 7 dias. **5A** – Momento da remoção do tubo de polietileno com os tecidos circunjacentes. **5B** - Tubo de polietileno aderido aos tecidos circunjacentes. **5C** – Tubo de polietileno com os tecidos circundantes estirado sobre o papel de filtro. **5D** - Tubo de polietileno com os tecidos circundantes colocado em cassete para processamento laboratorial.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.3 Processamento Histológico

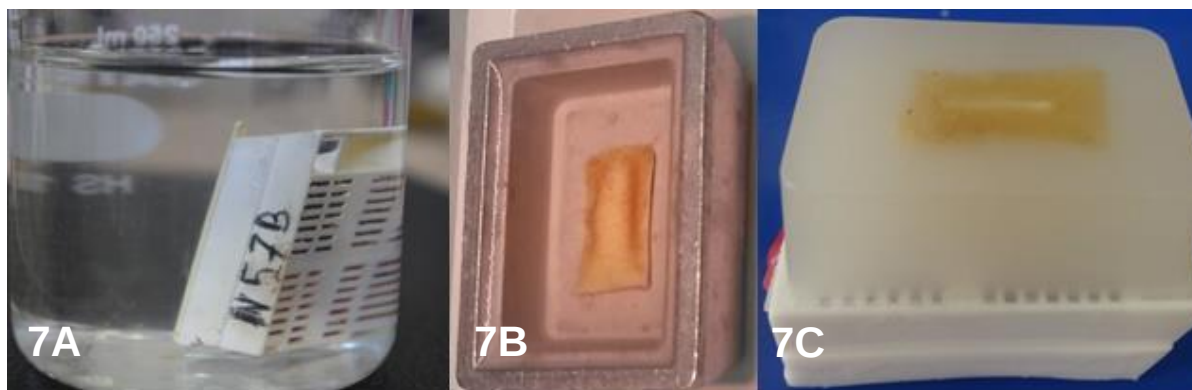
Os espécimes contendo os tubos de polietileno implantados foram fixados em formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído) tamponado com fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2 por 48 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, os espécimes foram desidratados, diafanizados e embebidos em parafina (Figuras 6, 7A, 7B e 7C). Cortes longitudinais com espessura de 6 μ m foram aderidos às lâminas de vidro e corados com hematoxilina e eosina (HE) ou picrosirius-red para realização das análises. Em dois cortes não seriados de cada implante foi realizada a reação de von Kossa para detecção de cálcio. Alguns cortes foram aderidos em lâminas silanizadas para a reação imuno-histoquímica para detecção de interleucina-6 (IL-6).

Figura 6 – Fluxograma mostrando as etapas do processamento histológico.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figuras 7A, 7B e 7C – Etapas do processamento histológico



7A, 7B e 7C – O espécime contendo o implante envolvido pelos tecidos do subcutâneo embebido em parafina. **7A e 7B** - O espécime em parafina líquida durante a inclusão. **7C** - O espécime incluído em parafina e o bloco pronto para a microtomia

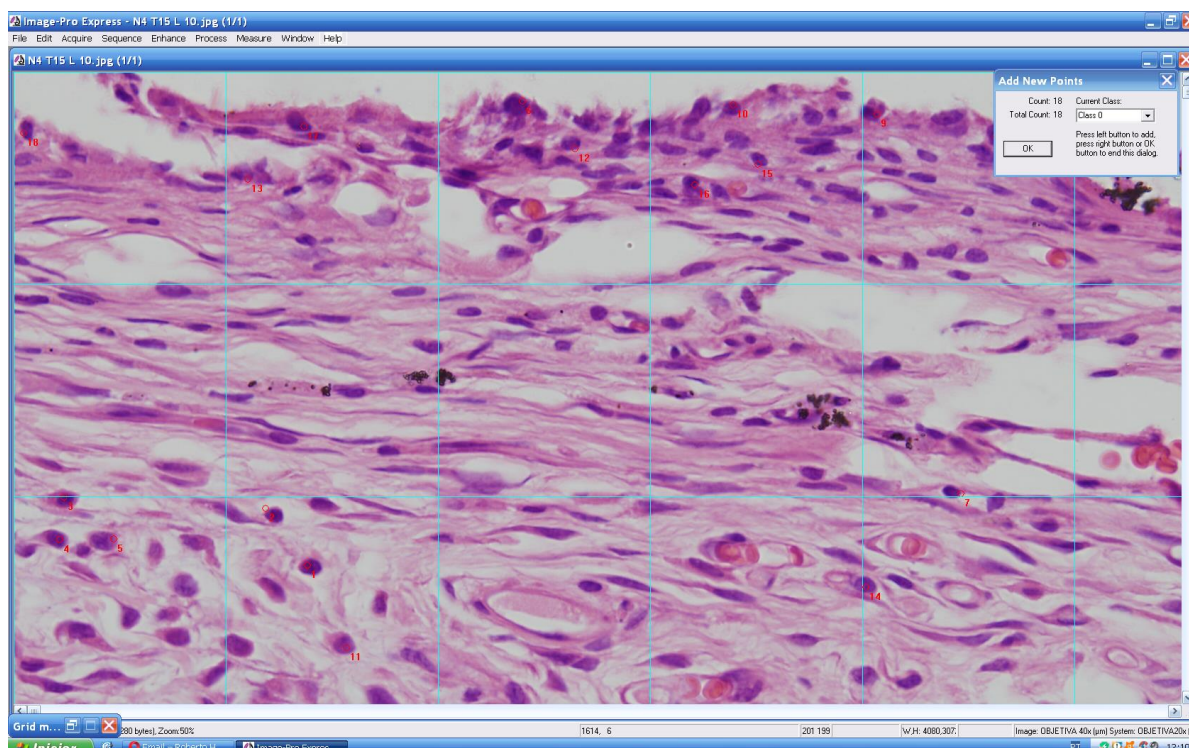
Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.4 Análise da Reação Inflamatória nas Cápsulas

4.4.1 Densidade numérica de células inflamatórias

O número de células inflamatórias na cápsula adjacente ao material implantado foi obtido. Foram quantificados três cortes corados com HE de cada implante, mantendo-se um intervalo mínimo de 100 μm entre os cortes. Com auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus – Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus, modelo BX-51), foram capturadas imagens na porção central das cápsulas na superfície adjacente à abertura dos tubos de polietileno, com a objetiva de 40x. Posteriormente, com um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus – Japão), foi realizada a contagem de células inflamatórias, em cada corte, em uma área teste de aproximadamente 0,09 mm^2 da cápsula (Figura 8). O valor total de células inflamatórias em cada animal (obtido a partir das áreas dos três cortes/implante) foi dividido pela área total (0,27 mm^2) obtendo-se, assim, um valor de células inflamatórias/ mm^2 . Ao final, foi estabelecida uma média para cada grupo de acordo com o período e o material^{33,59,88}. A obtenção do número de células inflamatórias nas cápsulas foi realizada por examinador calibrado e sem conhecimento da identificação dos grupos experimentais; a quantificação foi repetida após um período mínimo de 2 semanas.

Figura 8 - Programa Image-Pro Express 6.0



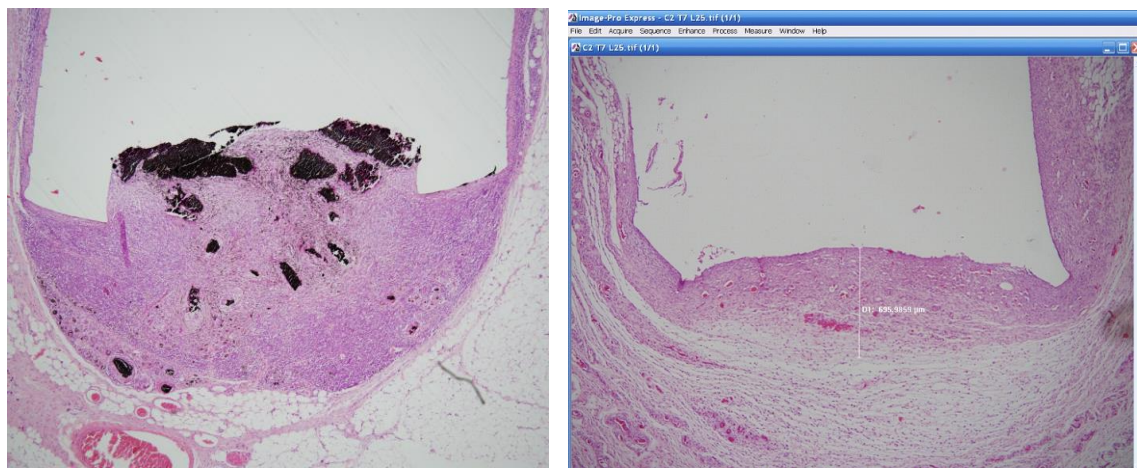
8 – Imagem obtida a partir da tela do programa Image-Pro Express 6.0 (Olympus – Japão) utilizado para quantificação das células inflamatórias. Sobre a imagem previamente capturada é sobreposta uma grade com quadrantes para auxiliar na contagem das células inflamatórias.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.4.2 Mensuração da espessura da cápsula

Para a avaliação da espessura das cápsulas, as imagens foram capturadas em microscópio de luz (BX51, Olympus) com a objetiva de 4x (Figura 9A), tendo um aumento final de 65x. Para cada amostra, foram utilizados três cortes não seriados corados com HE, totalizando 15 cortes por grupo/período. No sistema de análise de imagem (Image-Pro Express 6.0, Olympus), foi realizado *upload* da imagem capturada (em 65x) e usando o zoom (aumento de 25%) a extensão da cápsula foi feita na porção central da cápsula (Figura 9B), à partir de sua superfície mais interna ao limite com os tecidos adjacentes. Assim, o valor médio da espessura da cápsula em cada implante e, conseqüentemente, a média por grupo em cada período foi obtido. A mensuração da espessura da cápsula foi realizada por um examinador calibrado e sem conhecimento da identificação dos grupos experimentais.

Figuras 9A e 9B – Imagens evidenciando a espessura das cápsulas



9A e 9B – Imagens evidenciando a espessura das cápsulas; **9A** – imagem capturada (objetiva de 10x) mostrando a cápsula com reação inflamatória bem delimitada junto à abertura do tubo de polietileno. Note que partículas do material (em preto) estão distribuídas entre as células do tecido conjuntivo da cápsula. **9B** – Imagem previamente capturada (em 4x) e após *upload* no programa *Image-Pro Express* 6.0 (Olympus – Japão), utilizado para estimar espessura da cápsula. Após calibrar o programa de acordo com o aumento da imagem capturada, com auxílio do programa é traçado uma linha para estimar a espessura da cápsula.

Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.4.3 Detecção imuno-histoquímica da IL-6

Para a detecção de IL-6, utilizamos o anticorpo primário monoclonal anti-IL-6 produzido em camundongo (Abcam, cód. Ab 9324, Cambridge Science, RU). Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001 M com pH 6,0 e submetidos ao tratamento com micro-ondas por 20 minutos a 94-98° C, para recuperação antigênica. Após o resfriamento, as lâminas foram imersas em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,4) e, em seguida, os cortes foram imersos em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 5%, para o bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados novamente e, então, incubados com albumina de soro bovino (BSA) a 2% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA), por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* em câmara úmida a 4°C com anticorpo primário anti-IL-6 (diluição 1:400).

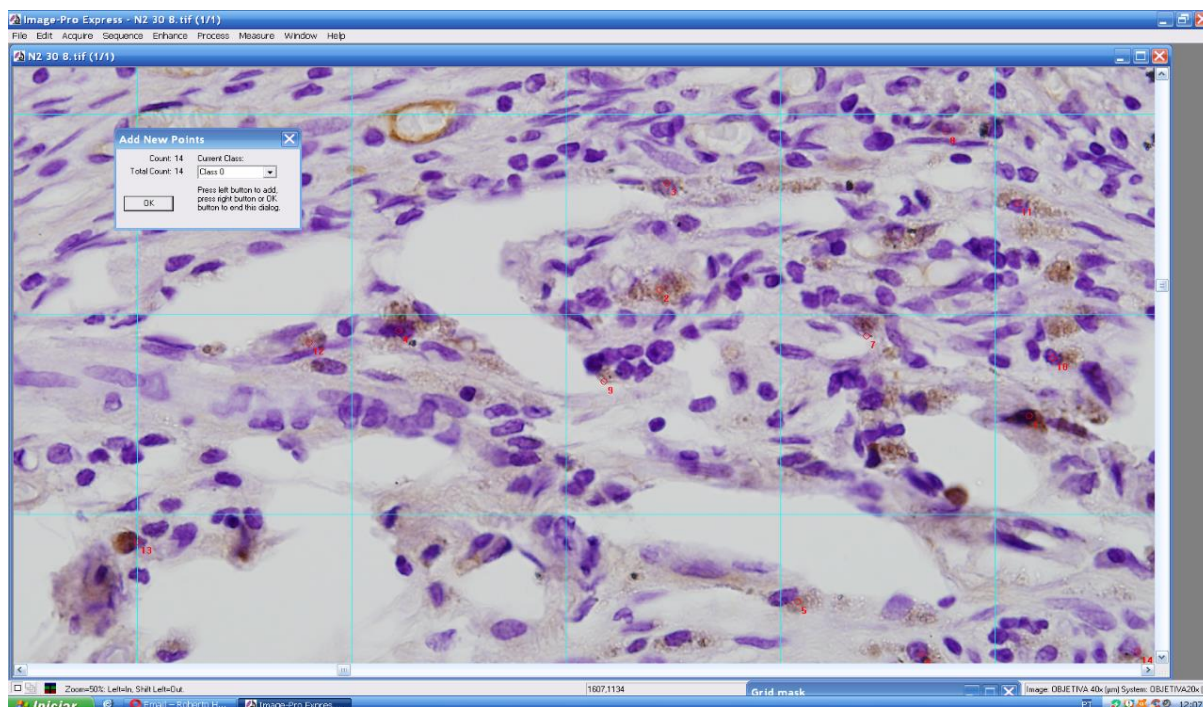
Após as lavagens em tampão Tris-HCl, a reação para IL-6 foi amplificada utilizando-se o sistema Universal com Estreptavidina. Após lavagens, a atividade da

peroxidase foi revelada com o cromógeno 3.3-diaminobenzidina (Betazoid DAB, Biocare Medical Inc., Concord, CA, EUA) por 3 minutos e os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Carazzi. Como controle negativo, em alguns cortes o anticorpo primário anti-IL-6 foi substituído por soro não imune.

4.4.4 Densidade numérica de células positivas à IL-6

Com o objetivo de verificar possíveis diferenças entre os grupos e períodos, o número de células imunopositivas para IL-6 (em castanho) foi estimado nas cápsulas dos implantes de cada grupo/período. Com auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão), uma área padrão de 0,09mm² da cápsula adjacente à abertura do tudo implantado foi capturada, em aumento de 40x. O número de células imunopositivas à IL-6 foi computado com auxílio de um programa de análise de imagens (Image Pro-Express 6.0, Olympus, Japão) (Figura 10). Assim, o número de células imunopositivas/mm² de cápsula foi obtido para cada implante; posteriormente, foi calculada a média para cada grupo em cada período.

Figura 10 – Quantificação das células positivas à IL-6 (em castanho) usando o programa Image-Pro Express 6.0 (Olympus – Japão).



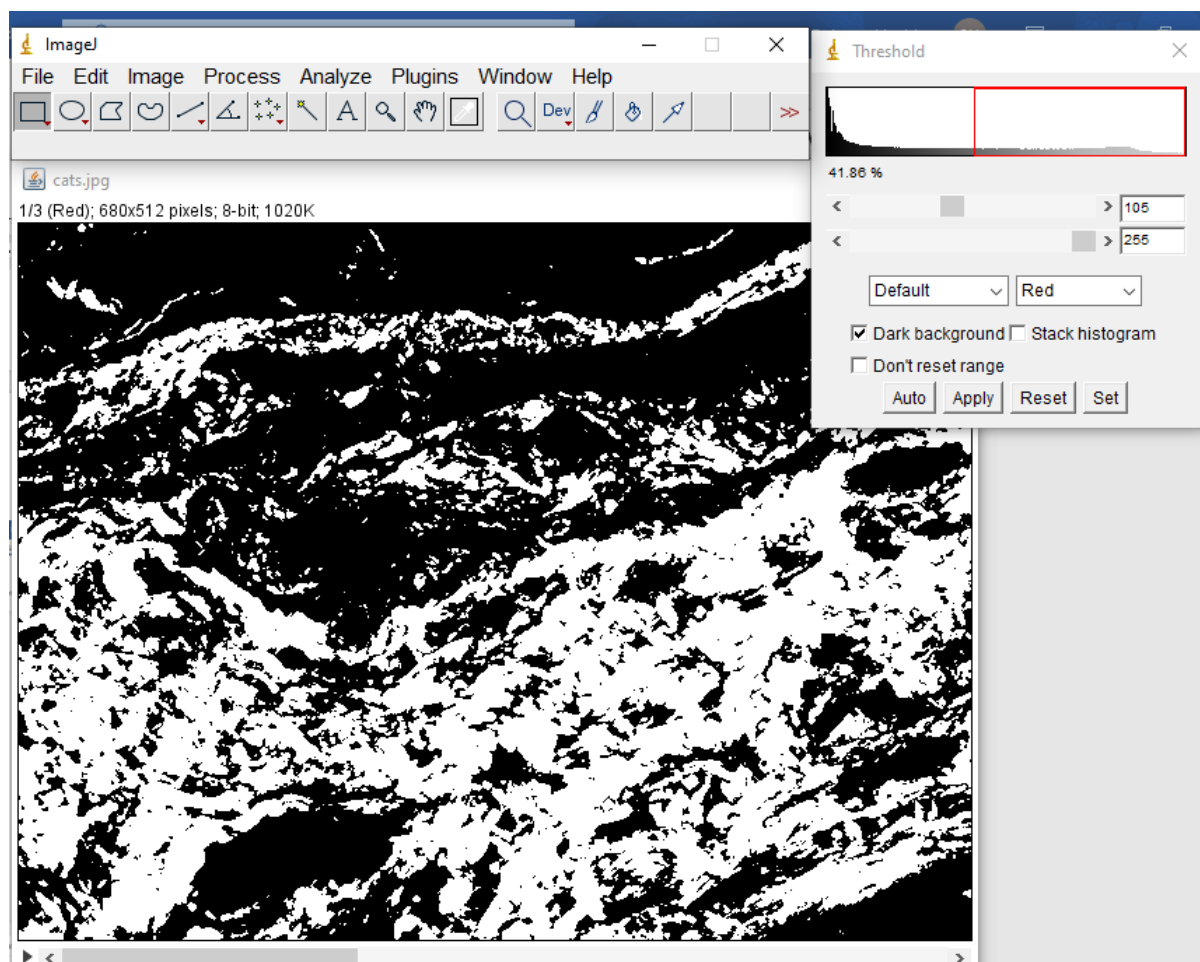
10 – Imagem do programa Image-Pro Express 6.0 (Olympus – Japão) utilizado para quantificação das células positivas à IL-6 (em castanho). Note que uma grade foi sobreposta a imagem para orientar a observação e computação das células imunopositivas.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.4.5 Mensuração do colágeno birrefringente

Com o objetivo de verificar se o processo inflamatório regride com o decorrer do tempo, o conteúdo de colágeno nas cápsulas foi estimado a partir de cortes corados com o método do picrosirius-red. Foram utilizados 3 cortes, com intervalo mínimo de 100 μm entre os cortes, de cada implante de todos os períodos. Em cada corte, uma imagem da cápsula foi capturada com auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão), com a objetiva de 40x e filtros de polarização acoplados ao microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão). Todas as imagens foram capturadas com parâmetros padronizados de intensidade de luz, abertura do diafragma do condensador, altura do condensador, objetiva, angulação do polarizador e brilho da imagem. O conteúdo de colágeno foi estimado usando metodologia previamente descrita^{89,90}. Com um processador de imagens (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), as cores proporcionadas pela birrefringência das imagens das cápsulas foram isoladas utilizando-se o histograma de matiz disponível na guia “Color Threshold”. O número de pixels de cada frequência de cor foi expresso como uma porcentagem do total de colágeno birrefringente nos comprimentos de onda, vermelho/alaranjado (matizes 2 a 38 e 230 a 256), amarelo (matiz 39 a 51) e verde (matiz 52 a 128). Deste modo, os dados representam, em porcentagem, a soma dos matizes nos 3 cortes de cada implante (Figura 11).

Figura 11- Imagem do programa *ImageJ* utilizado para a mensuração do colágeno birrefringente



11- Imagem do programa *ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) utilizado para a mensuração do colágeno birrefringente. Após a conversão da imagem em 8 bits ela adquire tons de cinza.
 Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.5 Análises para Avaliar a Capacidade de Bioatividade dos Cimentos Endodônticos

4.5.1 Reação histoquímica von Kossa

O método de von Kossa foi utilizado para detecção de depósitos de cálcio nas cápsulas adjacentes às extremidades dos tubos implantados. Foram selecionados 2 cortes não seriados, com distância mínima de 100 μm , de cada implante. Os cortes desparafinizados foram incubados em solução aquosa contendo 5% de nitrato de prata por 1 hora; após lavagem com água destilada, os cortes foram imersos em tiosulfato de sódio 5% durante 5 minutos. Então, os cortes foram lavados em água corrente por 1 minuto e corados pelo método picrossirius-red, por 1 hora³³.

Subsequentemente, os cortes foram lavados, desidratados em concentração ascendente de álcool e montados em meio resinoso para análise ao microscópio de luz.

4.5.2 Análise dos cortes não corados com luz polarizada

Considerando que depósitos de calcita são estruturas birrefringentes⁹¹⁻⁹⁵ cortes não corados, próximos aos submetidos ao von Kossa, foram analisados ao microscópio com luz polarizada (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão).

4.6 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). A densidade numérica de células inflamatórias e de células IL-6-imunomarcadas bem como o conteúdo de colágeno birrefringente foram submetidos ao teste de normalidade omnibus D'Agostino-Pearson, que detectou distribuição Gaussiana normal dos dados. Diferenças entre os grupos em cada período, bem como as diferenças de cada grupo ao longo do tempo foram avaliadas por análise ANOVA two-way e teste de Tukey post-hoc. O nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

5 RESULTADO

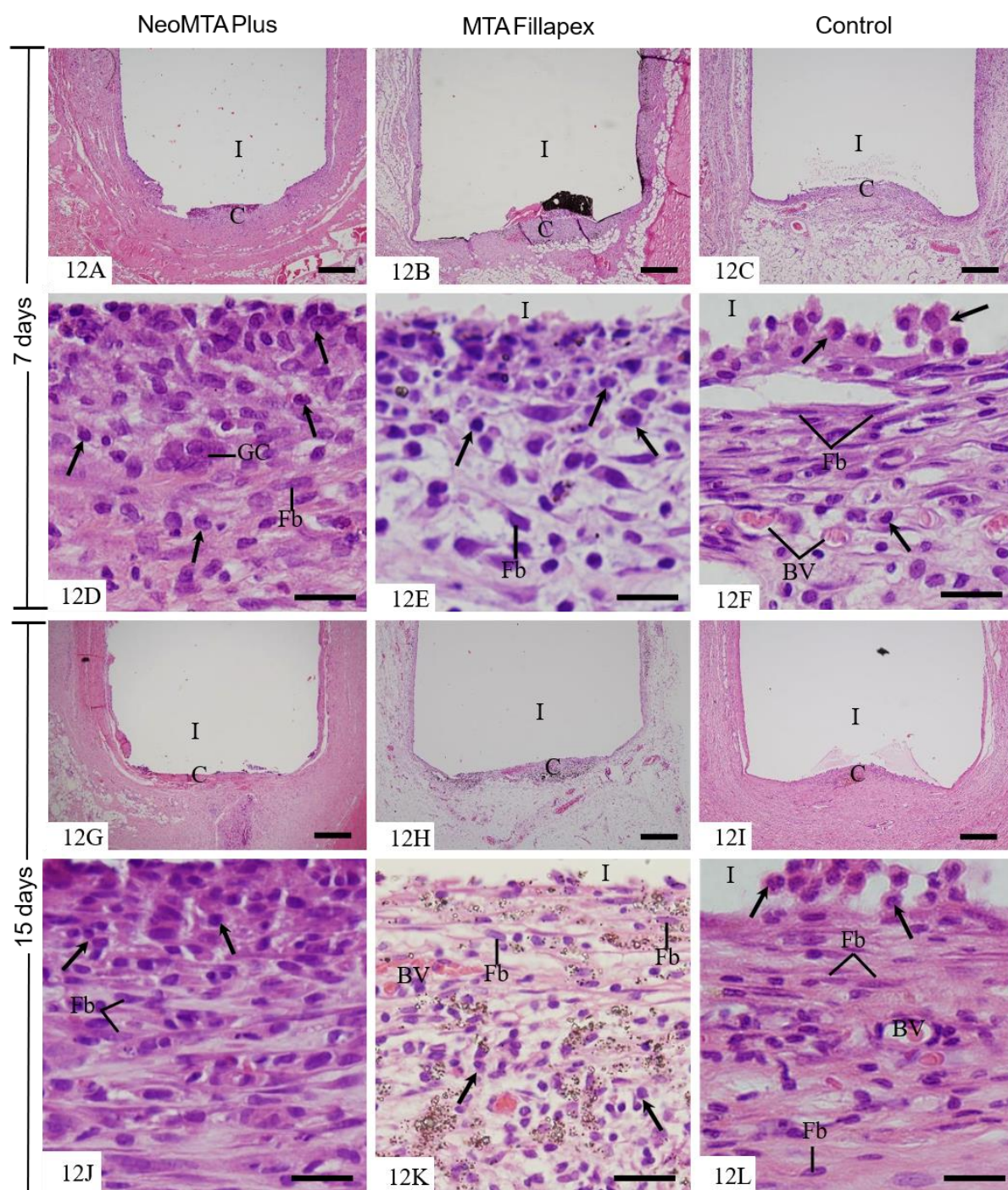
5.1 Descrição Morfológica, Densidade Numérica de Células Inflamatórias e Espessura das Cápsulas

Após 7 dias, as cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno apresentaram-se espessas e exibiram infiltrado inflamatório evidente. No entanto, a reação inflamatória foi restrita às cápsulas e não foram observadas alterações estruturais nos tecidos adjacentes (Figuras 12A-12C). A análise da porção mais interna das cápsulas em contato com o material ou junto à abertura do tubo de polietileno revelou que o infiltrado inflamatório continha principalmente macrófagos e linfócitos (Figuras 12D-12F). Aos 15 dias, as cápsulas bem definidas ao redor dos tubos de polietileno mostraram alguns fibroblastos dispersos entre células inflamatórias e vasos sanguíneos (Figuras 12G-12L). Geralmente, as cápsulas do MTA Fillapex continham várias partículas de material entremeadas com macrófagos, linfócitos e fibroblastos (Figura 12H). No grupo controle, as cápsulas exibiram fibroblastos típicos entre as fibras de colágeno, enquanto as células inflamatórias estavam restritas principalmente à porção mais interna das cápsulas, isto é, justapostas ao lúmen dos tubos de polietileno (Figura 12L). Aos 30 dias, as cápsulas dos grupos NeoMTA Plus (Figura 13A) e MTA Fillapex (Figura 13B) não apresentaram diferença estatística significativa, contudo, as cápsulas do grupo controle (Figura 13C) eram mais finas em comparação com os grupos testados. Além disso, a análise minuciosa (em maior aumento) das cápsulas revelou que a densidade inflamatória nas amostras do NeoMTA Plus foi semelhante à aquela observada nas cápsulas do MTA Fillapex. Nesses grupos, o infiltrado inflamatório moderado continha macrófagos e linfócitos, além de fibroblastos e vasos sanguíneos (Figuras 13D e 13E). Em contraste, as cápsulas do grupo controle exibiram fibroblastos dispostos entre feixes de fibras de colágeno e poucas células inflamatórias foram observadas nas cápsulas deste grupo (Figura 13F). Após 60 dias, os implantes estavam envolvidos por cápsulas finas (Figuras 13G - 13I). Nos grupos NeoMTA Plus e MTA Fillapex (Figuras 13J e 13K), as cápsulas mostraram um infiltrado inflamatório discreto contendo macrófagos e linfócitos. Pequenas partículas de material foram frequentemente observadas na porção mais interna das cápsulas das amostras do MTA Fillapex (Figura 13K). No grupo controle, escassos macrófagos foram observados nas cápsulas fibrosas (Figuras 13L).

Como mostrado na Figura 13M, aos 7 dias foram observados os valores mais altos de células inflamatórias nas cápsulas de todos os grupos. Em todos os grupos, as cápsulas apresentaram uma redução significativa no número de células inflamatórias ao longo do tempo. Não foram observadas diferenças significantes no número de células inflamatórias entre o NeoMTA Plus e o MTA Fillapex após 7 ($p = 0,8971$), 30 ($p = 0,7724$) e 60 ($p = 0,4062$) dias. Aos 15 dias, o número de células inflamatórias foi significativamente menor no NeoMTA Plus do que nas cápsulas do MTA Fillapex ($p = 0,0002$). Os menores valores de células inflamatórias foram observados nas cápsulas do grupo controle em todos os períodos, exceto aos 60 dias. Nesse período, nenhuma diferença significativa foi detectada entre o grupo controle e o NeoMTA Plus ($p = 0,1117$).

Aos 7 dias, a espessura da cápsula (Figura 13N) foi de 286, 336 e 222 μm nos grupos NeoMTA Plus, MTA Fillapex e GC, respectivamente, enquanto que aos 60 dias os valores foram 149, 154 e 80 μm . Assim, foi encontrada uma redução significativa na espessura das cápsulas em todos os grupos ao longo do tempo. Aos 7 e 15 dias, a espessura das cápsulas em torno das amostras do NeoMTA Plus foi significativamente menor que no grupo MTA Fillapex (7 dias: $p = 0,0003$ e 15 dias: $p = 0,0050$, respectivamente), enquanto que diferenças significantes não foram observadas entre esses grupos após 30 ($p = 0,5649$) e 60 ($p = 0,9162$) dias. Em todos os períodos, a espessura das cápsulas do GC foi significativamente menor que no NeoMTA Plus ($p \leq 0,0011$) e no MTA Fillapex ($p < 0,0001$).

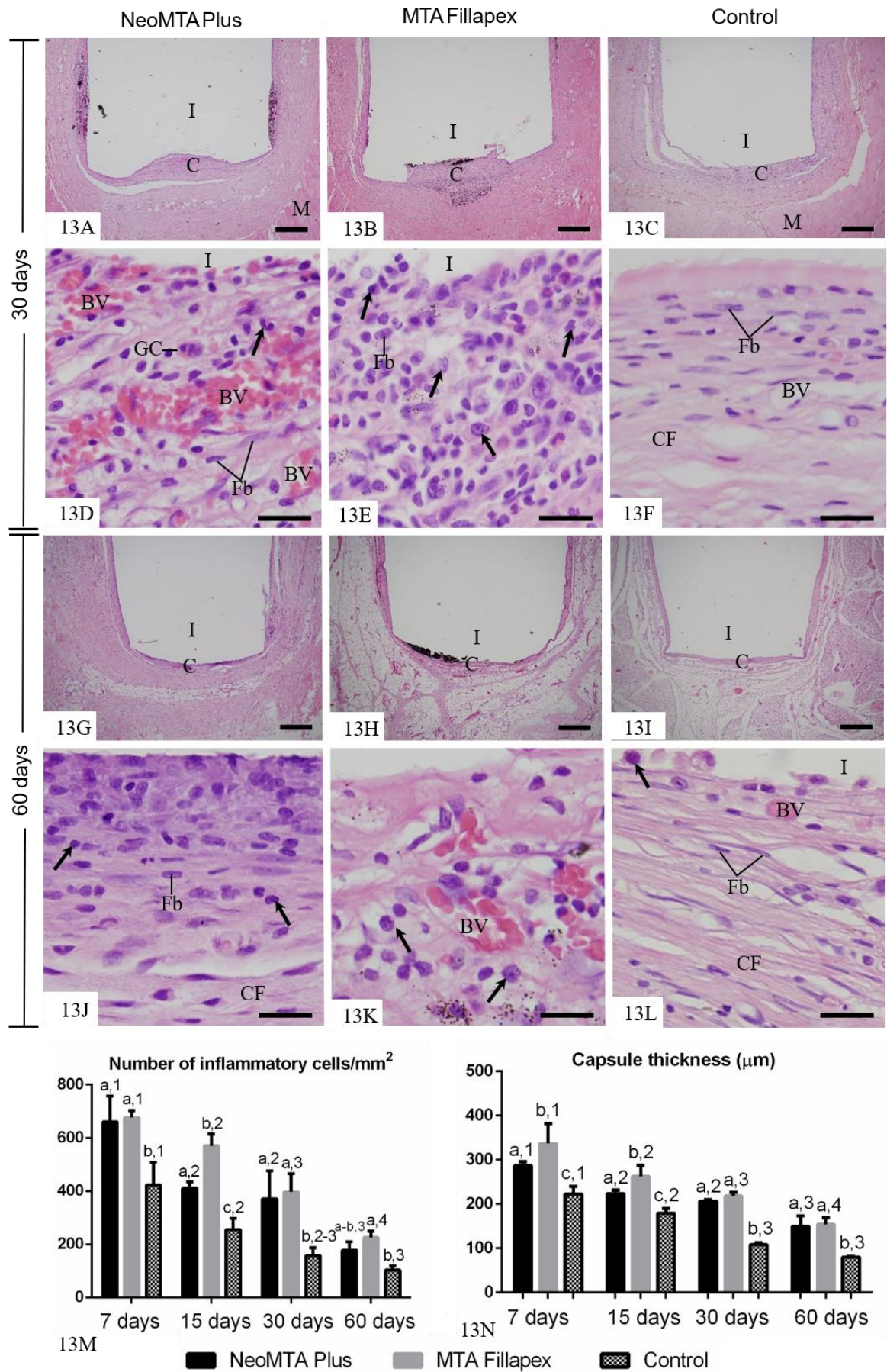
Figuras 12A-12L– Fotomicrografias de cortes de cápsulas após 7 e 15 dias



12A-12F– Fotomicrografias de cortes de cápsulas após 7 dias (**Figuras 12A-12F**) e 15 dias (**Figuras 12G-12L**) de implantação. As **Figuras 12A-12C** (7 dias) e **Figuras 12G-12I** (15 dias) - visão geral mostrando as cápsulas bem definidas (C) ao redor da abertura dos tubos (I) implantados no subcutâneo. Barras: 500 µm. As **Figuras 12D-12F** (7 dias) e **12J-12L** (15 dias), detalhes das cápsulas observadas nas **Figuras 12A-12C** e **12G-12I** - mostram células inflamatórias (setas) e fibroblastos (Fb) na porção mais interna das cápsulas. GC, célula gigante multinucleada; BV, vaso sanguíneo; I, espaço dos tubos de polietileno. Barras: 20 µm.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figuras 13A-13N - Fotomicrografias de cortes de cápsulas após 30 dias e gráficos



13A-13L - Fotomicrografias de cortes de cápsulas após 30 dias (**Figuras 13A-13F**) e 60 dias (**figuras 13E-13L**) de implantação. As **Figuras. 13A-13C** (30 dias) e **Figuras 13G-14I** (60 dias) - visão geral mostrando as cápsulas (C) ao redor da abertura dos tubos (I) implantados no subcutâneo. Todos os grupos exibem cápsulas mais finas (C) aos 60 dias comparadas ao período de 30 dias. Barras: 500 μ m. As **Figuras. 13D-13F** (30 dias) e **13J-13L** (60 dias) - células inflamatórias (setas) e fibroblastos (Fb) são observados nas cápsulas. Note que no grupo controle (**Fig. 13F e 13L**), as cápsulas exibem fibroblastos (Fb) dispersos entre feixes de fibras de colágeno (CF) e poucas células inflamatórias (setas). No MTA Fillapex (**Figura 13K**), partículas de material são observadas em toda a cápsula. GC, célula gigante multinucleada; BV, vaso sanguíneo; I, espaço dos tubos de polietileno. Barras: 20 μ m.

Figuras 13M e 13N - Gráficos mostrando a densidade numérica de células inflamatórias (Figura 13M) e a espessura da cápsula dos grupos (Figura 13N) NeoMTA Plus, MTA Fillapex e controle aos 7, 15, 30 e 60 dias. A comparação entre grupos no mesmo período é indicada por letras sobrescritas. A análise de cada grupo ao longo do tempo é indicada pelo número sobrescrito; mesmos números = nenhuma diferença estatisticamente significativa. Teste ANOVA two-way e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

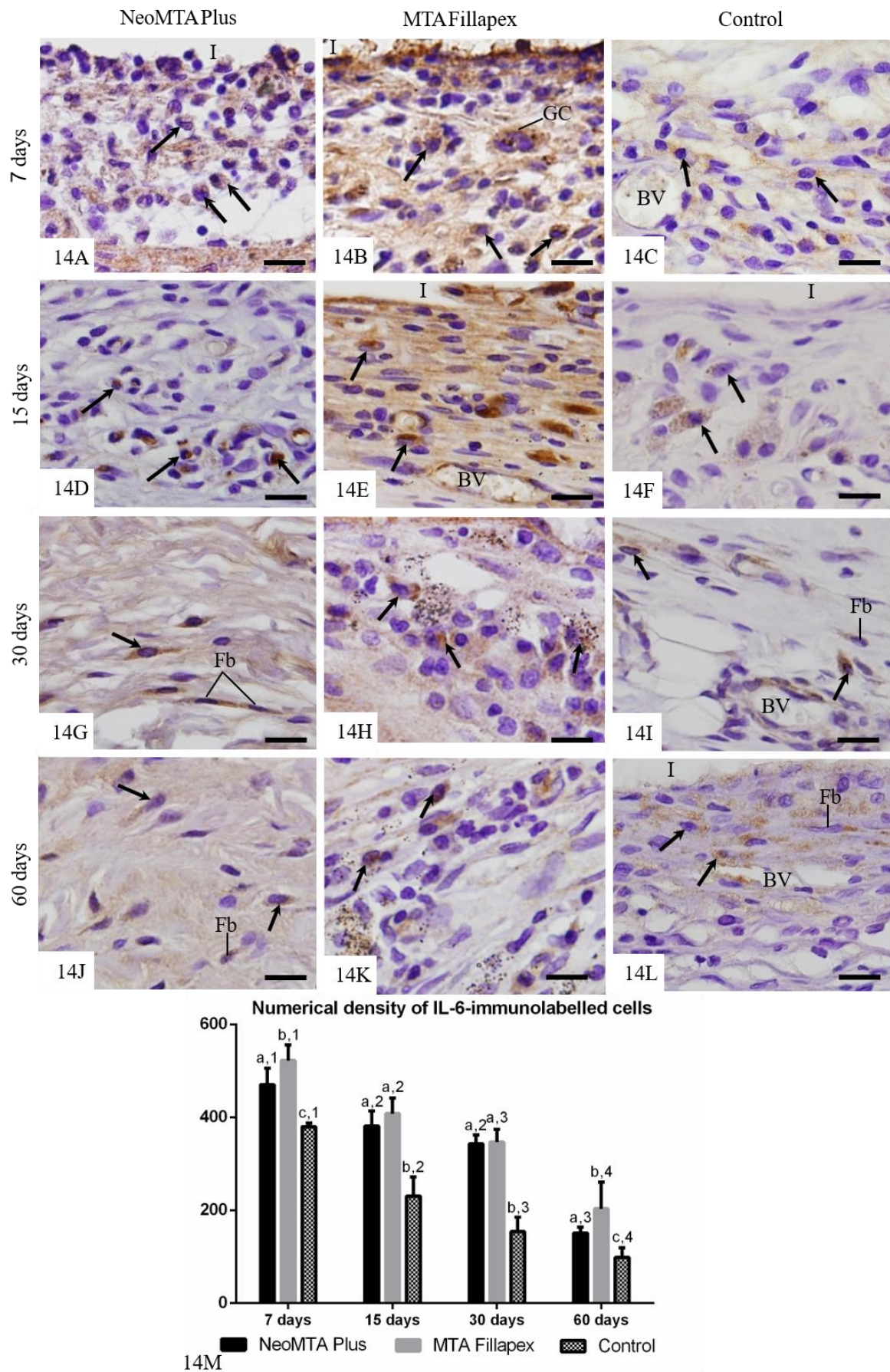
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.2 Interleucina-6

Os cortes submetidos à imuno-histoquímica para detecção de IL-6 mostraram evidente imunomarcção nas células inflamatórias e fibroblastos nas cápsulas de todos os grupos. No entanto, um padrão distinto na imunomarcção foi observado entre os grupos ao longo do tempo (Figuras 14A-14L). As cápsulas do MTA Fillapex exibiram uma forte imunomarcção, particularmente, aos 7, 15 e 30 dias (Figuras 14B, 14E e 14H) quando comparadas com NeoMTA Plus (Figuras 14A, 14D, 14G e 14J) e as amostras do GC (Figuras 14C, 14F, 14I e 14L). Além disso, foi observada uma sutil imunomarcção nas cápsulas das amostras do GC (Figuras 14C, 14F, 14I e 14L).

A análise quantitativa (Figura 14M) revelou que os menores valores de células imunopositivas à IL-6 foram observados no grupo controle ($p \geq 0,0306$), em todos os períodos. Aos 7 e 60 dias, o número de células imunopositivas no NeoMTA Plus foi significativamente menor do que as amostras do MTA Fillapex ($p = 0,0353$), enquanto que, aos 15 e 30 dias, não foram observadas diferenças significantes entre esses grupos (15 dias: $p = 0,3915$; 30 dias: $0,9817$). Em todos os grupos, uma redução significativa na imunomarcção foi detectada de 7 para 15 dias ($p < 0,0001$). De 15 para 30 dias, significativa redução foram detectadas nos grupos MTA Fillapex ($p = 0,0192$) e GC ($p = 0,0024$), enquanto que no NeoMTA Plus não foi detectada diferença significativa ($p = 0,2392$). De 30 a 60 dias, foi observada uma redução significativa no número de células positivas à IL-6 nas amostras do NeoMTA Plus, MTA Fillapex ($p < 0,0001$) e do GC ($p = 0,0405$).

Figuras 14A -14M: Cortes submetidos à imuno-histoquímica e gráfico



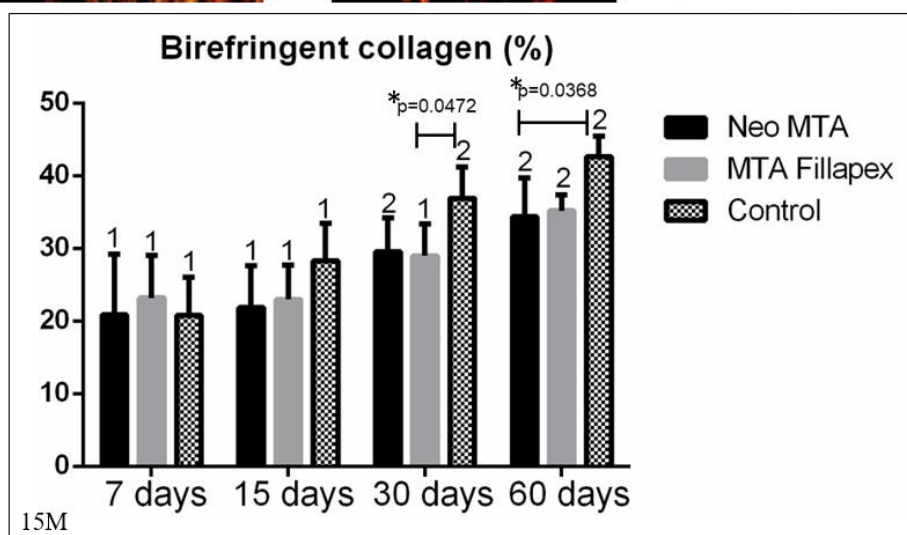
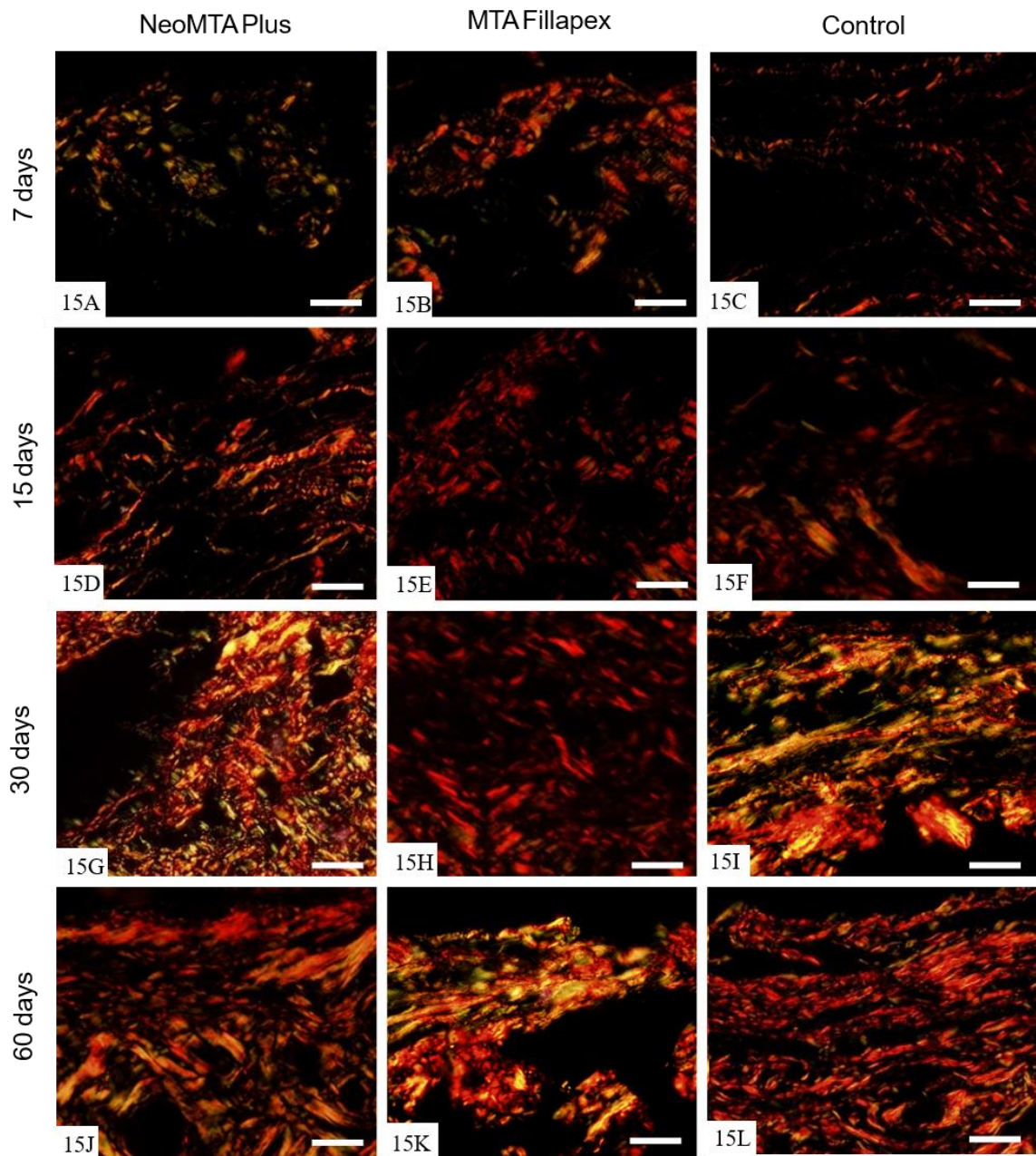
14A-14L - Fotomicrografias de cortes de cápsulas adjacentes à abertura dos tubos implantados (I) no tecido subcutâneo. Os cortes foram submetidos à imuno-histoquímica para detecção de IL-6 e contracolorados com hematoxilina. A imunomarcagem (em castanho) é observada nas células inflamatórias (setas) e fibroblastos (Fb) nas cápsulas de todos os grupos e em todos os períodos. BV, vaso sanguíneo. Barras: 20 μ m. **Figura 14M** - Gráfico mostrando a densidade numérica de células positivas à IL-6 nas cápsulas dos grupos NeoMTA Plus, MTA Fillapex e controle aos 7, 15, 30 e 60 dias. A comparação entre grupos no mesmo período é indicada por letras sobrescrita. A análise de cada grupo ao longo do tempo é indicada pelo número sobrescrito; mesmos números = nenhuma diferença estatisticamente significativa. Teste ANOVA two-way e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.3 Conteúdo de Colágeno

Os cortes corados com picrosirius-red e analisados sob luz polarizada mostraram uma variabilidade evidente no padrão de colágeno birrefringente, particularmente ao longo do tempo (Figuras 15A-15L). Aos 7 e 15 dias, pouco conteúdo birrefringente foi observado nas cápsulas de todos os grupos (Figuras 15A-15F). Em contraste, as cápsulas de todos os grupos mostraram uma intrincada rede de fibras colágenas birrefringentes aos 30 e 60 dias de implantação (Figuras 15G-15L). De acordo com a Fig. 15M, um aumento gradual no conteúdo de colágeno birrefringente foi observado nas cápsulas ao longo do tempo. Em todos os períodos, não foram observadas diferenças significantes entre o NeoMTA Plus e o MTA Fillapex ($p \geq 0,753$). Aos 7 e 15 dias, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos NeoMTA, MTA Fillapex e GC. O GC apresentou maior conteúdo de colágeno que o MTA Fillapex ($p = 0,0472$) e NeoMTA ($p = 0,0368$) aos 30 e 60 dias, respectivamente.

Figuras 15A-15M: Cortes submetidos ao picrosirius-red e gráfico



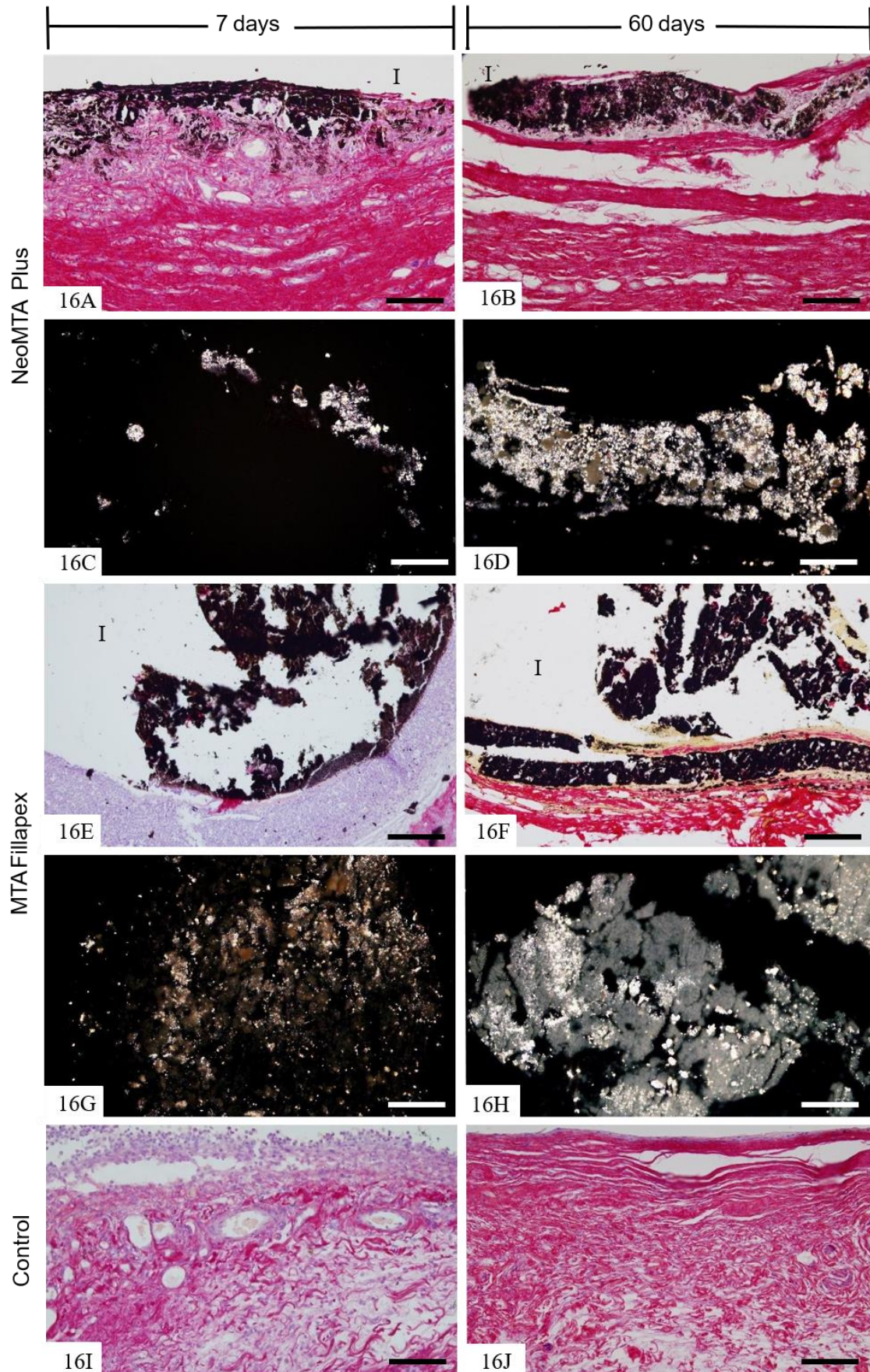
15A-15L - Fotomicrografias mostrando porções de cápsulas adjacentes à abertura dos tubos implantados no subcutâneo. Os cortes foram submetidos ao picrosirius-red e analisados sob luz polarizada. Aos 7 (**Figuras. 15A-15C**) e 15 (**Figs. 15D-15F**) dias, poucas fibras birrefringentes (cores laranja/vermelho) são observadas nas cápsulas. Aos 30 (**Figuras 15G-15I**) e 60 (**Figuras 15H-15L**) dias, as cápsulas exibem feixes espessos de colágeno birrefringente. Barras: 20 μ m. **Figura 15M** - Gráfico mostrando o conteúdo de colágeno birrefringente (expresso como média $\pm$ desvio padrão) nas cápsulas dos grupos NeoMTA Plus, MTA Fillapex e controle aos 7, 15, 30 e 60 dias. A comparação entre grupos no mesmo período é indicada por asterisco sobrescrito. A análise de cada grupo ao longo do tempo é indicada pelo número sobrescrito; mesmos números = nenhuma diferença estatisticamente significativa. Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

5.4 von Kossa e Cortes Não Corados Analisados Sob Luz Polarizada

As estruturas positivas ao von Kossa (cor preta) foram observadas nas cápsulas ao redor das amostras de NeoMTA Plus (Figuras 16A e 16B) e MTA Fillapex (Figuras 16E e 16F). Os cortes desparafinizados e não corados sob luz polarizada exibiram estruturas birrefringentes nas cápsulas, adjacentes à abertura dos tubos contendo NeoMTA Plus (Figuras 16C e 16D) e MTA Fillapex (Figuras 16G e 16H). No GC, não foram encontradas estruturas positivas para von Kossa (Figuras 16I e 16J).

Figuras 16A-16J: von Kossa e Cortes Não Corados Analisados Sob Luz Polarizada



16A-16J – Fotomicrografias de cortes de cápsulas mostrando porções adjacentes à abertura dos tubos implantados subcutâneo. As **Figuras. 16A, 16B, 16E, 16F, 16I e 16J** – Os cortes foram submetidos à reação de von Kossa (cor preta) e contrastados com picrosirius-red (cor vermelha). Estruturas positivas ao von Kossa são observadas na superfície das cápsulas do NeoMTA Plus e MTA Fillapex. No grupo controle (**Figuras 16I e 16J**), as estruturas von Kossa positivas estão ausentes. As **Figuras. 16C, 16D, 16G e 16H** – cortes desparafinizados e não corados analisados sob luz polarizada. Note presença de material granular exibindo birrefringência nas cápsulas do NeoMTA Plus e MTA Fillapex. Barras: 20 µm
Fonte: Arquivo pessoal do autor.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a densidade numérica das células inflamatórias e a imunoexpressão de IL-6 mostraram claramente que o NeoMTA Plus e o MTA Fillapex desenvolveram uma resposta inflamatória favorável ao longo do tempo, permitindo a formação de delgadas cápsulas de tecido conjuntivo denso em substituição ao infiltrado inflamatório. Esta ideia é apoiada, uma vez que uma diminuição na reação inflamatória e na imunoexpressão de IL-6 foi paralela ao aumento da quantidade de colágeno nas cápsulas ao redor das amostras NeoMTA Plus e MTA Fillapex com o decorrer do tempo.

O NeoMTA Plus contém um pó fino de dicálcico, sulfato de cálcio (como anidrita) e baixa quantidade de calcita que deve ser oriunda, provavelmente, da hidratação que ocorre em virtude do seu armazenamento levando a formação de hidróxido de cálcio⁷. No presente estudo, o NeoMTA Plus foi misturado com um gel à base de água, o que fornece uma consistência adequada para o preenchimento do canal radicular¹⁴. Extratos de NeoMTA Plus adicionados à cultura de células humanas do tipo osteoblastos (Saos-2) induziram a proliferação celular e a expressão da fosfatase alcalina, culminando na formação de nódulos mineralizados¹⁵. O NeoMTA Plus apresenta citocompatibilidade quando adicionado à cultura de células-tronco da polpa dental humana (hDPSCs) e permitindo a migração celular². No entanto, estudos *in vivo* avaliando a biocompatibilidade e bioatividade do NeoMTA Plus não foram encontrados na literatura.

O NeoMTA Plus e o MTA Fillapex após 7 dias de implantação no tecido conjuntivo do subcutâneo induziram uma reação inflamatória moderada, conforme revelado pelas análises morfológicas e quantitativas. Embora os dois cimentos endodônticos induziram um infiltrado inflamatório moderado, a intensidade dessa reação ao redor dos cimentos endodônticos foi cerca de duas vezes a encontrada nas cápsulas do grupo controle. É possível que os valores mais altos encontrados no tecido conjuntivo ao redor destes cimentos endodôntico possam ser, pelo menos em parte, devido ao pH alcalino fornecido pelos NeoMTA Plus e MTA Fillapex. Nas primeiras 3 horas até o 7º dia, o pH varia de 11,2 a 10,8 no meio contendo NeoMTA Plus⁷ e de 9,5 a 9,2 no MTA Fillapex⁹⁶. Apesar de seu efeito antimicrobiano, como esperado em cimentos de canais radiculares^{97,98}, o pH alcalino induz o recrutamento de células inflamatórias e a liberação de citocinas pró-inflamatórias levando à

instalação de reação inflamatória^{99,100}. No entanto, a liberação de substâncias dos cimentos endodônticos também pode promover um efeito deletério nos componentes do tecido conjuntivo (células e matriz extracelular), ativando o sistema imunoinflamatório.

A mais elevada imunoexpressão de IL-6 também foi observada nas cápsulas de NeoMTA Plus e MTA Fillapex aos 7 dias, bem como no grupo controle. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica sintetizada por uma variedade de células como monócitos/macrófagos, células endoteliais, linfócitos e fibroblastos^{101,102,103,104}. Essa interleucina tem participação em várias atividades biológicas, como regulação da resposta imune e inflamatória e estimulação da hematopoese¹⁰⁵. Entre várias atividades da IL-6, essa citocina possui propriedades pró-inflamatórias, estimulando a produção de citocinas e moléculas de adesão em linfócitos, bem como a produção de neutrófilos^{105,106}. Nas primeiras horas, o NeoMTA Plus e o MTA Fillapex em contato com fluidos corporais liberam OH^- e Ca^{+2} , fornecendo um pH alcalino ao microambiente^{100,107} e promovendo o recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea^{99,100,108}. Há vasta evidência de que a IL-6 desempenha um papel na fase inicial da reação inflamatória promovida por materiais dentários implantados no tecido subcutâneo^{20,51,59,90,109}. Da mesma forma, altos níveis de IL-6 são detectados na reação inflamatória aguda causada por doença arterial coronariana¹¹⁰, artrite reumatoide¹¹¹⁻¹¹³ e doença periodontal^{103,114,115}.

Embora um aumento no infiltrado inflamatório estivesse presente no MTA Fillapex em comparação com o NeoMTA Plus aos 15 dias, não foi detectada diferença significativa na imunoexpressão de IL-6 entre os grupos NeoMTA Plus e MTA Fillapex. De fato, a análise estatística mostrou uma redução significativa no infiltrado inflamatório de 7 para 15 dias nas amostras do MTA Fillapex. No entanto, essa redução foi mais pronunciada no NeoMTA Plus, indicando que a composição química desse cimento endodôntico permite uma regressão mais rápida do infiltrado inflamatório. É concebível sugerir que a maior imunoexpressão de IL-6 no MTA Fillapex aos 7 dias pode ser responsável pela manutenção do infiltrado inflamatório nas cápsulas, como observado aos 15 dias. O NeoMTA Plus é um cimento biocerâmico (cimento de silicato tricálcico), enquanto que o MTA Fillapex é um cimento à base de resina que contém apenas cerca de 13,2% de MTA¹⁶. Além da resina de salicilato exibir alta citotoxicidade^{108,116,117}, a mistura dessa resina ao silicato tricálcico fornece ao MTA Fillapex uma alta fluidez e um tempo de presa prolongado e,

consequentemente, alta solubilidade^{16,39,108}. De fato, partículas de material foram frequentemente observadas dispersas pelas cápsulas ao redor das amostras do MTA Fillapex, sugerindo que esse cimento em contato com fluidos possa exibir alta solubilidade. Além disso, o MTA Fillapex induziu inicialmente a formação de reação inflamatória mais extensa, uma vez que as cápsulas das amostras de MTA Fillapex eram significativamente mais espessas do que as do NeoMTA Plus aos 7 e 15 dias. Por outro lado, a espessura das cápsulas diminuiu significativamente e nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos NeoMTA Plus e MTA Fillapex aos 30 e 60 dias. Além disso, a espessura das cápsulas nesses grupos atingiu valores em torno de 150 µm, sendo consideradas como cápsulas finas¹¹⁸, reforçando a ideia de que esses cimentos endodônticos são biocompatíveis^{20,51}.

Apesar das diferenças de composição e propriedades físico-químicas entre o NeoMTA Plus e o MTA Fillapex, os dois cimentos permitiram uma redução no infiltrado inflamatório e na imunoexpressão de IL-6 paralelamente ao aumento gradual do conteúdo de colágeno, culminando na formação de cápsulas finas após 60 dias à implantação. No período de 60 dias, diferenças significantes no infiltrado inflamatório não foram também observadas entre as cápsulas do NeoMTA Plus e o MTA Fillapex e entre o NeoMTA Plus e o GC, apontando para a biocompatibilidade destes cimentos endodônticos. Assim, o NeoMTA Plus e o MTA Fillapex causam alterações deletérias transitórias no tecido conjuntivo, que são gradualmente recuperadas, mostrando que esses cimentos fornecem às células do hospedeiro condições favoráveis para a reparação do tecido.

O método de von Kossa é uma reação histoquímica usada para detectar depósitos de cálcio¹¹⁹ e, portanto, amplamente utilizada para avaliar a bioatividade de materiais odontológicos^{4,32,120,121}. Estruturas fortemente positivas para o método von Kossa foram observadas nas cápsulas dos cimentos NeoMTA Plus e MTA Fillapex, sugerindo que esses cimentos promovem a precipitação de cálcio nas cápsulas. A análise de cortes não corados das amostras do NeoMTA Plus e MTA Fillapex ao microscópio de polarização revelaram estruturas birrefringentes indicativas de calcita amorfa^{4,32,120,122}. Sabe-se que o NeoMTA Plus e MTA Fillapex liberam íons cálcio, que podem reagir com o dióxido de carbono presente nos tecidos, levando à formação de cristais de carbonato de cálcio que são estruturas birrefringentes sob luz polarizada^{4,32,93,95,122}. Embora sejam necessárias metodologias adicionais para confirmar se esses cimentos estimulam a formação de tecido mineralizado, é

importante enfatizar que nenhuma estrutura positiva ao von Kossa ou birrefringente foi observada nas cápsulas do grupo controle. Esses achados apontam que os cimentos endodônticos testados possuem a capacidade de desenvolver uma ligação estável com tecidos vivos via a deposição de hidroxiapatita¹⁰. Embora haja restrições no presente estudo, nossos resultados mostraram que NeoMTA Plus é um cimento endodôntico biocompatível desde que permitiu a regressão do processo inflamatório. A regressão da reação inflamatória ocorreu de maneira mais rápida nas cápsulas do NeoMTA Plus em comparação àquela induzida pelo MTA Fillapex. Além disso, dentro da limitação da metodologia utilizada, nossos resultados sugerem que os dois cimentos endodônticos apresentam bioatividade.

7 CONCLUSÃO

- Nossos resultados indicam que os cimentos NeoMTA Plus e MTA Fillapex promovem o recrutamento de células que culminam com a instalação de uma reação inflamatória moderada.
- A acentuada imunoexpressão de IL-6 nos períodos iniciais indica que esta interleucina deve ter um papel no recrutamento das células inflamatórias em resposta aos cimentos endodônticos NeoMTA Plus e MTA Fillapex.
- A redução significativa da reação inflamatória paralelamente ao aumento de colágeno culminou na formação de delgadas cápsulas de tecido conjuntivo denso (fibroso) apontando para a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos avaliados.
- A presença de estruturas positivas ao von Kossa e birrefringentes sugerem que os cimentos NeoMTA Plus e MTA Fillapex apresentam potencial bioativo.

REFERÊNCIAS*

1. Walsh RM, Woodmansey KF, He J, Svoboda KK, Primus CM, Opperman LA. Histology of NeoMTA Plus and Quick-Set2 in contact with pulp and periradicular tissues in a canine model. *Endod*. 2018; 44(9): 1389-95.
2. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, Lozano A, 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.
3. Hursh KA, Kirkpatrick TC, Cardon JW, Brewster JA, Black SW, Himel VT, Sabey KA. Shear Bond Comparison between 4 bioceramic materials and dual-cure composite resin. *J Endod*. 2019; 45(11): 1378-83.
4. 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.
5. Mondelli JAS, Hoshino RA, Weckwerth PH, Cerri PS, Leonardo RT, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Biocompatibility of mineral trioxide aggregate flow and biodentine. *Int Endod J*. 2019; 52(2): 193-200.
6. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *Int Endod J*. 2018; 51(2): 177-205.
7. Siboni F, Taddei P, Prati C, Gandolfi MG. Properties of NeoMTA Plus and MTA Plus cements for endodontics. *Int Endod J*. 2017; 50 Suppl 2:e83-e94a.
8. Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, Oliveira PHC, Conti LC, Azuma MM, Oliveira SHP, Cintra LTA. Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. *Braz Oral Res*. 2019; 33:e042
9. Bogen G, Kim JS, Bakland LK. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. *J Am Dent Assoc*. 2008; 139(3): 305-15
10. Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *J Endod*. 2006; 32(5): 425-8.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

11. Martin RL, Monticelli F, Brackett WW, Loushine RJ, Rockman RA, Ferrari M, Pashley DH, Tay FR. Sealing properties of mineral trioxide aggregate orthograde apical plugs and root fillings in an in vitro apexification model. *J Endod.* 2007; 33(3): 272-5.
12. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 2010; 36(2): 190-202.
13. Avalon Biomed Inc. Safety Data Sheet - NeoMTA Plus Powder. Bradenton, FL, USA: Directions for use. [accessed April 2017]. Disponível em: URL avalonbiomed.com/wp-content/uploads/2014/04/DFU-NeoMTA-Plus-REV-1601.pdf.
14. McMichael GE, Primus CM, Opperman LA. Dentinal Tubule Penetration of Tricalcium Silicate Sealers. *J Endod.* 2016; 42(4): 632-6.
15. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J, et al. Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J.* 2017; 50 Suppl 2:e31-e39.
16. Prüllage RK, Urban K, Schäfer E, Dammaschke T. Material Properties of a Tricalcium Silicate-containing, a Mineral Trioxide Aggregate-containing, and an Epoxy Resin-based Root Canal Sealer. *J Endod.* 2016; 42(12): 1784-88.
17. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig.* 2016; 20(1): 83-90.
18. Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Ortolani-Seltenerich PS, Lozano A, Forner L, Llena C, et al. Biocompatibility of three new calcium silicate based endodontic sealers on human periodontal ligament stem cells. *Int Endod J.* 2017; 50(9): 875-884.
19. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2004; 37(10): 699-704.
20. Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Cerri. Immunoinflammatory response and bioactive potential of GuttaFlow bioseal and MTA Fillapex in the rat subcutaneous tissue. *Sci Rep.* 2020 28;10(1):7173. doi: 10.1038/s41598-020-64041-0.
21. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Treponema species associated with abscesses of endodontic origin. *Oral Microbiol Immunol.* 2004;19(5): 336-9.
22. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006; 39(4): 249-81. Review.

23. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Debelian GJ, Carmo FL, Paiva SS, Alves FR, et al. Profiling of root canal bacterial communities associated with chronic apical periodontitis from Brazilian and Norwegian subjects. *J Endod*. 2008; 34(12): 1457-61.
24. Whitworth JM, Myers PM, Smith J, Walls AW, McCabe JF. Endodontic complications after plastic restorations in general practice. *Int Endod J*. 2005; 38(6): 409-16.
25. Ari H, Belli S, Gunes B. Sealing ability of Hybrid Root SEAL (MetaSEAL) in conjunction with different obturation techniques. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(6):e113-6.
26. Wu MK, Fan B, Wesselink PR. Diminished leakage along root canals filled with guttapercha without sealer over time: a laboratory study. *Int Endod J*. 2000; 33(2): 121-5.
27. Grossman SJ and Stiglitz JE *The American Economic Review* Vol. 70, No. 3 (jun., 1980), pp. 393-408.
28. Siew K, Lee AH, Cheung GS. Treatment outcome of repaired root perforation: A systematic review and meta-analysis. *J Endod*. 2015; 41(11): 1795-804.
29. Leonardo MR, Leal JM (in memoriam). Materiais obturadores de canais radiculares. In: Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos*. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 1063-145.
30. Faria-Júnior NB, Tanomaru-Filho M, Berbert FL, Guerreiro-Tanomaru JM. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. *Int Endod J*. 2013; 46(8): 755-62.
31. 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.
32. Bueno CR, Valentim D, Marques VA, Gomes-Filho JE, Cintra LT, Jacinto RC et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of bioceramic-, epoxy-, and calcium hydroxide-based sealers. *Braz Oral Res*. 2016; 14; 30(1):81. 14;30(1):S1806-83242016000100267.
33. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Morphological and morphometric analysis of the biocompatibility of na experimental MTA Sealer. *J. biomed. mater. res. B appl. biomater*. 2012; 100B(7): 1773-81.
34. 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.

35. Assmann E, Böttcher DE, Hoppe CB, Grecca FS, Kopper PM. Evaluation of bone tissue response to a sealer containing mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2015; 41(1): 62-6.
36. Tran D, He J, Glickman GN, Woodmansey KF. Comparative Analysis of Calcium Silicate-based Root Filling Materials Using an Open Apex Model. *J Endod.* 2016; 42(4): 654-8.
37. Gürel MA, Kivanç BH, Ekici A, Alaçam T. Evaluation of crown discoloration induced by endodontic sealers and colour change ratio determination after bleaching. *Aust Endod J.* 2016; 42(3): 119-123.
38. Flores DS, Rached FJ Jr, Versiani MA, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Evaluation of physicochemical properties of four root canal sealers. *Int Endod J.* 2011; 44(2): 126-35.
39. Vitti RP, Prati C, Silva EJ, Sinhoreti MA, Zanchi CH, de Souza e Silva MG, et al. Physical properties of MTA Fillapex sealer. *J Endod.* 2013; 39(7): 915-8.
40. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Properties of a novel polysiloxane-gutta-percha calcium silicate-bioglass-containing root canal sealer. *Dent Mater.* 2016; 32(5): e113-26.
41. Kuga MC, Faria G, Weckwerth PH, Duarte MAH, Campos E.A., Reis MV. Evaluation of the pH, calcium release and antibacterial activity of MTA Fillapex. *Rev Odontol UNESP.* 2013; 42(5): 330-5.
42. Okabe T, Sakamoto M, Takeuchi H, Matsushima K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. *J Endod.* 2006; 32(3): 198-201.
43. 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.
44. Salles LP, Gomes-Cornélio AL, Guimarães FC, Herrera BS, Bao SN, Rossa-Junior C, et al. Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod.* 2012; 38(7): 971-6.
45. Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, Camargo CH. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012; 38(4): 495-500.
46. Zmener O, Martinez Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod.* 2012; 38(9): 1233-8.

47. Marques NC, Lourenço Neto N, Fernandes AP, Rodini Cde O, Duarte MA, Oliveira TM. Rat subcutaneous tissue response to MTA Fillapex® and Portland cement. *Braz Dent J.* 2013; 24(1): 10-4.
48. Tavares CO, Böttcher DE, Assmann E, Kopper PM, de Figueiredo JA, Grecca FS, et al. Tissue reactions to a new mineral trioxide aggregate-containing endodontic sealer. *J Endod.* 2013; 39(5): 653-7.
49. Bósio CC, Felipe GS, Bortoluzzi EA, Felipe MC, Felipe WT, Rivero ER. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. *Int Endod J.* 2014; 47(7): 667-74.
50. Neelakantan P, Grotra D, Sharma S. Retreatability of 2 mineral trioxide aggregate-based root canal sealers: a cone-beam computed tomography analysis. *J Endod.* 2013; 39(7): 893-6.
51. Saraiva JA, da Fonseca TS, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, 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; 20;13(3): 035002.
52. Ioannidis K, Mistakidis I, Beltes P, Karagiannis V. Spectrophotometric analysis of coronal discoloration induced by grey and white MTA. *Int Endod J.* 2013 ;46(2): 137-44.
53. Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(9): 2201-9.
54. Chen C, Hsieh SC, Teng NC, Kao CK, Lee SY, Lin CK, et al. Radiopacity and cytotoxicity of Portland cement containing zirconia doped bismuth oxide radiopacifiers. *J Endod.* 2014; 40(2): 251-4.
55. Beyer-Olsen EM, Orstavik D. Radiopacity of root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981; 51(3): 320-8.
56. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J.* 2007; 40(6): 462-70.
57. Antonijevic D, Medigovic I, Zrilic M, Jokic B, Vukovic Z, Todorovic L. The influence of different radiopacifying agents on the radiopacity, compressive strength, setting time, and porosity of Portland cement. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(6): 1597-604.
58. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mater.* 2011; 27(9): 879-91.

59. Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(8): 2015-25.
60. Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J. Calcium silicate-based sealers: Assessment of physicochemical properties, porosity and hydration. *Dent Mater.* 2016; 32(2): e30-40.
61. 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 Suppl 2:e95-e108.
62. Lee J, Rancilio NJ, Poulson JM, Won YY. Block copolymer-encapsulated CaWO₄ nanoparticles: synthesis, formulation, and characterization. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016; 8(13): 8608-19.
63. Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M, et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012; 38(3): 394-7
64. Tanomaru-Filho M, Morales V, da Silva GF, Bosso R, Reis JM, Duarte MA, Guerreiro-Tanomaru JM. Compressive strength and setting time of MTA and Portland Cement associated with Different radiopacifying agents. *ISRN Dent.* 2012;(2012): 898051.
65. Guerreiro-Tanomaru JM, Cornélio AL, Andolfatto C, Salles LP, Tanomaru-Filho M. pH and Antimicrobial Activity of Portland Cement Associated with Different Radiopacifying Agents. *ISRN Dent.* 2012; (2012): 469019.
66. Amoroso-Silva PA, Marciano MA, Guimarães BM, Duarte MA, Sanson AF, Moraes IG. Apical adaptation, sealing ability and push-out bond strength of five root-end filling materials. *Braz Oral Res.* 2014; 28(1): 1-6.
67. Collares FM, Klein M, Santos PD, Portella FF, Ogliari F, Leitune VC, et al. Influence of radiopaque fillers on physicochemical properties of a model epoxy resin-based root canal sealer. *J Appl Oral Sci.* 2013; 21(6): 533-9.
68. Güven EP, Yalvaç ME, Kayahan MB, Sunay H, Şahin F, Bayirli G. Human tooth germ stem cell response to calcium-silicate based endodontic cements. *J Appl Oral Sci.* 2013; 21(4): 351-7.
69. Walsh RM, Woodmansey KF, Glickman GN, He J. Evaluation of compressive strength of hydraulic silicate-based root-end filling materials. *J Endod.* 2014; 40(7): 969-72.
70. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. Mineral trioxide aggregate with anti-washout gel - properties and microstructure. *Dent Mater.* 2013; 29(3): 294-306.

71. Rodrigues EM, Cornélio AL, Mestieri LB, Fuentes AS, Salles LP, Rossa-Junior C, et al. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *Int Endod J*. 2017; 50(8): 780-789.
72. Camilleri J, Formosa L, Damidot D. The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J*. 2013; 46(9): 831-40a.
73. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C. Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate. *J Endod*. 2014; 40(10): 1632-7.
74. Eid AA, Gosier JL, Primus CM, Hammond BD, Susin LF, Pashley DH, et al. In vitro biocompatibility and oxidative stress profiles of different hydraulic calcium silicate cements. *J Endod*. 2014; 40(2): 255-60.
75. Chan DC, Titus HW, Chung KH, Dixon H, Wellingshoff ST, Rawls HR. Radiopacity of tantalum oxide nanoparticle filled resins. *Dent Mater*. 1999; 15(3): 219-22.
76. Donkov N, Zykova A. Tantalum pentoxide ceramic coatings deposition on Ti4Al6V substrates for biomedical applications. *Prob. At. Sci. Technol. Ser. Plasma Phys*. 2011:131–133.
77. Cho YD, Shin JC, Kim HL, Gerelmaa M, Yoon HI, Ryoo HM, Kim DJ, Han JS. Comparison of the osteogenic potential of titanium- and modified zirconia-based bioceramics. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(3): 4442-52.
78. Levine BR, Sporer S, Poggie RA, Della Valle CJ, Jacobs JJ. Experimental and clinical performance of porous tantalum in orthopedic surgery. *Biomaterials*. 2006; 27(27): 4671-81.
79. Camilleri J. Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine Used for Pulpotomy Procedures. *J Endod*. 2015; 41(7): 1139-45.
80. Govindaraju L, Neelakantan P, Gutmann JL. Effect of root canal irrigating solutions on the compressive strength of tricalcium silicate cements. *Clin Oral Investig*. 2017; 21(2): 567-571.
81. Saghiri MA, Garcia-Godoy F, Asatourian A, Lotfi M, Banava S, Khezri-Boukani K. Effect of pH on compressive strength of some modification of mineral trioxide aggregate. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(4): e714-20.
82. Pinheiro LS, Iglesias JE, Boijink D, Mestieri LB, Poli Kopper PM, Figueiredo JAP, et al. Cell Viability and Tissue Reaction of NeoMTA Plus: An In Vitro and In Vivo Study. *J Endod*. 2018; 44(7): 1140-45.
83. Konjhodzic-Prcic A, Jakupovic S, Hasic-Brankovic L, Vukovic A. Evaluation of Biocompatibility of Root Canal Sealers on L929 Fibroblasts with Multiscan EX Spectrophotometer. *Acta Inform Med*. 2015; 23(3): 135-7.

84. Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari H, Gaderian A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. *J Endod*. 2006; 32(8): 776-80.
85. 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.
86. American National Standard/American Dental Associations Standard No. 41
87. International Organization for Standardization – ISO 10993 (2016)
88. da Fonseca TS, da 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.
89. Manni ML, Czajka CA, Oury TD, Gilbert TW. Extracellular matrix powder protects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Tissue Eng Part A*. 2011; 17(21-22): 2795-804.
90. Koshimizu JY, Beltrame FL, de Pizzol JP Jr, Cerri PS, Caneguim BH, Sasso-Cerri E. NF- κ B overexpression and decreased immunoexpression of AR in the muscular layer is related to structural damages and apoptosis in cimetidine-treated rat vas deferens. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013; 9; 11:29.
91. Bills CE, Eisenberg H, Pallante SL. Complexes of organic acids with calciumphosphate: the Von Kossa stain as a clue to the composition of bone mineral. *Johns Hopkins Med J*. 1974; 128(4): 194-207.
92. Puchtler H, Meloan SN. Demonstration of phosphates in calcium deposits: a modification of von Kossa's reaction. *Histochemistry*. 1978; 12;56(3-4): 177-85.
93. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*. 1999; 25(3): 161-6.
94. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979; 11(4): 447-55.
95. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PF, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod*. 2009; 35(2): 256-60.
96. Siboni F, Taddei P, Zamparini F, Prati C, Gandolfi MG. Properties of BioRoot RCS, a tricalcium silicate endodontic sealer modified with povidone and polycarboxylate. *Int Endod J*. 2017; 50 Suppl 2:e120-e136.

97. Shakya VK, Gupta P, Tikku AP, Pathak AK, Chandra A, Yadav RK, et al. An In vitro evaluation of antimicrobial efficacy and flow characteristics for AH Plus, MTA Fillapex, CRCS and Gutta Flow 2 root Canal Sealer. *J Clin Diagn Res.* 2016; 10(8): ZC104-8.
98. Arias-Moliz MT, Camilleri J. The effect of the final irrigant on the antimicrobial activity of root canal sealers. *J Dent.* 2016 Sep;52:30-6.
99. Urban K, Neuhaus J, Donnermeyer D, Schäfer E, Dammaschke T. Solubility and pH Value of 3 Different Root Canal Sealers: A Long-term Investigation. *J Endod.* 2018;44(11):1736-1740.
100. Quintana RM, Jardine AP, Grechi TR, Grazziotin-Soares R, Ardenghi DM, Scarparo RK, et al. Bone tissue reaction, setting time, solubility, and pH of root repair materials. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(3): 1359-1366.
101. Li Y, Chi L, Stechschulte DJ, Dileepan KN. Histamine-induced production of interleukin-6 and interleukin-8 by human coronary artery endothelial cells is enhanced by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Microvasc Res.* 2001; 61(3): 253-62.
102. Sundararaj KP, Samuvel DJ, Li Y, Sanders JJ, Lopes-Virella MF, Huang Y. Interleukin-6 released from fibroblasts is essential for up-regulation of matrix metalloproteinase-1 expression by U937 macrophages in coculture: cross-talking between fibroblasts and U937 macrophages exposed to high glucose. *J Biol Chem.* 2009; 284(20): 13714-24.
103. de Oliveira PA, de Pizzol-Júnior JP, Longhini R, Sasso-Cerri E, Cerri PS. cimetidine reduces interleukin-6, matrix metalloproteinases-1 and -9 Immunoexpression in the gingival mucosa of rat Molars With Induced Periodontal Disease. *J Periodontol.* 2017; 88(1): 100-111.
104. da Fonseca TS, Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Delfino MM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biodentine and MTA modulate immunoinflammatory response favoring bone formation in sealing of furcation perforations in rat molars. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(3): 1237-52.
105. Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Targeting Interleukin-6 signaling in clinic. *Immunity.* 2019; 50(4): 1007-1023.
106. Hashizume M, Mihara M. The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis.* 2011; 2011:765624.
107. Silva EJ, Accorsi-Mendonça T, Pedrosa AC, Granjeiro JM, Zaia AA. Long-Term Cytotoxicity, pH and dissolution rate of AH Plus and MTA F2illapex. *Braz Dent J.* 2016; 27(4): 419-23.
108. Silva EJ, Rosa TP, Herrera DR, Jacinto RC, Gomes BP, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. *J Endod.* 2013; 39(2): 274-7.

109. Andrade AS, Silva GF, Camilleri J, Cerri ES, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS, et al. Tissue Response and immunoexpression of interleukin 6 promoted by tricalcium silicate-based repair materials after subcutaneous implantation in rats. *J Endod*. 2018; 44(3): 458-463.
110. Sepehri ZS, Masoomi M, Ruzbehi F, Kiani Z, Nasiri AA, Kohan F, et al., Comparison of serum levels of IL-6, IL-8, TGF- β and TNF- α in coronary artery diseases, stable angina and participants with normal coronary artery. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2018; 30;64(5): 1;-6.
111. Kim GW, Lee NR, Pi RH, Lim YS, Lee YM, Lee JM, Jeong HS, Chung SH. IL-6 inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis: past, present, and future. *Arch Pharm Res*. 2015; 38(5): 575-84.
112. Narazaki M, Tanaka T, Kishimoto T. The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017 Jun;13(6):535-551.
113. Avci AB, Feist E, Burmester GR. Targeting IL-6 or IL-6 receptor in rheumatoid arthritis: What's the difference? *BioDrugs*. 2018; 32(6): 531-546.
114. Noh MK, Jung M, Kim SH, Lee SR, Park KH, Kim DH, et al. Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. *Exp Ther Med*. 2013; 6(3): 847-851.
115. Sawada S, Chosa N, Ishisaki A, Naruishi K. Enhancement of gingival inflammation induced by synergism of IL-1 β and IL-6. *Biomed Res*. 2013; 34(1): 31-40.
116. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Nery MJ, Filho JA, Dezan E Jr, Bernabé PF. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX®. *Dent Traumatol*. 2012; 28(6): 452-6.
117. Poggio C, Riva P, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Comparative cytotoxicity evaluation of eight root canal sealers. *J Clin Exp Dent*. 2017; 1;9(4):e574-e578.
118. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod*. 2004; 30(2): 95-9.
119. Susan N. Meloan & Holde Puchtler. Chemical Mechanisms of Staining Methods: Von Kossa's Technique: What von Kossa Really Wrote and a Modified Reaction for Selective Demonstration of Inorganic Phosphates, *J. Histotechnol* (1985) 8:(1), 11-13.
120. Cintra LT, Ribeiro TA, Gomes-Filho JE, Bernabé PF, Watanabe S, Facundo AC, Samuel RO, et al. Biocompatibilidade e biomineralização avaliação de um novo raiz do canal vedante e raiz-fim de enchimento de material. *Dent Traumatol*. Abr 2013; 29 (2): 145-50.
121. Hoshino RA, Silva GFD, Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, et al. Physical properties, antimicrobial activity and in vivo tissue response to Apexit Plus. *Materials (Basel)*. 2020; 5;13(5). pii: E1171.

122. Gomes Filho JE, Queiroz ÍO, Watanabe S, Cintra LT, Ervolino E. Influence of diabetes mellitus on the mineralization ability of two endodontic materials. *Braz Oral Res.* 2016; 30;(25). 1806-8324.

ANEXO A – CERTIFICADO DA CEUA



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



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***"AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS MTA FILLAPEX E NEOMTA PLUS NO SUBCUTÂNEO DE RATOS"***, registrada com o nº 11/2017, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Paulo Sérgio Cerri** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 20/06/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Outubro/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato – Holtzman
Nº de animais	60
Peso/Idade	200-250g – 75 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério de criação da Faculdade de Odontologia de Araraquara

Carina A. F. Andrade
Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

ANEXO B – DECLARAÇÃO DA CEUA

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

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado ***"AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E BIOATIVIDADE DOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS MTA FILLAPEX E NEOMTA PLUS NO SUBCUTÂNEO DE RATOS"***, (Processo CEUA nº 11/2017), sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Paulo Sérgio Cerri** foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 20/06/2017, não apresenta pendências até o momento e seu relatório final está em fase de tramitação para análise.

Araraquara, 20 de março de 2020.

Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 2 anos após a data de sua defesa.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 24 de abril de 2020

Roberto Almela Hoshino