



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara

Juliana Alcarás Saraiva

**REAÇÃO TECIDUAL E DETECÇÃO DE
INTERLEUCINA-6 PROMOVIDA POR
CIMENTOS À BASE DE SILICATO DE
CÁLCIO NO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

Araraquara

2017



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



Juliana Alcarás Saraiva

REAÇÃO TECIDUAL E DETECÇÃO DE INTERLEUCINA-6 PROMOVIDA POR CIMENTOS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO NO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

**Araraquara
2017**

Saraiva, Juliana Alcarás

Reação tecidual e detecção de Interleucina-6 promovida por cimentos à base de Silicato de cálcio no subcutâneo de ratos / Juliana Alcarás Saraiva.-- Araraquara: [s.n.], 2017

75 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Endodontia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

1. Materiais biocompatíveis 2. Teste de materiais 3. Endodontia
4. Histologia 5. Interleucina-6 6 Colágeno I. Título

JULIANA ALCARÁS SARAIVA

REAÇÃO TECIDUAL E DETECÇÃO DE INTERLEUCINA-6
PROMOVIDA POR CIMENTOS À BASE DE SILICATO DE CÁLCIO
NO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Comissão Julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutora

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

2º Examinador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

3º Examinador: Prof.^a. Dr.^a. Gisele Faria

4º Examinador: Prof. Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte

5º Examinador: Prof.^a. Dr.^a. Raquel Assed Bezerra Segato

Araraquara, 15 de março de 2017.

DADOS CURRICULARES

JULIANA ALCARÁS SARAIVA

NASCIMENTO: 29 de março de 1985 – Marília – São Paulo

FILIAÇÃO: Valdeir de Almeida Saraiva

Ana Maria Alcarás Saraiva

2005-2010: Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, Araraquara-SP.

2011-2013: Mestrado em Ciências Odontológicas, área de concentração em Dentística Restauradora, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara. – FOAr/UNESP, Araraquara-SP.

2014-2016: Especialização em Endodontia pela Fundação Araraquarense de Ensino e Pesquisa em Odontologia – FAEPO/UNESP, Araraquara-SP.

2013 até o presente: Doutorado em Odontologia, área de concentração em Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, Araraquara-SP.

Dedicatória

Aos meus **pais Valdeir e Ana** por participarem comigo durante toda caminhada, me ajudando a construir todos os alicerces necessários para um futuro de sucesso. Ambos serão responsáveis por cada degrau avançado em toda a minha vida. Durante todos esses anos vocês foram pra mim um grande exemplo de força, de coragem, perseverança e energia infinita para nunca desistir diante do primeiro obstáculo encontrado. Vocês são e sempre serão meu maior porto seguro aqui embaixo, meu maior exemplo de vitória, meus heróis e, simplesmente, aqueles que mais amo. Obrigada por estarem sempre comigo. Vocês me ensinaram direta e indiretamente lições pra toda uma vida.

Agradecimentos

Primeiramente a **DEUS**, que com a ajuda Dele eu tive forças para chegar ao final dessa jornada. Me deu toda coragem que eu precisava para ir além e não me deixou faltar forças para ir até o final e quebrar as barreiras. Reconheço cada vez mais em todos os meus momentos, que Você é o maior mestre que uma pessoa pode conhecer e reconhecer.

Ao meu **noivo Rivelto**, por todo apoio e carinho. Por me dar forças para seguir em frente diante de qualquer dificuldade, e por me “aturar” nos meus momentos de stress. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Eu Amo Você!

Agradeço também à minha “Família de Araraquara”, **Geraldo, Donizete, Nayara e Mili** por todo carinho e amizade.

À minha “**filhinha de quatro patas**” **Malu**, pela alegria em me receber toda vez que chego em casa depois de um dia exaustivo, pela companhia diária, e pelo amor puro e verdadeiro que não exige nada em troca.

Aos meus **tios, tias, primos e primas** pelo apoio, pela torcida, pela saudade que sentem de mim por estar um pouquinho longe, por vibrarem com as minhas conquistas e que, nos momentos de minha ausência, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Aos meus **amigos da Turma 81**, por todos esses anos de amizade, ensinamentos, ajuda e alegria. Costumo dizer que “quem tem amigos, nunca está sozinho”. Não caberia nesse espaço, caso fosse citar um a um os nomes de todos os que me ajudaram em todo percurso. São pessoas que levarei no coração durante toda a vida. Portanto, meus amigos, sintam-se agradecidos.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr – UNESP**, nas pessoas da Diretora Elaine M.S. Massucato e Vice-Diretor Edson A. de Campos, além de todo Corpo Docente e Funcionários por ter me dado todo alicerce para a minha formação desde a Graduação até a Pós Graduação.

Ao Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, pela confiança em mim depositada, pela atenção desde os primeiros momentos no Doutorado, pela colaboração no desenvolvimento deste projeto, e pelas valiosas sugestões na minha Qualificação. Um exemplo de profissional e um orgulho em ser sua aluna.

Aos **professores da Disciplina de Endodontia: Prof. Dr. Fábio L.C.V. Berbert, Prof^a. Dr^a. Gisele Faria, Prof. Dr. Idomeo B. Filho, Prof^a. Dr^a. Juliane M.G. Tanomaru, Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho, Prof. Dr. Milton C. Kuga e Prof. Dr. Renato T. Leonardo**, por todo ensinamento e dedicação, inclusive durante o curso de Especialização, necessários para complementar a minha formação tanto profissional como pessoal.

Aos técnicos Pedro Sérgio Simões e Luís Antonio Potenza por toda ajuda durante as atividades no laboratório de Histologia, desde as etapas mais simples, até todo o processamento histológico.

Aos funcionários da Seção de Pós Graduação, **José Alexandre Garcia e Cristiano Afonso Lamounier**, por estarem sempre dispostos a ajudar durante toda minha pós-graduação.

À equipe de **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de sua diretora técnica Céres M.C.G. de Freitas, por sanar todas as dúvidas e pelo auxílio durante as consultas bibliográficas.

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

Aos funcionários **Marinho, Bel, Wanderlei, Marquinho e Marcelo** por todos esses anos de ajuda, aprendizagem e amizade. São pessoas que levarei no meu coração sempre.

Aos colegas da Pós-Graduação e Laboratório de Histologia e Embriologia: **Aline, Derik, Fabiane, Karina, Flávia, Roberto, José Paulo, Tiago e Guilherme**. Obrigada pela amizade, convivência e companheirismo. A “salinha” não seria a mesma sem vocês. Foram várias conversas, risadas, discussões, cafés da tarde e confraternizações, além de muito trabalho. Cada um de vocês têm um lugar especial no meu coração.

Ao **Pós-Doutorando Guilherme Ferreira da Silva, e ao Doutorando Tiago Silva da Fonseca**, obrigada por toda ajuda e amizade durante esses anos. Vocês foram imprescindíveis em todas as etapas deste trabalho. Um “Muitíssimo Obrigada” a vocês por tudo!

À **Prof.^a Dr.^a Estela Sasso Cerri**, pela amizade, pela agradável convivência, pela constante atenção dispensada e pela essencial colaboração no desenvolvimento deste projeto.

Muito Obrigada!

Agradecimento Especial

Um agradecimento especial ao **meu orientador, Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, por toda a dedicação e esforço em me orientar, mesmo com o tempo tão escasso por conta das inúmeras tarefas acumuladas como docente. Orgulho de ter convivido com um exemplo de profissional, pesquisador e professor. Obrigada por contribuir na minha formação com tantos ensinamentos, conhecimento e atenção. Levarei esse conhecimento e exemplo de ser humano durante a minha vida toda. Me orgulho em ser sua aluna e sua orientada.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

Saraiva JA. Reação tecidual e detecção de Interleucina-6 promovida por cimentos à base de silicato de cálcio no subcutâneo de ratos [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP; 2017.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a reação tecidual promovida pelos cimentos endodônticos MTA Plus e MTA Fillapex em comparação ao AH Plus, usado como padrão “ouro”, e ao Endofill, considerado como controle positivo, no subcutâneo de ratos. Foram utilizados 100 animais e em cada foi inserido no tecido subcutâneo dorsal um tubo de polietileno preenchido com MTA Plus, MTA Fillapex, AH Plus, Endofill ou vazio (grupo controle). Após 7, 15, 30 e 60 dias, os tubos implantados e os tecidos circundantes foram removidos, fixados e incluídos em parafina. Nos cortes corados com HE, a densidade de volume de células inflamatórias (VvCI) e fibroblastos (VvFb) foi estimada nas cápsulas. Imuno-histoquímica para detecção de interleucina-6 (IL-6) foi realizada e a densidade numérica de células imunopositivas foi computada. O conteúdo de colágeno birrefringente nas cápsulas foi quantificado nos cortes corados com picrosirius e analisados sob luz polarizada. Os dados foram analisados pelo ANOVA e teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Aos 7 dias, as cápsulas apresentaram reação inflamatória moderada. Em todos os grupos, a VvCI e as células imunopositivas para IL-6 reduziram significativamente de 7 para 60 dias. Aos 60 dias, o número de células imunopositivas para IL-6 foi significativamente reduzido nos grupos MTA Plus e MTA Fillapex em comparação ao AH Plus; diferenças significantes na VvCI entre MTA Plus, MTA Fillapex, AH Plus e grupo controle não foram observadas, enquanto que o Endofill exibiu a maior VvCI. A redução da VvCI foi paralela ao aumento do conteúdo de colágeno nas cápsulas de todos os grupos, exceto no Endofill. Portanto, o MTA Plus, MTA Fillapex e AH Plus induziram uma resposta que culmina na regressão da inflamação e formação de uma cápsula fibrosa com o decorrer do tempo. Considerando que a imunoexpressão para IL-6 reduziu significativamente nos grupos MTA Plus e MTA Fillapex, é possível sugerir que estes cimentos endodônticos possam favorecer a regressão da lesão periapical.

Palavras-chave: Materiais biocompatíveis. Teste de materiais. Endodontia. Histologia. Interleucina-6. Colágeno.

Saraiva JA. Tissue reaction and detection of interleukin-6 promoted by calcium silicate based sealers in rat subcutaneous. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP; 2017.

Abstract

We evaluated the tissue reaction promoted by MTA Plus, MTA Fillapex, AH Plus and Endofill in the rat subcutaneous. Polyethylene tubes filled with MTA Plus, MTA Fillapex, AH Plus or Endofill were implanted in the rat subcutaneous. In the control group (CG), empty tubes were implanted. After 7, 15, 30 and 60 days, the tubes surrounded by connective tissue were paraffin-embedded. In HE-stained sections, the volume density of inflammatory cells (VvIC) and fibroblasts (VvFb) was estimated in the capsules. Immunohistochemistry (IH) for interleukin-6 (IL-6) was performed, and the number of IL-6-immunolabeled cells was obtained. The birefringent collagen content was quantified in picrosirius-red-stained sections under polarized light. Data were analyzed by ANOVA and Tukey tests ($p \leq 0.05$). At 7 days, capsules showed moderate inflammatory reaction, and VvIC and IL-6-immunolabeled cells were similar either in the capsules adjacent to the sealers or in CG. In all groups, VvIC and IL-6 IH reduced significantly from 7 to 60 days. At 60 days, IL-6 IH was reduced significantly in MTA Plus and MTA Fillapex in comparison to AH Plus; no difference was found in the VvIC among MTA Plus, MTA Fillapex, AH Plus and CG whereas Endofill exhibited the highest VvIC. The reduction in VvIC was parallel to an increase in the collagen content in the capsules of in all groups, except Endofill. MTA Plus, MTA Fillapex and AH Plus induce a response that culminates in the regression of inflammation and formation of a fibrous capsule over time. Considering that IL-6 immunoexpression significantly reduced in the MTA Plus and MTA Fillapex groups, it is possible to suggest that these endodontic sealers may favor the regression of the periapical lesion.

Keywords: Biocompatible materials. Materials testing. Endodontics, Histology, Interleukin-6. Collagen.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MATERIAL E MÉTODO.....	24
4.1 Animais	24
4.2 Procedimentos cirúrgicos	26
4.3 Processamento histológico.....	28
4.4 Análise Morfológica	29
4.5 Densidade de volume (Vv) de células inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (VvFb).....	29
4.6 Reação imuno-histoquímica para detecção de IL-6	31
4.7 Densidade numérica de células positivas à IL-6	32
4.8 Estimativa do conteúdo de colágeno birrefringente	33
4.9 Análise Estatística.....	34
5 RESULTADO	35
5.1 Análise morfológica	35
5.2 Densidade de volume de células inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (VvFb)	36
5.3 Detecção imuno-histoquímica para IL-6 e densidade numérica de células imunopositivas	42
5.4 Conteúdo de colágeno birrefringente.....	45
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO.....	69

1 INTRODUÇÃO

O material utilizado para a obturação do canal radicular é um dos fatores determinantes para o sucesso do tratamento endodôntico³. Os cimentos obturadores devem apresentar biocompatibilidade, desde que alguns de seus componentes podem entrar em contato com os tecidos circundantes por meio dos canais acessórios, canais laterais e forame apical⁸³.

A composição química dos cimentos endodônticos está diretamente associada à resposta dos tecidos, podendo estimular uma resposta inflamatória ou a reparação dos tecidos periapicais^{2,100}. Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol promovem resposta inflamatória intensa, por longo período^{12,25,66,67}, causam necrose dos tecidos apicais culminando num processo inflamatório crônico na região periapical^{53,93,94}.

O cimento, o AH Plus, à base de resina epóxi, possui características favoráveis como adesão à estrutura dental, longo tempo de trabalho, fácil manipulação e inserção, e satisfatória capacidade seladora^{4,46}. Por todas essas vantagens, o AH Plus é considerado o cimento “padrão-ouro”, sendo muito utilizado em trabalhos que avaliam as propriedades de cimentos endodônticos^{19,46,95}.

O MTA Fillapex (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos Ltda, Londrina, Brasil) é um cimento endodôntico que contém silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, dióxido de silício e óxido de alumínio, e também contém 14% de óxido de bismuto (Bi_2O_3), utilizado como agente radiopacificador^{3,17,69}, além de resinas plásticas, sílica nanoparticulada e pigmentos. Embora o MTA tenha propriedades químicas e biológicas satisfatórias^{25,26,89,99}, este material é difícil de manusear, inserir nas cavidades, e apresenta um estendido tempo de presa^{23,89}, portanto foi necessário produzir um cimento com as

características satisfatórias do MTA. Este material apresenta como vantagens excelente viscosidade, alta radiopacidade e tempo de trabalho satisfatório, sendo, portanto, indicado como cimento obturador^{20,30,39,85}. Estudos que avaliam a biocompatibilidade e bioatividade do MTA Fillapex em culturas de células mostraram um efeito citotóxico nos períodos iniciais^{75,103}. Com o passar do tempo, foi observada a formação de nódulos de mineralização indicando a bioatividade deste cimento⁷⁵.

O MTA Plus (Avalon Biomed Inc., Bradenton, FL, EUA) é um material à base de silicato tricálcico, silicato dicálcico e Bi_2O_3 na forma pó-líquido/gel. Este material é indicado para terapias pulpares vitais (capeamento pulpar e pulpotomia) e procedimentos endodônticos, tais como obturação de canal radicular e retrobturação, reparo de perfurações e reabsorções internas, apicificação e apicegênese^{17,18,38}, desde que induz a liberação de hidróxido de cálcio como subproduto e formação de fosfato de cálcio quando em contato com fluido tecidual¹⁸. O MTA Plus apresenta partículas mais finas que o MTA, mas com a composição química semelhante¹⁶. O MTA Plus foi lançado no mercado apresentando um gel como veículo, o que proporciona melhor consistência, solubilidade e adesividade às paredes da dentina⁷², permitindo sua utilização como cimento obturador. Ao avaliar o potencial bioativo do MTA Plus, um estudo mostrou que este cimento é semelhante ao ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental Especialidades, York, PA, EUA), e libera íons cálcio em contato com água ou solução de Hanks¹⁷.

Em um estudo que avaliou o retratamento de caninos humanos extraídos, o MTA Fillapex mostrou ter maior adesão às paredes da dentina quando comparado ao MTA Plus. Por outro lado, o MTA Plus apresentou maior potencial de biomineralização do que o MTA Fillapex, sendo capaz de promover a deposição de

apatita dentro dos túbulos dentinários, semelhante a um “tag” entre a interface dentina-MTA Plus⁷⁰.

A resposta tecidual aos cimentos endodônticos é um dos parâmetros para o sucesso do tratamento endodôntico. Escassos são os estudos sobre as propriedades do MTA Plus, como cimento obturador (manipulado com gel), principalmente, no que se refere a biocompatibilidade deste produto. Assim, torna-se oportuno a avaliação da resposta tecidual provocada pelo MTA Plus no tecido subcutâneo de ratos, em comparação a outros tipos de materiais disponíveis no mercado para obturação de canais radiculares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O sucesso do tratamento endodôntico está diretamente relacionado à correta execução de todas as suas fases, desde um diagnóstico preciso, passando pela desinfecção eficaz dos canais radiculares e, finalmente, concluindo por uma correta obturação (Schilder⁸², 1967; Torabinejad, Pitt Ford⁹⁷, 1996). Dentre estas etapas, a obturação dos canais radiculares tem como objetivo selar o mais hermeticamente possível todo o sistema de canais radiculares com materiais que não interfiram e, de preferência, estimulem o processo de reparo periapical (Whitworth¹⁰⁰, 2005). Os cones de guta-percha, desenvolvidos em 1847, são os materiais sólidos de escolha para obturação dos canais radiculares, principalmente, por não serem irritantes aos tecidos apicais e periapicais. Além disso, para que haja um selamento adequado, associados aos cones de guta-percha, são utilizados cimentos endodônticos os quais têm a função de preencher os espaços existentes entre os cones e as paredes dos canais radiculares (Leonardo et al.⁵⁴, 1998; Leonardo, Leal⁵⁸, 2005).

Ao longo do tempo, inúmeros cimentos de diferentes composições têm sido desenvolvidos e avaliados para serem utilizados na obturação dos canais radiculares. Um cimento endodôntico ideal deve prevenir a infiltração de micro-organismos, ser insolúvel aos fluidos orais, possuir estabilidade dimensional, ser de fácil manipulação, possuir radiopacidade, não sofrer influência da umidade e deve apresentar biocompatibilidade (Torabinejad, Pitt Ford⁹⁷, 1996).

Em 1936, Grossman⁴² (1988) introduziu na endodontia os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, como por exemplo, o Endofill. Este cimento apresenta características físicas e químicas satisfatórias dentre elas bom tempo de trabalho, fácil manipulação e inserção no canal radicular, além do baixo custo, sendo, portanto, o cimento endodôntico ainda utilizado pelo cirurgião-dentista (Leonardo et

al.⁵⁴, 1998; Leonardo, Leal⁵⁸, 2005). Este cimento apresenta em sua composição o eugenol que, apesar de elevada atividade antimicrobiana (Sipert et al.⁹², 2005) é irritante aos tecidos apicais e periapicais (Correa et al.²⁴, 2009; Queiroz et al.⁷³, 2011).

Estudos em cães relataram que os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol causam necrose dos tecidos apicais com extenso processo inflamatório crônico na região periapical (Leonardo et al.⁵⁴, 1998; Tanomaru Filho et al.⁹⁴, 1998). Além disso, estudos realizados com implantes de tubos de polietileno em subcutâneo de ratos mostraram que este material provoca intensa resposta inflamatória, mesmo após período prolongado (Batista et al.⁹, 2007; Becker et al.¹⁰, 1983; Blackman et al.¹⁴, 1989; Jho et al.⁴⁵, 2016). O emprego deste cimento em selamento de perfurações de furca é acompanhado por um intenso e extenso processo inflamatório, reabsorção do processo alveolar, ocasionando um aumento significativo do espaço periodontal (da Silva et al.²⁶, 2011).

O AH Plus, por sua vez, é o material de escolha em relação aos cimentos à base de resina epóxica por apresentar favoráveis propriedades biológicas (Leonardo et al.⁵⁵, 1999; Leonardo, Leal⁵⁸, 2005). Este cimento apresenta também propriedades físicas e químicas consideradas como adequadas, tais como alta radiopacidade (Tanomaru Filho et al.⁹³, 2009) escoamento adequado (Bernardes et al.¹², 2010), baixa solubilidade (Garrido et al.³⁷, 2010) e boa capacidade seladora (Santos et al.⁷⁶, 2010). Estudos em que foram realizadas obturações de canais radiculares em dentes de cães mostraram que o AH Plus estimula a formação de tecido mineralizado na região periapical, obliterando, parcialmente, o forame apical. Além disso, este material, quando em contato com o tecido da região periapical,

provoca reação inflamatória suave no ligamento periodontal (Leonardo et al.⁵³, 2008; Leonardo et al.⁵⁵, 1999; Tanomaru Filho et al.⁹³, 2009).

O MTA (Mineral Trióxido Agregado) é um material que foi introduzido na endodontia, em 1993, com o objetivo inicial de selar as comunicações da cavidade pulpar com o periodonto adjacente como, por exemplo, em casos de perfurações radiculares e retrobturações (Chong et al.²¹, 2003; Roberts et al.⁷⁴, 2008; Saunders⁷⁷, 2008; Torabinejad et al.⁹⁶, 1995; Torabinejad, Parirokh⁹⁸, 2010). O MTA é um pó composto principalmente por silicato tricálcico (66,1%), silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, dióxido de silício e óxido de alumínio, e também contém 14% de óxido de bismuto (Bi_2O_3), utilizado como agente radiopacificador (Camilleri et al.¹⁷, 2013). Atualmente, por este material apresentar melhor selamento marginal e biocompatibilidade (Baek et al.⁶, 2005; da Silva et al.²⁶, 2011; Holland et al.⁴³, 1999; Scarparo et al.⁷⁸, 2010; Silva et al.⁸⁹, 2015; Tanomaru-Filho et al.⁹³, 2009; Torabinejad et al.⁹⁶, 1995) quando comparado a outros materiais existentes no mercado, o MTA também tem sido considerado o produto de escolha em casos de reabsorção dentária interna ou externa, dentes com rizogênese incompleta, capeamento pulpar e pulpotomia, apicificação e material retrobturador em cirurgia parendodôntica (Holland et al.⁴³, 1999; Silva et al.⁸⁹, 2015; Tanomaru-Filho et al.⁹³, 2009).

Devido a sua biocompatibilidade, um estudo foi conduzido utilizando o MTA como material obturador único, ou seja, sem os cones principal e acessórios de guta-percha (Bogen, Kuttler¹⁵, 2009). Apesar dos autores terem relatado que houve sucesso no tratamento de alguns casos, o MTA não é indicado como cimento obturador de canais radiculares devido a sua consistência granular (Camilleri et al.¹⁶, 2013; Viola et al.⁹⁹, 2012) dificuldade de manipulação, inserir nas cavidades e um

longo tempo de presa (Coomaraswamy et al.²³, 2007; da Fonseca et al.²⁵, 2016). Assim, novos materiais, com MTA em sua composição, têm sido desenvolvidos para serem utilizados na obturação do canal radicular.

O MTA Fillapex (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, Brasil) é um material que foi desenvolvido com o objetivo de aliar as propriedades biológicas do MTA às propriedades físicas e químicas necessárias de um cimento obturador de canais radiculares (Assmann et al.³, 2012; Gomes-Filho et al.³⁹, 2012; Nagas et al.⁶⁹, 2012). Este cimento é basicamente composto por MTA, acrescido de resinas plásticas, sílica nanoparticulada, pigmentos e óxido de bismuto como radiopacificador (Assmann et al.³, 2012; Nagas et al.⁶⁹, 2012). Algumas das vantagens deste material são a capacidade osteocondutora, selamento marginal adequado, excelente fluidez, alta radiopacidade, alta solubilidade e tempo de trabalho satisfatório (Gomes-Filho et al.³⁹, 2012; Silva et al.⁸⁶, 2013; Silva et al.⁸⁷, 2016).

Há evidências de que o MTA Fillapex apresenta boa atividade antimicrobiana contra o *Enterococcus faecalis* (Morgental et al.⁶⁵, 2011) e que induz uma resposta tecidual moderada, semelhante às formulações originais do MTA (Grossman et al.⁴², 1988). No entanto, quando comparado ao AH Plus, o MTA Fillapex induz uma reação inflamatória mais intensa no tecido subcutâneo de ratos (Ferino³¹, 2012). Além disso, este cimento apresenta alta citotoxicidade nos períodos iniciais em culturas de células (Mestieri et al.⁶⁴, 2015; Salles et al.⁷⁵, 2012; Scelza et al.⁸⁰, 2012).

O MTA Fillapex em contato com células imortalizadas (osteoblastos de humano) apresentou bioatividade e biocompatibilidade, promovendo a deposição de nódulos de mineralização. Aos 7 dias, o MTA Fillapex apresentou um efeito citotóxico enquanto que, aos 21 dias, mostrou a formação de grande número de

nódulos de mineralização e presença de cristas de hidroxiapatita. Os autores concluíram com esse trabalho que o MTA Fillapex mostrou claramente a capacidade de estimular a formação de cristais de apatita em cultura de células semelhantes a osteoblastos humanos, sendo um material promissor na obturação de canais radiculares (Salles et al.⁷⁵, 2012).

Outro material à base de MTA é o MTA Plus (Avalon Biomed Inc, FL, EUA) o qual foi introduzido no mercado com o objetivo de ser utilizado em várias situações clínicas, incluindo obturação de canais radiculares. Este material possui como veículo um gel hidrossolúvel que promove uma mistura estável, diminuindo a solubilidade do produto (Qi et al.⁷², 2012) e, segundo o fabricante (MTA Plus⁶⁸, 2012), é composto por finas partículas de MTA o que melhora a incorporação do pó ao gel, facilitando a manipulação e inserção do material no interior do canal radicular (Formosa et al.³⁴, 2013). Além disso, este gel melhora a consistência, a solubilidade e adesividade às paredes dentinárias (Qi et al.⁷², 2012) permitindo seu uso como material obturador. A proporção pó/gel deste material pode variar a partir de 1:1 até 4:1, dependendo da aplicação clínica a ser utilizado; na obturação de canais radiculares a proporção utilizada é 1:1 (uma gota do gel para uma colher medidora de pó).

O MTA Plus usado como agente de proteção após pulpotomias em dentes de ratos foi considerado um material biocompatível desde que promoveu baixa concentração de IL-1 β e IL-1 α no tecido pulpar e estimulou a formação de ponte de dentina após 30 e 60 dias (Kramer et al.⁵¹, 2014).

A biocompatibilidade e bioatividade do MTA Fillapex e MTA Plus foi avaliada usando cultura de células da polpa dentária de terceiros molares de humanos. Este estudo mostrou que o MTA Plus apresentou biocompatibilidade e bioatividade em

cultura de células da polpa dentária, enquanto que o MTA Fillapex mostrou citotoxicidade nos períodos iniciais (24 horas) (Mestieri et al.⁶⁴, 2015).

A reação tecidual promovida pelos materiais obturadores é de fundamental importância para o desenvolvimento do mesmo. No processo inflamatório, a primeira etapa é a agressão ao tecido causando a migração de diversas células inflamatórias. A intensidade e progressão desse processo inflamatório depende de fatores locais e sistêmicos, envolvendo eventos celulares que resultam na produção e liberação de moduladores da inflamação, tais como interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e prostaglandinas (PGE) (Hrabák et al.⁴⁴, 2008; Nibali et al.⁷¹, 2012).

A IL-6 é uma citocina multifuncional inflamatória sintetizada em resposta a um trauma ou uma infecção, que pode ativar células específicas exercendo assim um papel importante na reação inflamatória e reabsorção óssea (de Oliveira et al.²⁷, 2017; Florencio-Silva et al.³², 2015). A IL-6 é secretada por monócitos, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e linfócitos T (da Fonseca et al.²⁵, 2016; Scheller et al.⁸¹, 2011) e é frequentemente encontrada nas pulpites e nos processos inflamatórios dos tecidos periapicais estimulando a diferenciação e o recrutamento de osteoclastos (Barkhordar et al.⁸, 1999; Nibali et al.⁷¹, 2012).

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a reação tecidual promovida pelo MTA Plus no tecido subcutâneo de ratos. Para esse propósito, foram realizadas análises morfológica e morfométrica para avaliar a extensão do processo inflamatório nas cápsulas adjacentes aos materiais bem como a possível formação de colágeno, em consequência da regressão da reação inflamatória ao decorrer do tempo.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a reação tecidual promovida pelo MTA Plus e MTA Fillapex em subcutâneo de ratos. A reação tecidual provocada por este cimento foi comparada as reações do AH Plus, usado como padrão “ouro”, e Endofill como controle positivo.

Nossos objetivos específicos foram avaliar as cápsulas formadas adjacentes aos materiais nos seguintes parâmetros:

- A intensidade do processo inflamatório e a sua possível regressão ao decorrer do tempo e formação de uma cápsula fibrosa.
- A imunoexpressão de interleucina-6, citocina pró-inflamatória, nas células das cápsulas nos diferentes períodos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

O protocolo da presente pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP (Processo CEUA nº 27/2013) (ANEXO).

Neste estudo, foram utilizados 100 ratos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*) adultos jovens, pesando em média 220 gramas, provenientes do Biotério de Criação da Faculdade de Odontologia, Campus de Araraquara (UNESP). Os animais foram mantidos no Biotério do Subsolo do Prédio de Biomorfologias da FOAr-UNESP, em ambiente com temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($55\pm 10\%$) controladas e fotoperíodo de 12 horas. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno forradas com maravalha e receberam ração e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos equitativamente em cinco grupos: MP (MTA Plus, Avalon Biomed Inc., Bradenton, Flórida, EUA), MF (MTA Fillapex, Ângelus, Londrina, Paraná, Brasil), AP (AH Plus, Dentsply, De Trey, Konstanz, Alemanha), EF (Endofill, Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) e C (Grupo controle; tubos de polietileno vazios). A composição, proporção e marca comercial dos materiais avaliados estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 - Nome, composição, proporção de manipulação utilizada e marca comercial dos materiais avaliados.

Materiais	Composição	Proporção de manipulação	Marca Comercial
MTA Plus	Pó: silicato tricálcio, óxido de bismuto, silicato dicálcio, sulfato de cálcio, sílica Gel: solução à base de água	Pó: 78mg Gel: 50mg Dosar 1 medida do pó e uma ampola do gel. Espatular até conseguir uma consistência pastosa.	Avalon Biomed Inc. Bradenton, FL, USA
MTA Fillapex	Resina salicilato, Resina diluente, Resina natural, Óxido de Bismuto, Sílica nanoparticulada, Trióxido Agregado Mineral, Pigmentos	1 cm de cada pasta Dosar quantidades iguais de ambas as pastas e espatular por 30 segundos	Ângelus, Londrina, PR, Brasil
AH Plus	Pasta A: resina epóxica, tungstênio de cálcio, óxido de zircônia, sílica, óxido de ferro e pigmentos. Pasta B: aminas, tungstênio de cálcio, óxido de zircônio, sílica, óleo de silicone	1 cm de cada pasta Dosar quantidades iguais de ambas as pastas e espatular por 20 segundos.	Dentsply, De Trey, Konstanz, Alemanha
Endofill	Pó: óxido de zinco, resina hidrogenada, subcarbonato de bismuto, sulfato de bário and borato de sódio. Líquido: eugenol e óleo de amêndoa	Pó: 1g Líquido: 220 µL Dispensar 3 gotas do líquido na placa de mistura. Adicionar pó ao líquido até conseguir uma consistência que, ao colocar a espátula sobre a mistura e levantá-la, irá formar um fio de cimento que se romperá quando atingir um comprimento de, aproximadamente, 2 cm.	Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil

Fonte: Elaboração própria

4.2 Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com uma solução contendo 80 mg/kg cloridrato de cetamina a 10% (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) e 8 mg/kg de cloridrato de xilazina a 2% (União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo, São Paulo, Brasil), administrada por via intraperitoneal com seringa e agulha de insulina

Após sedação, o animal foi posicionado em decúbito ventral para realização da tricotomia e antissepsia da região com solução de iodo a 5%. Uma incisão de 2 cm foi realizada no sentido crânio-caudal com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15 (Fibra Cirúrgica, Joinville, Santa Catarina, Brasil). A pele foi divulsionada com tesoura de ponta romba e, posteriormente, foi inserido um tubo de polietileno (Embramed Indústria e comércio Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil) medindo 10 mm de comprimento x 1,5 mm de diâmetro, previamente esterilizado em óxido de etileno (Viola et al.⁹⁹, 2012). Os tubos foram preenchidos com os materiais descritos no Quadro 1 e, no grupo controle (C), os tubos permaneceram vazios.

Em cada animal foi colocado somente um implante no subcutâneo dorsal; foram utilizados 5 animais por grupo em cada período. O local da pele incisada foi suturado com pontos simples utilizando fio de seda 4-0 (Ethicon Inc., São José dos Campos, São Paulo, Brasil). Após 7, 15, 30 e 60 dias aos implantes, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico e os implantes com os tecidos circundantes foram cuidadosamente removidos (Figuras 1A-1I).

Figura 1 – Sequência cirúrgica da inserção e remoção do tubo de polietileno no tecido subcutâneo dorsal do rato

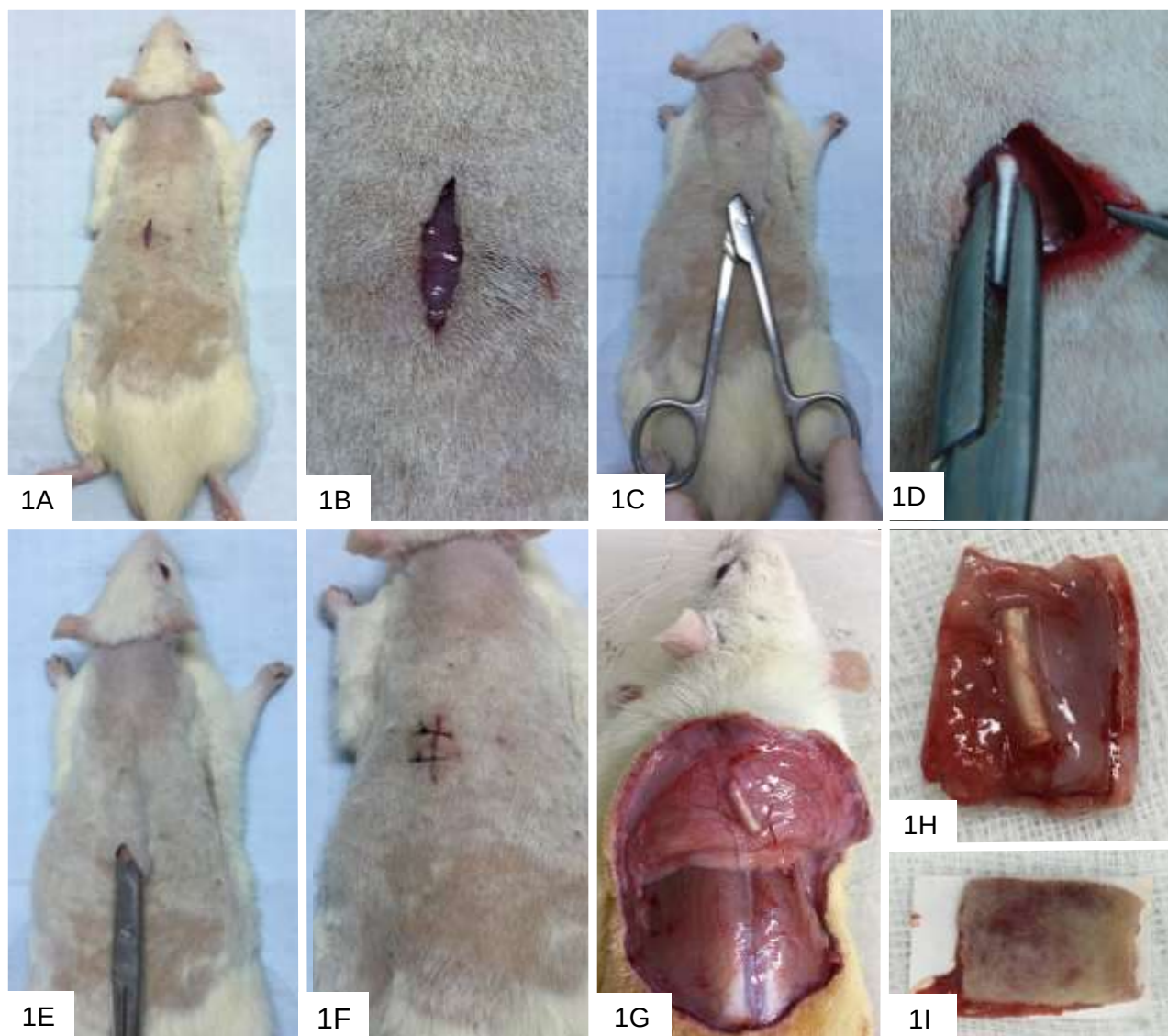


Figura 1A-1I – Sequência cirúrgica da inserção e remoção do tubo de polietileno no tecido subcutâneo dorsal do rato. **Figura 1A-1B** – com o rato anestesiado, após a tricotomia e assepsia, com uma lâmina de bisturi foi realizada uma incisão de aproximadamente 2cm no sentido crânio-caudal. **Figura 1C** – divulsão do tecido com uma tesoura de ponta romba para criar uma “bolsa cirúrgica” onde será inserido o tubo de polietileno. **Figura 1D-1E** - Tubo de polietileno com o cimento em seu interior sendo inserido na bolsa cirúrgica criada no tecido subcutâneo do rato. **Figura 1F** – sutura da incisão realizada com fio de seda. **Figura 1G** - rato anestesiado, em decúbito ventral, no momento da remoção do implante no subcutâneo. **Figura 1H** - remoção de uma porção do tecido contendo o tubo de polietileno implantado no subcutâneo. **Figura 1I**- corte sobre papel filtro para evitar dobramento do tecido.

Fonte: Elaboração própria

4.3 Processamento histológico

Os implantes envolvidos pelos tecidos foram removidos e, imediatamente, imersos na solução de formaldeído a 4% (preparado a partir do paraformaldeído) tamponada com fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,2, durante 48 horas. Após fixação, os espécimens foram lavados em água corrente durante 4 horas e, subsequentemente, foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70° GI, 80° GI, 90° GI e 100° GI). Após a desidratação, os espécimens foram diafanizados com xilol (3 banhos de 1 hora cada). Após a diafanização, os espécimens foram embebidos em parafina líquida (60°C), por aproximadamente 4 horas (3 trocas de parafina), e incluídos em parafina. Os espécimens (implantes + tecidos adjacentes) foram posicionados de maneira a possibilitar a obtenção de cortes longitudinais em relação aos tubos de polietileno. Após confecção dos blocos de parafina contendo os espécimens, com auxílio de um estilete e de uma lâmina de bisturi no 15, o tubo de polietileno foi cuidadosamente removido e inserido parafina no seu espaço.

Com um micrótomo rotativo (Leica, modelo RM2125 RST, Heidelberg, Alemanha) e navalhas descartáveis de aço inoxidável (Leica, modelo 818, Heidelberg, Alemanha), foram obtidos 60 cortes com 6µm de espessura, sendo que foram aderidos 3 cortes em cada lâmina. Cortes não seriados, com distância mínima de 100 µm, foram corados com HE para a análise morfológica e quantitativa. Os cortes aderidos as lâminas previamente tratadas com silano a 4% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), foram submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de interleucina-6 (IL-6).

4.4 Análise Morfológica

Os cortes não seriados dos implantes corados com hematoxilina & eosina (HE) foram utilizados para a descrição morfológica da reação tecidual provocada pelos materiais. Na análise morfológica (Figura 2), foi avaliada a presença do processo inflamatório na cápsula, bem como a sua extensão; considerou-se também o tipo de tecido conjuntivo que constituía a cápsula, presença de vasos sanguíneos, células gigantes multinucleadas, fibroblastos e fibras colágenas.

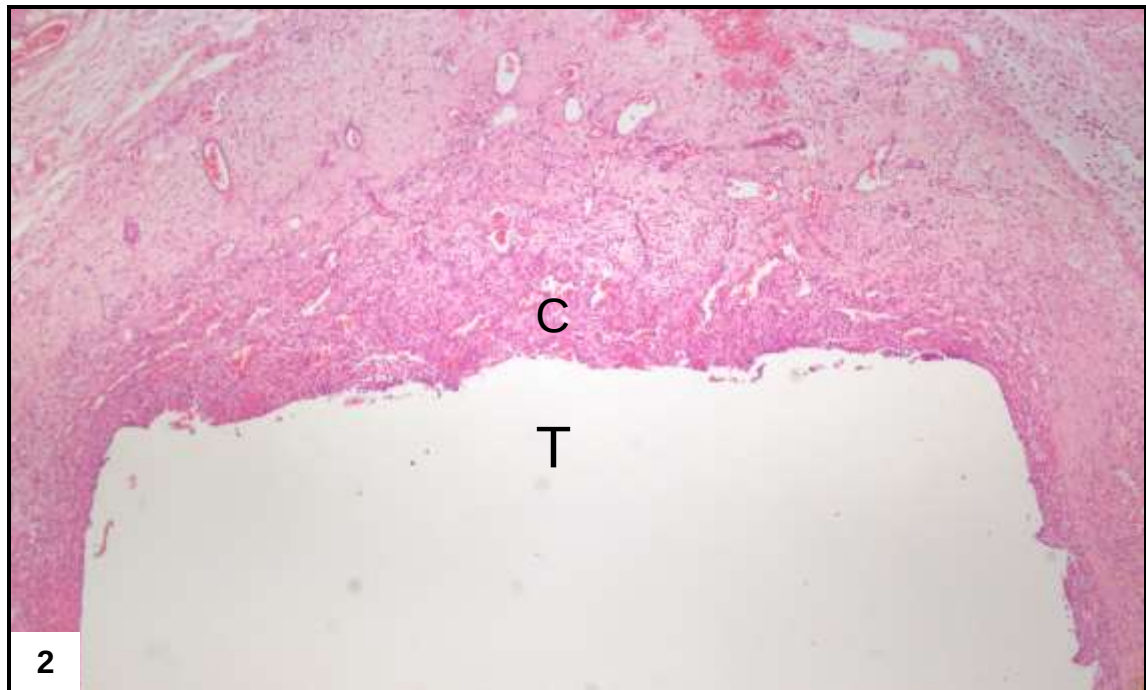
4.5 Densidade de volume (Vv) de células inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (VvFb)

Com o objetivo de estimar a incidência de células inflamatórias e de fibroblastos nas cápsulas, optou-se pela análise da densidade de volume⁶¹. A densidade de volume (Vv) foi realizada em 3 cortes não seriados corados com HE, mantendo-se um intervalo mínimo de 100µm entre os cortes. Esta análise quantitativa foi realizada em 3 cortes de cada implante de todos os espécimes, ou seja, nos 5 animais de cada grupo/período.

Com auxílio de uma câmera (DP-71, Olympus® – Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus®, modelo BX-51), em aumento de 40x, imagens da cápsula adjacente aos materiais implantados foram capturadas (Figura 3). Posteriormente, com um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus®–Japão), uma grade reticular padronizada, contendo 204 intersecções/pontos, foi sobreposta às imagens capturadas. O número de pontos sobre as células inflamatórias e os fibroblastos foram computados; os pontos que incidiram sobre vasos sanguíneos, espaço extracelular, fibras de colágeno, células gigantes multinucleadas e partículas de material foram computados como outros

(VvO). Dessa maneira, foi obtido a densidade de volume de células inflamatórias (VvCl) e fibroblastos (VvFb).

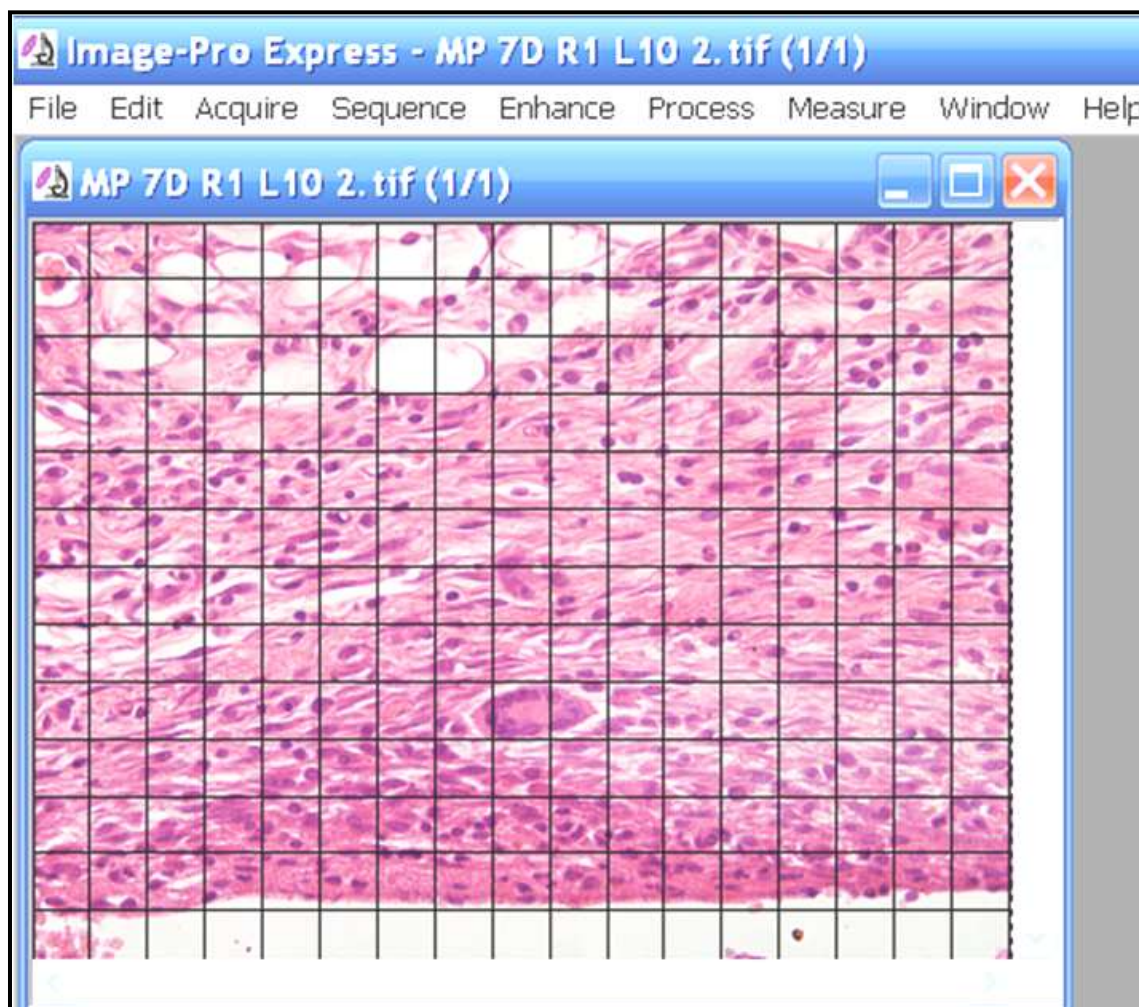
Figura 2 – Aspecto geral da cápsula



A fotomicrografia mostra uma porção do corte exibindo os tecidos adjacentes ao tubo de polietileno implantando no subcutâneo. A letra T indica o espaço ocupado pelo tubo de polietileno que foi removido para obtenção do corte histológico. Aspecto geral da cápsula (C) adjacente à abertura do tubo implantado. HE. 65x.

Fonte: Elaboração própria

Figura 3 – Imagem ilustrativa do método quantitativo



A imagem representa um “print screen” da tela do computador de uma fotomicrografia capturada com a câmera DP-71 acoplada ao microscópio Olympus. Com auxílio do programa de análise de imagem (Image Pro-Express, Olympus), a imagem foi aberta e, após a calibração, uma grade reticular contendo 204 intersecções/pontos (sistema teste) foi sobreposta à imagem. Para facilitar a identificação das células e demais estruturas foi dado um “zoom”. Dessa maneira, foram computadas as células e estruturas que incidiram as intersecções (seta), possibilitando a obtenção da densidade de volume de cada estrutura. HE. 695X

Fonte: Elaboração própria

4.6 Reação imuno-histoquímica para detecção de IL-6

Para a detecção de IL-6, foi utilizado o anticorpo primário anti-IL-6 produzido em cabra (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Califórnia, EUA). Após

desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001 M com pH 6,0 e submetidos ao tratamento com micro-ondas por 20 minutos a 90-94°C, para recuperação antigênica. Após o resfriamento, os cortes foram lavados em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,4) e, em seguida, imersas 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 a 2% (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, USA), por 20 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* (16 a 18 horas) em câmara úmida a 4°C com anticorpo primário anti-IL-6 (diluição 1:100)

Após as lavagens em tampão Tris-HCl, a reação para IL-6 foi amplificada utilizando-se o anticorpo anti-IgG biotinilado de coelho/camundongo/cabra (LSAB, Dako Inc., Carpinteria, Califórnia, EUA), por 40 minutos. Após lavagem em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados com o complexo HRP (System-HRP, Dako Inc., Carpinteria, Califórnia, EUA), por 40 minutos. Os cortes foram então lavados com tampão e a atividade da peroxidase foi revelada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Dako Inc., Carpinteria, Califórnia, EUA) durante 2-3 minutos. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Carazzi, desidratados, diafanizados e montados para análise ao microscópio de luz. Como controle negativo da reação, alguns cortes foram submetidos às mesmas etapas, exceto a etapa de incubação com anticorpo primário; nesta etapa, os cortes foram incubados com soro não imune.

4.7 Densidade numérica de células positivas à IL-6

Com o objetivo de verificar se houve diferenças entre os grupos e períodos, o número de células imunopositivas para IL-6 foi estimado nas cápsulas dos implantes

de cada grupo/período. Com auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão), uma área padrão de 0,09mm² da cápsula adjacente à abertura do tubo implantado foi capturada, em aumento de 40x. O número de células imunopositivas à IL-6 foi computado com auxílio de um programa de análise de imagens (Image Pro-Express 6.0, Olympus, Tóquio, Japão). Assim, o número de células imunopositivas/mm² de cápsula foi obtido para cada implante; posteriormente, calculou-se a média para cada grupo em cada período.

4.8 Estimativa do conteúdo de colágeno birrefringente

O conteúdo de colágeno birrefringente nas cápsulas foi estimado a partir de cortes submetidos método do picrossirius-red e analisados com filtros de polarização acoplados ao microscópio de luz (BX-51, Olympus, Tóquio, Japão). Foram utilizados 3 cortes não seriados (com intervalo mínimo de 100 µm) por implante, em todos os períodos. Em cada corte, uma imagem da cápsula foi capturada com auxílio de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) e objetiva de 40x. As imagens foram capturadas com parâmetros padronizados de intensidade de luz, abertura do diafragma de campo, abertura do diafragma do condensador, altura do condensador, objetiva, angulação do polarizador, brilho e contraste da imagem.

O conteúdo de colágeno birrefringente foi estimado usando metodologia previamente descrita^{49,62}. Com um programa de imagens (Image J, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), os matizes resultantes da birrefringência das imagens das cápsulas foram analisados a partir do histograma de matiz disponível no guia “Color Threshold”. O número de pixels de cada matiz (vermelho/alaranjado: matizes 2 a 38 e 230 a 256; amarelo: matizes 39 a 51; verde:

matizes 52 a 128) foi expresso como uma porcentagem do total de colágeno birrefringente no corte da porção da cápsula. Deste modo, os dados representam, em porcentagem, a soma dos matizes nos 3 cortes da cápsula de cada implante.

4.9 Análise Estatística

As possíveis diferenças entre os grupos em cada período e as diferenças de cada grupo com o decorrer do tempo foram submetidas ao teste de normalidade e, posteriormente, avaliadas pelo two-way ANOVA seguido pelo teste Tukey (GraphPad Software Inc, San Diego, Califórnia, USA). O nível de significância considerado foi $p \leq 0,05$.

5 RESULTADO

5.1 Análise morfológica

Aos 7 dias, os implantes de todos os grupos estavam envolvidos por uma espessa cápsula contendo diversas células inflamatórias, principalmente linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Figuras 4A-4J). Além disso, alguns fibroblastos e vasos sanguíneos também foram observados nas cápsulas. A porção mais interna das cápsulas – em íntima proximidade aos materiais – continha escassos componentes da matriz extracelular, ou seja, colágeno e substância fundamental amorfa (Figuras 4F-4J). No entanto, células inflamatórias não foram observadas nos tecidos adjacentes às cápsulas com limites bem definidos (Figuras 4A-4E). Ocasionalmente, células gigantes multinucleadas foram observadas nas cápsulas (Figura 4F). Na cápsula do EF, foram observados alguns neutrófilos (Figura 4I).

No período de 15 dias, uma diferença evidente na distribuição e arranjo dos tipos celulares foi observado nas cápsulas do MTA Plus e MTA Fillapex em comparação aos demais grupos (Figuras 5A-5E). Na porção mais interna das cápsulas do MP e do MF continham, predominantemente, fibroblastos; as células inflamatórias estavam situadas principalmente próximas aos vasos sanguíneos nas porções mais distante da superfície dos materiais (Figuras 5A e 5B). Em contraposição, as células inflamatórias e fibroblastos estavam distribuídos por toda a extensão nas cápsulas do AH Plus, Endofill e controle (Figuras 5C-5E). Nota-se a presença de neutrófilos na cápsula do EF (Figura 5D).

Aos 30 dias (Figuras 5F-5J), as cápsulas exibiram poucas células inflamatórias arredondadas e mononucleadas, principalmente linfócitos, entre típicos fibroblastos; feixes de fibras colágenas foram observados nas cápsulas de todos os

grupos, com exceção do Endofill onde as fibras colágenas eram escassas (Figura 5I).

Após 60 dias de implantação (Figuras 6A-6J), as cápsulas delgadas caracterizavam-se pela presença de um tecido conjuntivo fibroso, exceto as cápsulas do Endofill (Figuras 6A-6E). As cápsulas fibrosas exibiram alguns fibroblastos/fibrócitos situados entre os feixes de fibras colágenas; poucas células inflamatórias estavam presentes nas cápsulas adjacentes ao MTA Plus, MTA Fillapex, AH Plus e controle (Figuras 6F-6H e 6J). Em contraposição, uma moderada reação inflamatória ainda persistia nas cápsulas adjacentes ao Endofill (Figura 6I).

5.2 Densidade de volume de células inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (VvFb)

De acordo com a Tabela 1, os valores mais altos da VvCI nas cápsulas de todos os grupos foi observado no período de 7 dias. Após este período, uma redução gradativa e significativa na VvCI nas cápsulas de todos os grupos foi observada. No período de 15 dias, diferenças significantes não foram observadas na VvCI entre os grupos MP, MF e controle. Além disso, a VvCI foi maior significativamente nas cápsulas do AH Plus e Endofill em comparação aos grupos MTA Fillapex e controle. De 30 para 60 dias, diferenças significantes na VvCI não foram detectadas entre os grupos MP, AP, EF e o grupo controle. Aos 30 dias, não foi observada diferença significativa entre os grupos na VvCI. No entanto, no período de 60 dias, a VvCI nas cápsulas do Endofill foi significativamente maior em comparação aos demais grupos. A VvCI no Endofill foi aproximadamente 2 vezes superior aos valores obtidos nos outros grupos.

Aos 7 dias, a VvFb (Tabela 1) não apresentou diferenças significantes entre os grupos MP, MF, AP e C, enquanto que o valor do grupo EF foi significantemente maior em comparação aos grupos MP, MF e AP. Foi observada diferença significativa na VvFb apenas no grupo EF de 15 para 30 dias. Aos 60 dias, a VvFb nas cápsulas do grupo MF foi significantemente menor em comparação aos grupos MP, EF e C. Diferenças significantes não foram observadas entre os grupos MP, AP, EF e C.

Tabela 1 – Densidade de volume (Vv), em porcentagem (%), de células inflamatórias (VvCI) e fibroblastos (VvFb) nas cápsulas dos grupos MTA Plus (MP), MTA Fillapex (MF), AH Plus (AP), Endofill (EF) e Controle (C) aos 7, 15, 30 e 60 dias.

		MP	MF	AP	EF	C
7 dias	VvCI	15,4 ± 1,0 ^{a,1}	16,2 ± 3,1 ^{a,1}	15,2 ± 2,7 ^{a,1}	16,0 ± 2,7 ^{a,1}	15,6 ± 3,6 ^{a,1}
	VvFb	8,9 ± 1,5 ^{a,1}	6,8 ± 1,1 ^{a,1-3}	7,7 ± 1,8 ^{a,1}	12,4 ± 0,9 ^{b,1-2}	9,5 ± 2,1 ^{a-b,1}
	VvO	75,7 ± 2,4	76,9 ± 1,2	77,1 ± 1,8	71,5 ± 2,1	74,8 ± 2,1
15 dias	VvCI	7,2 ± 1,2 ^{a-b,2}	6,0 ± 2,0 ^{a,2-3}	10,1 ± 2,9 ^{b-c,2}	11,9 ± 1,5 ^{c,2}	5,2 ± 0,9 ^{a,2}
	VvFb	11,8 ± 2,2 ^{a,1}	14,6 ± 4,4 ^{a,2}	11,9 ± 5,0 ^{a,1-2}	15,8 ± 4,4 ^{a,1}	12,7 ± 3,1 ^{a,1}
	VvO	81,0 ± 2,7	79,3 ± 2,4	77,9 ± 3,9	72,2 ± 3,8	82,0 ± 2,9
30 dias	VvCI	4,5 ± 1,1 ^{a,2-3}	6,6 ± 2,1 ^{a,2}	5,2 ± 0,8 ^{a,3}	6,3 ± 1,6 ^{a,3}	4,0 ± 1,1 ^{a,2}
	VvFb	13,0 ± 4,4 ^{a,1}	10,7 ± 1,6 ^{a,1-2}	14,1 ± 3,7 ^{a,2}	10,2 ± 1,6 ^{a,2}	13,6 ± 5,0 ^{a,1}
	VvO	82,4 ± 2,5	82,62 ± 2,7	80,6 ± 2,5	83,3 ± 1,2	82,3 ± 2,0
60 dias	VvCI	3,8 ± 0,9 ^{a,3}	3,0 ± 0,5 ^{a,3}	4,3 ± 1,2 ^{a,3}	8,8 ± 0,6 ^{b,3}	3,9 ± 0,6 ^{a,2}
	VvFb	9,2 ± 0,7 ^{a,1}	5,2 ± 0,9 ^{b,3}	8,1 ± 2,3 ^{a-b,1}	8,8 ± 2,3 ^{a,2}	9,1 ± 2,3 ^{a,1}
	VvO	87,0 ± 1,0	91,8 ± 0,9	87,5 ± 1,8	82,3 ± 1,4	86,9 ± 1,2

*média ± desvio padrão

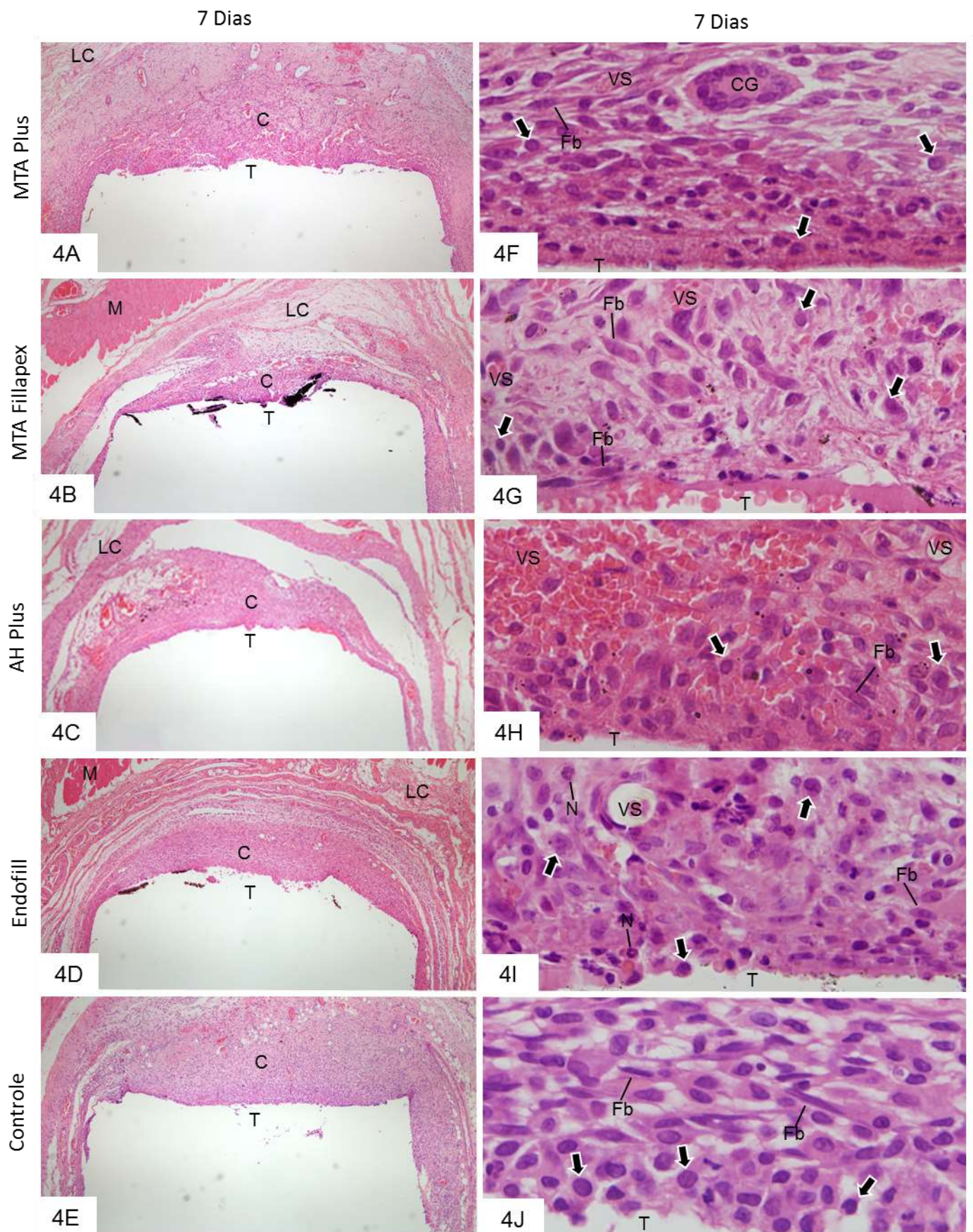
VvO: vasos sanguíneos, espaço extracelular, fibras colágenas e partículas de material.

A comparação entre os grupos está indicada pelas letras diferentes sobrescritas nas várias linhas.

A comparação entre os períodos está indicada pelos números diferentes sobrescritos nas colunas.

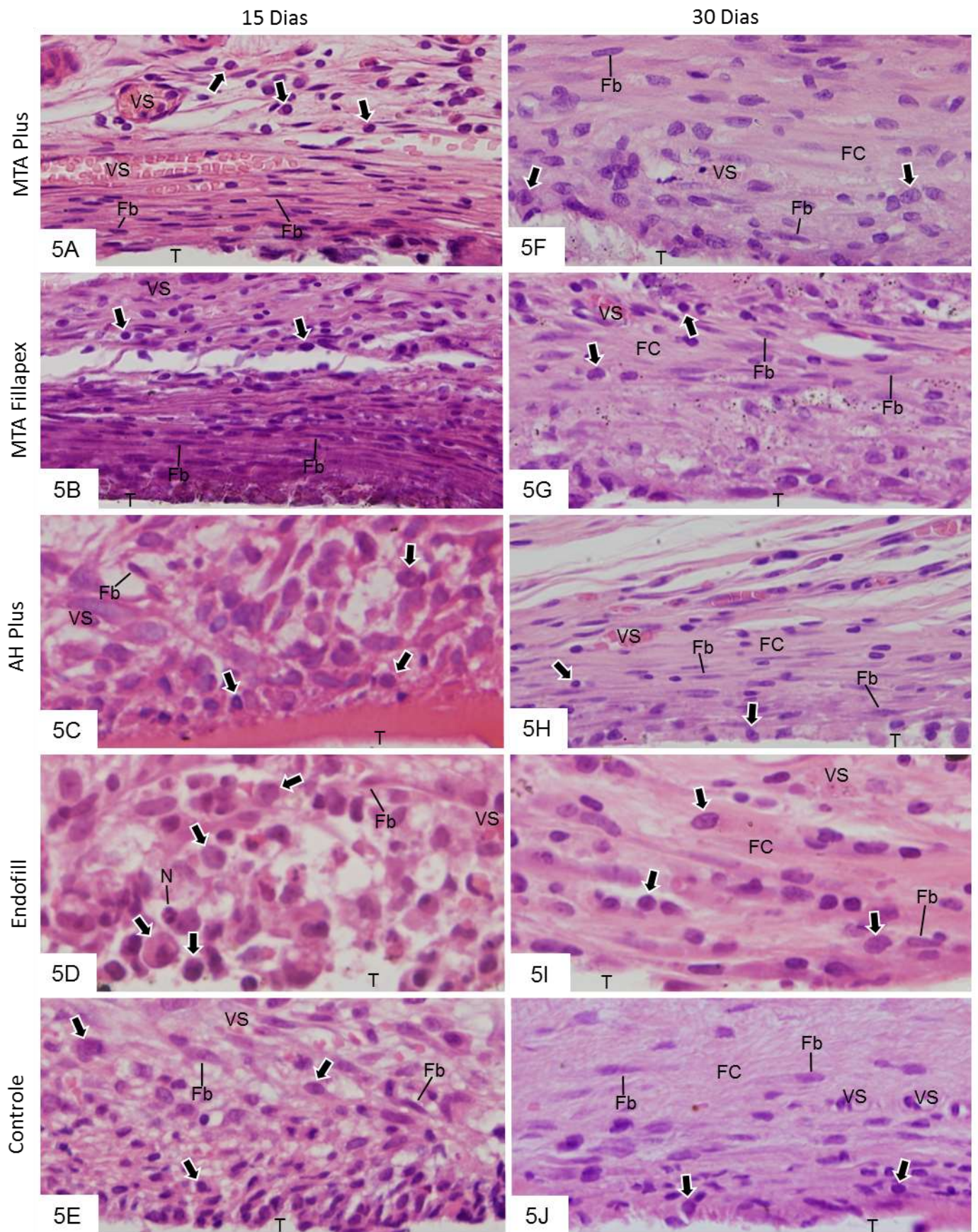
Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria



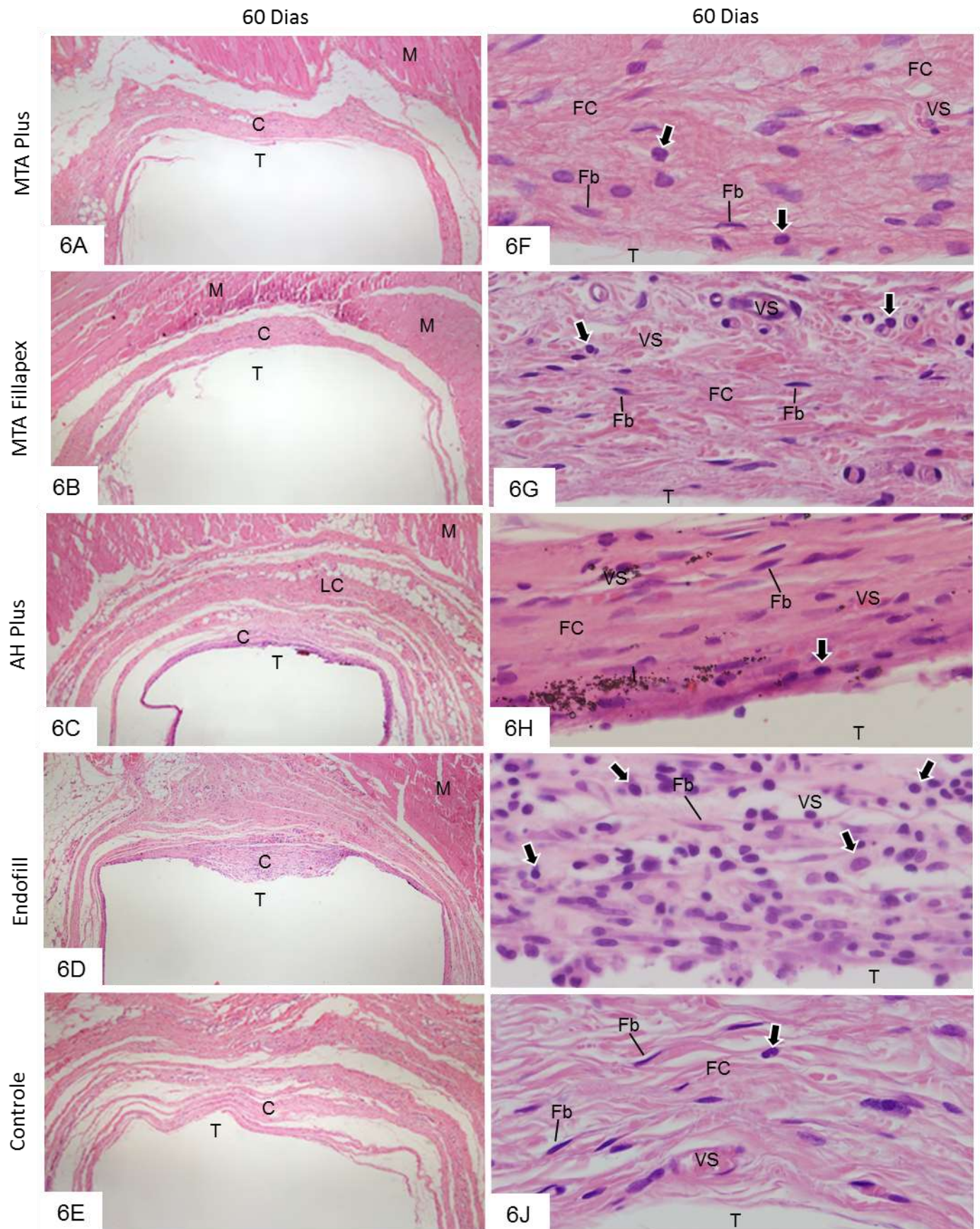
Fonte: Elaboração própria

Figuras 4A-4J – Fotomicrografias mostrando porções de cortes das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 7 dias. **Figuras 4A-4E** - visão geral mostrando as cápsulas (C) envolvendo a abertura dos tubos implantados (T). As cápsulas espessas (C) exibem uma densa população de células inflamatórias. Note que os tecidos adjacentes às cápsulas não exibem agregados de células inflamatórias. M, tecido muscular; LC, tecido conjuntivo frouxo. 25x. **Figuras 4F-4J** – as fotomicrografias mostram, em maior aumento, a porção mais interna das cápsulas (C). Diversas células inflamatórias (setas), principalmente linfócitos, plasmócitos e macrófagos, estão presentes nas cápsulas. N, neutrófilo; Fb, fibroblastos; CG, célula gigante multinucleada; VS, vasos sanguíneos. 530x. HE.



Fonte: Elaboração própria

Figuras 5A-5J – fotomicrografias mostrando a porção mais interna das cápsulas após 15 (**Figuras 5A-5E**) e 30 (**Figuras 5A-5E**) dias ao implante. **Figuras 5A-5E** - as cápsulas do MTA Plus (Figura 5A) e MTA Fillapex (Figura 5B) contêm diversos fibroblastos (Fb) em íntima proximidade aos cimentos endodônticos. Nestas cápsulas, as células inflamatórias (setas) estão situadas na porção mais externa das cápsulas. No AH Plus (Figura 5C), Endofill (Figura 5D) e controle (Figura 5E), células inflamatórias (setas) entre os fibroblastos (Fb) estão dispersas por toda a extensão das cápsulas. N, neutrófilo; VS, vaso sanguíneo. **Figuras 5F-5J** – as cápsulas apresentam poucas células inflamatórias (setas) entre típicos fibroblastos (Fb) e fibras colágenas (FC). Na **Figura 5B**, pequenas partículas do MTA Fillapex (em preto) estão dispersas pela cápsula. VS, vaso sanguíneo. 530x. HE.



Fonte: Elaboração própria

Figuras 6A-6J – Fotomicrografias mostrando porções de cortes das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 60 dias. **Figuras 6A-6E** – visão geral mostrando as cápsulas (C) envolvendo a abertura dos tubos implantados (T). As cápsulas são constituídas por um tecido conjuntivo denso (fibroso), com exceção do Endofill (Figura 6D). Adjacente ao Endofill, a cápsula contém diversas células inflamatórias. M, tecido muscular. 25x. **Figuras 6F-6J** – as fotomicrografias mostram, em maior aumento, a porção mais interna das cápsulas (C). No MTA Plus (Figura 6F), MTA Fillapex (Figura 6G), AH Plus (Figura 6H) e controle (Figura 6J), as cápsulas mostram típicos fibroblastos/fibrócitos (Fb) entre feixes espessos de fibras colágenas (FC); poucas células inflamatórias (setas) são ainda observadas. Na **Figura 6I**, a cápsula do Endofill exibe evidente presença de células inflamatórias (setas) entre fibroblastos (Fb). VS, vaso sanguíneo. 530x. HE.

5.3 Detecção imuno-histoquímica para IL-6 e densidade numérica de células imunopositivas

Os cortes das cápsulas de todos os grupos submetidos à reação imuno-histoquímica para IL-6 mostraram células inflamatórias e alguns fibroblastos exibindo citoplasma em castanho, ou seja, positivos à imunorreação. No entanto, uma acentuada imunopositividade foi observado nas cápsulas dos grupos aos 7 dias em comparação ao período de 60 dias (Figuras 7A-7J). Aos 60 dias, escassas células inflamatórias e poucos fibroblastos/fibrócitos imunomarcados estavam presentes entre os feixes de fibras colágenas nas cápsulas de todos os grupos, com exceção do Endofill (Figuras 7F-7J). As cápsulas do Endofill exibiram diversas células inflamatórias imunopositivas por toda a sua extensão (Figura 7I). Em contrapartida, os cortes de cápsulas de todos os grupos incubados sem o anticorpo primário (controle negativo), não exibiram células imunopositivas (dados não ilustrados).

De acordo com a Tabela 2, o número de células imunopositivas à IL-6 foi menor significativamente no grupo MP em comparação a todos os demais grupos no período de 7 dias. Aos 15, 30 e 60 dias, o número de células imunomarcadas foi significativamente maior nas cápsulas do EF em comparação aos grupos MP, MF, AP e C. Nos períodos de 15, 30 e 60 dias, os valores de células imunomarcadas no grupo controle foram menores significativamente em comparação aos grupos com cimentos; enquanto que o grupo EF apresentou um valor maior significativamente em comparação aos demais grupos.

Em todos os grupos, o número de células imunomarcadas nas cápsulas reduziu significativamente de 7 para 60 dias. Entre 7 e 15 dias, foi observada diferença estatisticamente significante apenas nos grupos AP, EF e C. Os grupos MP, AP e EF não apresentaram diferenças significantes de 15 para 30 dias. Entre 30

e 60 dias, houve redução significativa na densidade numérica de células imunopositivas nos grupos MP, MF e EF.

Tabela 2– Densidade numérica de células positivas à IL-6 nas cápsulas dos grupos MTA Plus (MP), MTA Fillapex (MF), AH Plus (AP), Endofill (EF) e Controle (C) aos 7, 15, 30 e 60 dias.

Períodos	MP	MF	AP	EF	C
7 dias	562±27 ^{a,1}	769±102 ^{b,1}	1013±106 ^{c,1}	931±111 ^{c-d,1}	840±167 ^{b-d,1}
15 dias	607±57 ^{a,1}	662±71 ^{a,1}	600±54 ^{a,2}	800±100 ^{b,2}	342±52 ^{c,2}
30 dias	569±104 ^{a,1}	520±42 ^{a,2}	598±68 ^{a,2}	744±57 ^{b,2}	182±54 ^{c,3}
60 dias	302±31 ^{a,2}	378±44 ^{a,3}	489±18 ^{b,2}	604±26 ^{c,3}	171±32 ^{d,3}

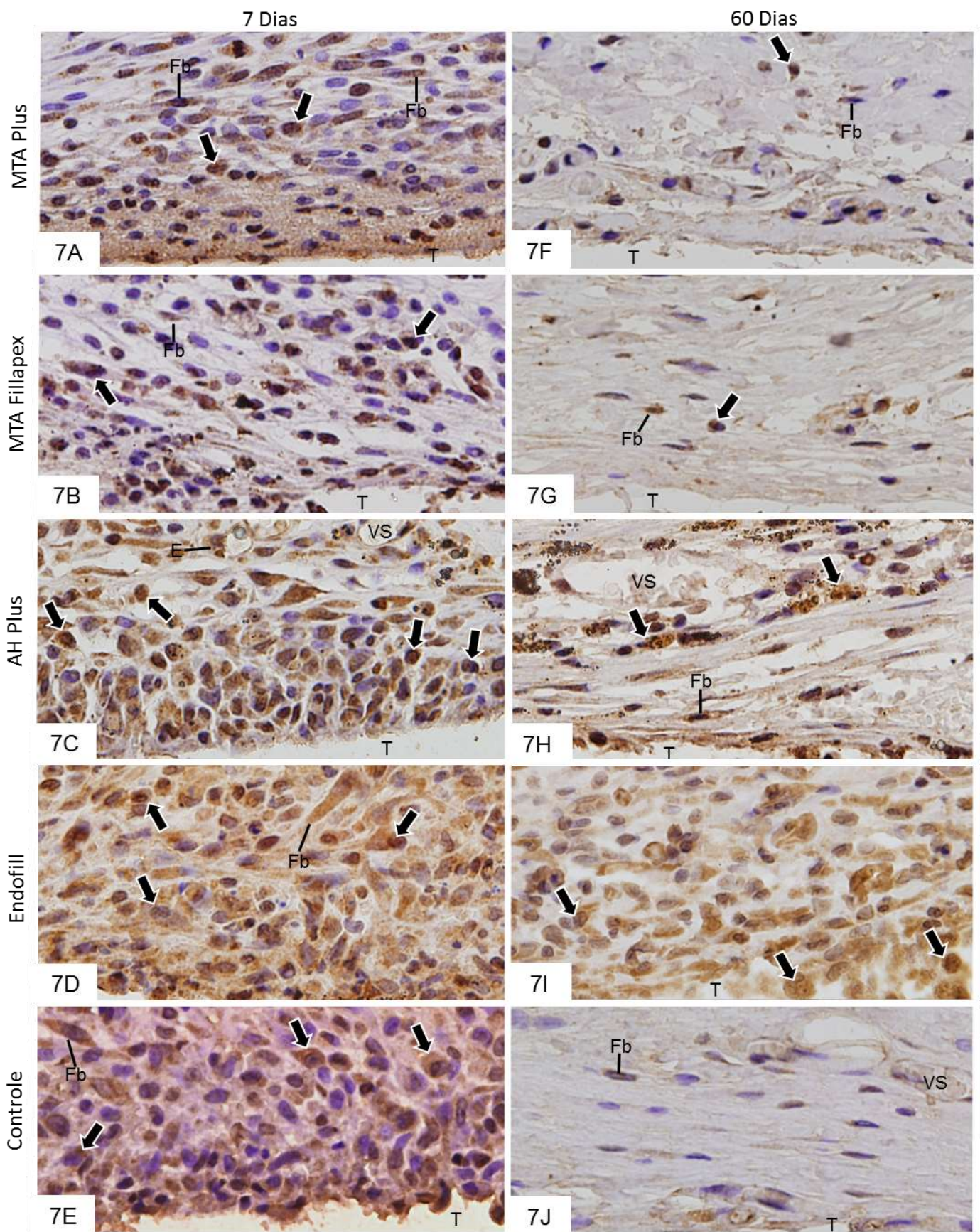
*média±desvio padrão

A comparação entre os grupos está indicada pelas letras diferentes sobrescritas nas várias linhas.

A comparação entre os períodos está indicada pelo número sobrescritos nas colunas.

Teste de Tukey (p≤0,05)

Fonte: Elaboração própria



Fonte: Elaboração própria

Figuras 7A-7J – Fotomicrografias mostrando porções de cortes das cápsulas adjacentes à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 7 (**Figuras 7A-7E**) e 60 (**Figuras 7F-7J**) dias. Os cortes foram submetidos à imuno-histoquímica para detecção de IL-6 (em castanho) e contracolorados com hematoxilina. **Figuras 7A-7E** - diversas células inflamatórias (setas), principalmente linfócitos, plasmócitos e macrófagos, exibem imunomarcação citoplasmática. Fibroblastos (Fb) positivos à IL-6 são também observados. **Figuras 7F-7J** – células inflamatórias (setas) e fibroblastos (Fb) exibindo imunomarcação citoplasmática estão esparsamente distribuídos entre as fibras colágenas (FC) nas cápsulas de todos os grupos, com exceção do Endofill. No Endofill (**Figura 7I**), a cápsula exibe diversas células inflamatórias arredondadas (setas) imunopositivas à IL-6. Na **Figura 7H**, partículas do cimento AH Plus são observadas na porção mais interna da cápsula; algumas destas partículas estão, aparentemente, no interior de células (setas). E, célula endotelial imunopositiva; VS, vaso sanguíneo. 530x.

5.4 Conteúdo de colágeno birrefringente

Aos 7 dias, as cápsulas exibiram poucas fibras colágenas birrefringentes (Figuras 8A-8E) enquanto que, aos 60 dias, as cápsulas dos grupos do MTA Plus, MTA Fillapex, AH Plus e do controle continham uma acentuada presença de colágeno birrefringente (Figuras 8F-8H e 8J). Neste período, as cápsulas do Endofill exibiram ainda pouco material birrefringente (Figura 8I).

A análise quantitativa (Tabela 3) revelou que o mais baixo conteúdo de colágeno nas cápsulas de todos os grupos foi computado aos 7 dias; neste período, diferenças significantes entre os grupos não foram observadas. De 7 para 15 dias, um aumento significativo no colágeno birrefringente foi verificado nas cápsulas de todos os grupos. Nos períodos de 30 e 60 dias, diferenças significantes não foram detectadas entre os grupos MP e AP. Nos períodos de 7, 15 e 60 dias, diferenças significantes não foram observadas entre os grupos MP e C. Aos 60 dias, diferenças significantes no conteúdo de birrefringência não foram observadas entre as cápsulas do MTA Plus, MTA Fillapex, AH Plus e controle.

Tabela 3 – Conteúdo de colágeno birrefringente (Col), em porcentagem, nas cápsulas dos grupos MTA Plus (MP), MTA Fillapex (MF), AH Plus (AP), Endofill (EF) e Controle (C) aos 7, 15, 30 e 60 dias.

Períodos	MP	MF	AP	EF	C
7 dias	5,8±1,4 ^{a,1}	4,6±1,5 ^{a,1}	5,3±1,6 ^{a,1}	3,6±1,9 ^{a,1}	6,1±1,5 ^{a,1}
15 dias	19,9±1,6 ^{a,2}	9,7±2,2 ^{b,2}	17,0±1,2 ^{c,2}	9,1±2,1 ^{b,2}	19,2±0,5 ^{a-c,2}
30 dias	21,2±1,4 ^{a,2}	17,1±0,5 ^{b,3}	22,8±1,7 ^{a-c,3}	20,4±0,7 ^{a,3}	24,4±1,3 ^{c,3}
60 dias	25,1±0,9 ^{a,3}	23,7±0,8 ^{a,4}	24,9±1,0 ^{a,3}	19,4±1,1 ^{b,3}	23,4±1,7 ^{a,3}

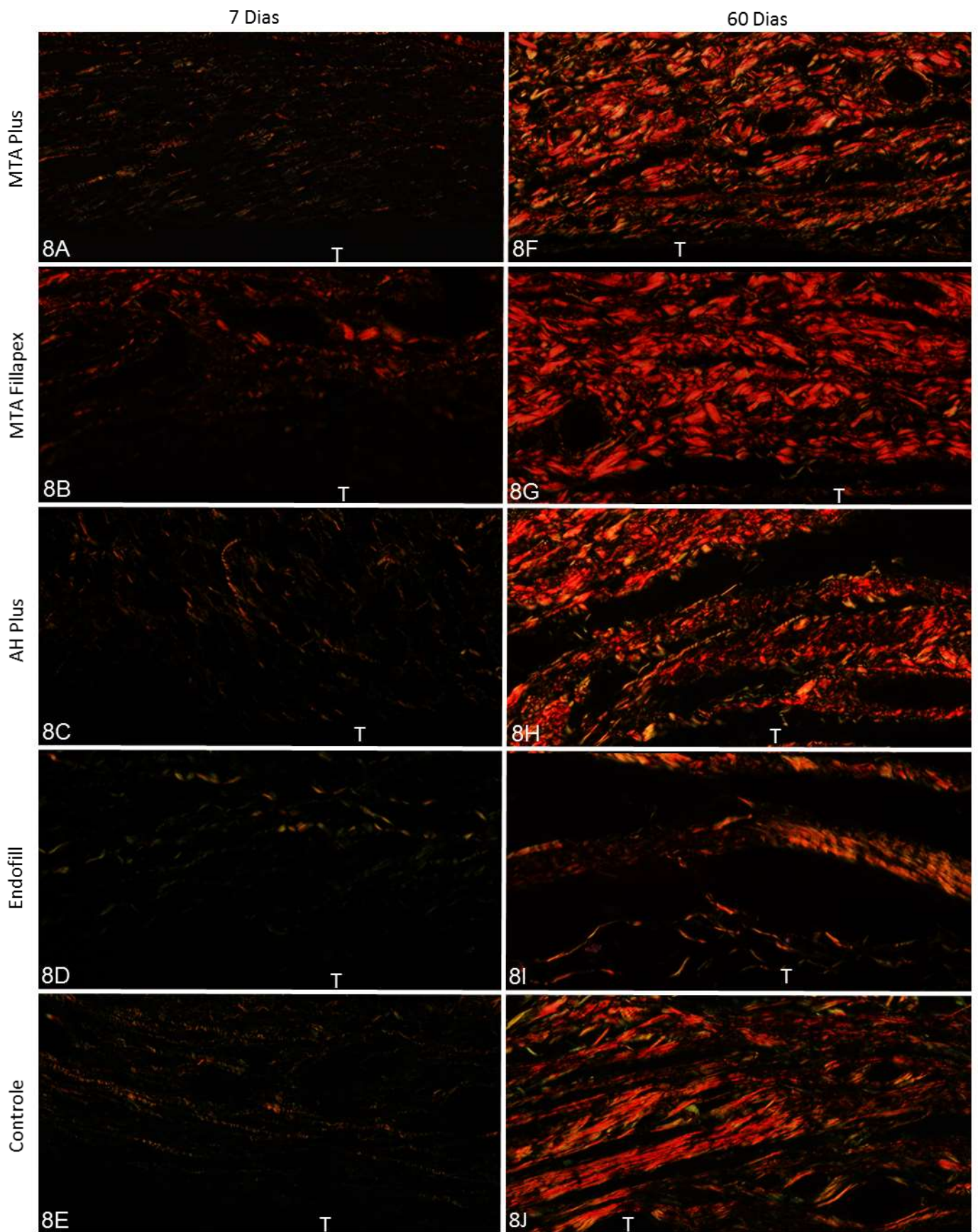
*media ± desvio padrão

A comparação entre os grupos está indicada pelas letras diferentes sobrescritas nas várias linhas.

A comparação entre os períodos está indicada pelo número sobrescritos nas colunas.

Teste de Tukey (p≤0,05).

Fonte: Elaboração própria



Fonte: Elaboração própria

Figuras 8A-8J – Fotomicrografias mostrando porções de cortes das cápsulas adjacente à abertura dos tubos de polietileno (T) implantados no subcutâneo de ratos, após 7 (**Figuras 8A-8E**) e 60 (**Figuras 8F-8J**) dias. Os cortes foram submetidos ao método do picosirius-red e analisados ao microscópio com luz polarizada. **Figuras 8A-8E** – as cápsulas exibem pouco conteúdo de colágeno birrefringente (nas cores vermelho, alaranjado e verde). **Figuras 8F-8J** – no período de 60 dias, evidente conteúdo birrefringente é observado nas cápsulas de todos os grupos, exceto no Endofill. 530x.

6 DISCUSSÃO

Considerando que os cimentos endodônticos entram em contato com os tecidos apicais e periapicais por meio, principalmente, do forame apical⁸³, uma característica fundamental é que eles sejam biocompatíveis^{3,9}. Esta propriedade está diretamente relacionada à composição destes materiais, uma vez que liberam substâncias que estimulam a migração e a diferenciação das células inflamatórias, levando a produção de citocinas moduladoras da inflamação, exercendo um papel fundamental sobre o processo inflamatório⁸⁴.

Os resultados do presente estudo in vivo mostraram que todos os cimentos utilizados induziram, inicialmente, uma reação inflamatória moderada no tecido subcutâneo de ratos. Além disso, a diminuição do processo inflamatório ocorreu concomitante ao aumento significativo de fibras colágenas nas cápsulas adjacentes aos materiais.

A reação inflamatória inicial pode ter sido causada, pelo menos em parte, pelo ato cirúrgico. Esta ideia é suportada desde que diferenças significantes na frequência de células inflamatórias não foram observadas entre os grupos com cimento quando comparado ao controle. A reação inflamatória inicial nos grupos MP e MF pode ser explicada também pelo fato de que os materiais à base de MTA, liberam íons hidroxilas (OH^-) após a hidratação, proporcionando ao meio um pH alcalino^{33,35,41}. O meio alcalino estimula o recrutamento de leucócitos e neutrófilos^{25,88,89}, bem como a diferenciação de plasmócitos. No AH Plus há liberação de pequena quantidade de formaldeído (10^{-5} mol/L), e sabe-se que este é irritante aos tecidos^{56,59}, e mesmo em baixa quantidade, pode ser a causa da reação tecidual inicial e, talvez possa explicar a elevada densidade de células inflamatórias

que persistiram aos 15 dias. Enquanto que no Endofill, a reação inflamatória deve ter ocorrido em decorrência do efeito irritante do eugenol^{10,22}.

O AH Plus é um cimento endodôntico à base de resina epóxica considerado o “padrão ouro” pela sua biocompatibilidade^{19,46,95}. Assim, este cimento é, frequentemente, utilizado em trabalhos que avaliam as propriedades dos materiais obturadores^{46,79,87}. No presente estudo, o MTA Plus não mostrou diferença significativa em relação ao AH Plus na incidência de células inflamatórias e de fibroblastos, em todos os períodos. Portanto, o cimento MTA Plus pode ser considerado biocompatível desde que não foram observadas diferenças significantes no infiltrado inflamatório entre o MTA Plus e o AH Plus, bem como também com o grupo controle, tanto no período inicial quanto no período final. O AH Plus tem mostrado uma resposta favorável quando utilizado em molares de cães. Os tecidos periodontais de cães reagiram favoravelmente ao AH Plus, causando a deposição de tecido mineralizado na porção apical dos canais radiculares após 90 dias a obturação de molares⁵⁵. Também foi observado reparo apical após 180 dias dos pré-molares de cães obturados com AH Plus⁵⁷.

Em um estudo utilizando células da polpa dental, o MTA Plus apresentou a maior taxa de viabilidade celular em todas as concentrações avaliadas (1:2, 1:3, 1:4), e não houve evidência de efeitos citotóxicos, em comparação ao MTA Fillapex e FillCanal. A citotoxicidade do MTA Fillapex foi considerada de moderada a baixa e dependente da concentração, após o período de 24 horas. Neste estudo, também foi mostrado que, após a citotoxicidade inicial, o MTA Fillapex promove bioatividade, estimulando a deposição de nódulos de mineralização e aumentando a atividade da enzima ALP (fosfatase alcalina)⁶⁴. Em culturas de osteoblastos (SAOS), o MTA Plus apresentou biocompatibilidade e bioatividade, assim como o Biodentine e um

cimento experimental à base de silicato de cálcio. Após o terceiro dia, aumentou significativamente a velocidade de proliferação celular, como também aumentou a atividade da enzima ALP³⁸. Esses resultados *in vitro* sugerem que o MTA Plus é um cimento biocompatível. No nosso estudo, a regressão da reação inflamatória acompanhada pela formação gradativa de colágeno indica que o MTA Plus embora promova danos ao tecido conjuntivo, este cimento possibilita às células do hospedeiro expressar uma resposta que culmina na formação de uma cápsula fibrosa, semelhante ao observado durante o processo de reparação tecidual.

A presença da resina de salicilato, além do mineral trióxido agregado, no MTA Fillapex, pode ser a causa da sua elevada citotoxicidade nos períodos iniciais reportada *in vitro*⁹⁵. Um estudo *in vitro*, mostrou que o MTA branco foi capaz de manter a viabilidade celular e aumentar a sua proliferação, porém o MTA Fillapex foi severamente citotóxico¹³. Resultado semelhante foi mostrado no estudo de Yoshino et al¹⁰³. (2013), onde o MTA Fillapex foi o material que demonstrou o maior efeito citotóxico sobre fibroblastos do ligamento periodontal, seguido do MTA branco e do cimento Portland. Em contraposição, um estudo em tecido de rato, mostrou que o MTA Fillapex é biocompatível pois reportou que a intensa reação inflamatória observada aos 7 dias reduziu significativamente aos 15 dias³⁹. Além disso, este cimento endodôntico estimulou a formação de nódulos de mineralização, confirmado pelo método von Kossa. O MTA Fillapex demonstrou atividade antibiofilme por até 7 dias após a manipulação³⁰ e elevada solubilidade^{30,105}.

Por outro lado, o MTA Fillapex apresentou alta citotoxicidade em cultura de células Balb/c 3T3, e esta citotoxicidade não diminuiu no decorrer de 4 semanas. A possível explicação para estes resultados é a presença de componentes tóxicos tais como resina de salicilato, resina de diluição e sílica⁸⁶. A resina de salicilato estimula

o processo de apoptose no fibrosarcoma humano⁸⁶. O arsênico é um metal pesado que já foi encontrado em pequenas proporções em formulações do MTA, o que também pode ser uma das causas da citotoxicidade do MTA Fillapex⁸⁷. No subcutâneo de ratos, após o período de 7 dias, o MTA Fillapex mostrou grande quantidade de linfócitos, macrófagos e células gigantes, o que enfatiza seu potencial irritante aos tecidos⁹⁵. A resposta do MTA Fillapex foi semelhante àquelas observadas nos materiais à base de óxido de zinco e eugenol, que são reconhecidos pelo potencial de causar maior e mais duradoura reação inflamatória^{40,79}. Em células osteoblásticas, o MTA Fillapex e o AH Plus tiveram um efeito citotóxico na primeira semana. Após esse período, o AH Plus se tornou não-citotóxico, mas o MTA Fillapex continuou a apresentar toxicidade moderada às células por 4 semanas³⁹.

Ao longo do tempo, foi evidente uma redução do processo inflamatório simultaneamente ao aumento do conteúdo de colágeno birrefringente adjacente às cápsulas de todos os grupos. A análise ao microscópio de luz polarizada de cortes submetidos ao método picrosirius possibilitou essa observação mais facilmente, pois o corante incrementa a birrefringência natural das fibras colágenas. Este incremento ocorre devido aos aminoácidos básicos das moléculas de colágeno que reagem fortemente com corantes ácidos, dentre eles o sirius red¹⁰⁴. A análise quantitativa do conteúdo birrefringente mostrou um aumento significativo de colágeno nas cápsulas com o decorrer do tempo. Nos implantes dos cimentos MTA Plus, MTA Fillapex e AH Plus o conteúdo de colágeno nas cápsulas não apresentou diferenças significantes em comparação ao controle. Portanto, nestes grupos a redução na frequência de células inflamatórias foi acompanhado pelo aumento significativo de colágeno, indicando que a reação inflamatória inicial regrediu e foi substituída por um tecido conjuntivo rico em colágeno. Em contraposição, as cápsulas do Endofill, aos 60 dias,

ainda apresentaram um alto número de células inflamatórias acompanhado por um menor conteúdo de colágeno em comparação aos demais grupos, reforçando o conceito que este cimento mantém os efeitos deletérios às células por longo período.

O Endofill, um cimento à base de óxido de zinco e eugenol, mostrou um infiltrado inflamatório significativamente maior que os outros materiais aos 60 dias. Portanto, nossos resultados mostraram que o efeito irritante do Endofill persiste por longo período, como relatado em outros estudos^{29,102}. No presente estudo, a resposta inflamatória deste material reduziu até o período de 30 dias, porém não houve redução estatisticamente significativa de 30 para 60 dias, indicando que o potencial irritante deste material se manteve. Além disso, a análise morfológica revelou a presença de diversos macrófagos e plasmócitos nas cápsulas do Endofill aos 60 dias, indicando a persistência de um infiltrado inflamatório crônico. De acordo com alguns estudos, a liberação do eugenol pode ocorrer por, pelo menos, 1 ano^{10,28}. Portanto, é possível que o “eugenol livre” seja o responsável pela injúria imediata aos tecidos; no entanto, como a sua liberação persiste, porém de forma mais lenta, por longo período, o seu efeito deletério ocasiona uma reação inflamatória crônica impedindo a reparação dos tecidos⁹⁰.

No grupo Endofill, embora nossos resultados revelaram um aumento de fibras colágenas no decorrer do tempo, este aumento foi menor significativamente do que nos demais grupos. Um acentuado número de células inflamatórias, incluindo a presença de eosinófilos indicando, portanto, uma intensa irritação aos tecidos foi relatada num estudo conduzido com implantes no subcutâneo⁷⁷. Além disso, evidente presença de células gigantes multinucleadas e abscessos foram também reportados⁷. A intensidade da reação inflamatória, pode ser atribuída à proporção pó/líquido dos materiais à base de óxido de zinco e eugenol pela liberação lenta e

prolongada do eugenol, associada ao potencial deletério dos íons zinco^{9,28,48}. No nosso estudo, a proporção utilizada foi de 1g de pó para 220µl de eugenol (5:1), ou seja, a mínima quantidade de eugenol necessária para que o cimento fique com a consistência ideal, de acordo com o fabricante^{11,26}. Há evidências de que o eugenol causa desnaturação das proteínas citoplasmáticas, perda de limites celulares, promovendo mudanças estruturais e funcionais nas células, causando, assim, a morte celular⁵⁰. Além disso, os íons de zinco podem ser os responsáveis por efeitos deletérios na sobrevivência celular²⁸.

As células imunes e residentes do hospedeiro produzem e liberam várias citocinas que exercem um papel complexo, porém de forma coordenada sobre a série de eventos celulares e moleculares envolvidos na instalação e progressão do processo inflamatório^{1,36}. Entre estas moléculas, a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por linfócitos, monócitos e macrófagos, além de células endoteliais e fibroblastos^{5,47,81}. Esta interleucina desempenha um papel importante na resposta imune, e, portanto, está associada a várias doenças inflamatórias⁴⁷, como artrite reumatoide, doenças periodontais, lesões pulpares e periapicais^{5,101}.

Células imunomarcadas para IL-6 nas cápsulas foram observadas em todos os períodos. No entanto, aos 7 dias, houve acentuada imunopositividade nas cápsulas ao redor dos implantes. A redução significativa no número de células imunomarcadas para IL-6 aos 60 dias, sugere que as cápsulas adjacentes aos materiais implantados sofreram um processo de remodelação. A secreção de IL-6 parece que reduz o recrutamento de neutrófilos, induzindo simultaneamente migração e diferenciação de linfócitos e monócitos⁸¹. Portanto, a acentuada imunoexpressão observada nas cápsulas foi concomitante a incidência de linfócitos,

macrófagos e plasmócitos, indicando que esta interleucina deve participar na instalação e progressão da resposta inflamatória aos implantes no subcutâneo, como demonstrado anteriormente^{25,88,89}. Os nossos resultados reforçam o conceito de que essa citocina está envolvida na resposta aos implantes no subcutâneo, pois uma redução tanto de células imunomarcadas para IL-6 quanto da reação inflamatória foi observada com o decorrer do tempo. Apesar das diferenças significantes na imunoexpressão de IL-6 observadas entre os grupos com cimentos e o grupo controle, pode-se sugerir que o potencial irritante dos materiais aos tecidos é baixo, com exceção do Endofill. Embora o MTA Plus e MTA Fillapex, aos 60 dias, apresentaram um número maior de células imunopositivas à IL-6 em comparação ao grupo controle, no entanto, os valores destes grupos foram menores que o observado no AH Plus. A acentuada imunoexpressão nas cápsulas dos grupos com cimentos em comparação ao observado no grupo controle indica que, aos 60 dias, os efeitos deletérios das substâncias liberadas pelos cimentos ainda persistem. Considerando o reduzido número de células imunomarcadas nas cápsulas do MTA Plus e do MTA Fillapex em comparação ao AH Plus, é possível sugerir que estes efeitos deletérios dos cimentos à base de MTA são menores em comparação ao AH Plus, pelo menos àqueles associados a síntese de IL-6. É possível que a persistência de um maior número de células IL-6-imunopositivas seja em consequência da liberação de pequenas quantidades de formaldeído (10–5 mol/L) pelo AH Plus⁵⁶, além deste cimento ter tempo de presa relativamente alto (14 horas). Embora há evidências de que a quantidade de formaldeído liberada seja mínima, no entanto, sabe-se que o formaldeído apresenta propriedades mutagênicas e carcinogênicas^{56,59}. O elevado número de células positivas à IL-6, aos 60 dias, observado nas cápsulas do Endofill foi acompanhado pela acentuada

frequência de células inflamatórias, reforçando a ideia de que o efeito citotóxico do cimento deve estar associado a imunoexpressão desta interleucina

Embora a IL-6 seja uma citocina pró-inflamatória importante na progressão do processo inflamatório^{25,60}, esta interleucina também participa da formação e diferenciação de osteoclastos⁵², consequentemente, promovendo a reabsorção óssea^{32,61}. Portanto, a redução da imunoexpressão de IL-6, frequentemente, está associada à diminuição da reabsorção óssea²⁷. No MTA Plus e MTA Fillapex foi observada uma redução de IL-6 mais significativa ao longo do tempo que no AH Plus e Endofill, sugerindo que os danos promovidos por estes cimentos são reversíveis mais rapidamente. Os componentes do AH Plus e Endofill, respectivamente formaldeído e eugenol, podem ser responsáveis pelo dano prolongado. Portanto, é possível sugerir que os cimentos MTA Plus e MTA Fillapex devem favorecer o processo de reparo dos tecidos periodontais, principalmente, nos casos com lesões periapicais onde os níveis de IL-6 são elevados, desde que estes cimentos parecem suprimir mais rapidamente esta interleucina, reduzindo, portanto, a reabsorção do processo alveolar.

Pode-se concluir que os materiais MTA Plus, MTA Fillapex e AH Plus apresentam uma resposta tecidual satisfatória, uma vez que ocorre redução na quantidade de células inflamatórias e células imunomarcadas para IL-6, bem como um aumento do conteúdo de colágeno birrefringente nas cápsulas adjacentes a estes materiais, especialmente, no período de 60 dias. Assim, esses cimentos podem ser considerados biocompatíveis. No entanto, o MTA Plus e MTA Fillapex devem favorecer o processo de regressão do processo inflamatório nos tecidos periapicais desde que estes cimentos possibilitaram uma redução mais significativa de interleucina-6 em comparação ao AH Plus.

7 CONCLUSÃO

- ✓ A redução gradativa e significativa do processo inflamatório acompanhada pelo aumento do conteúdo de colágeno nas cápsulas do MTA Plus, MTA Fillapex e AH Plus indica que esses cimentos são biocompatíveis.
- ✓ A interleucina-6 participa da instalação do processo inflamatório, bem como na sua regressão, em resposta aos cimentos endodônticos implantados no subcutâneo.
- ✓ O reduzido número de células positivas à IL-6 na cápsula do MTA Plus e do MTA Fillapex indica que estes cimentos devem favorecer a regressão da lesão periapical.

REFERÊNCIAS*

1. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008; 20(2): 86-100.
2. 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.
3. Assmann E, Scarparo RK, Böttcher DE, Grecca FS. Dentin bond strength of two mineral trioxide aggregate-based and one epoxy resin-based sealers. *J Endod.* 2012; 38(2): 219-21.
4. Azar NG, Heidari M, Bahrami ZS, Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J Endod.* 2000; 26(8): 462-5.
5. Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LT. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J.* 2014; 47(7): 615-21.
6. Baek SH, Hanns PJr, Syngcuk K. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, Super EBA, and MTA as Root-End Filling materials. *J Endod.* 2005; 31(6): 444-9.
7. Baldasso FE, Kopper PM, Morgental RD, Steier L, Figueiredo JA, Scarparo RK. Biological tissue response to a new formulation of a silicone based endodontic sealer. *Braz Dent J.* 2016; 27(6): 657-63.
8. Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1999; 15(1): 26-7.

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

9. Batista RFC, Hidalgo MM, Hernandez L, Consolaro A, Velloso TRG, Cuman RKN, et al. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. *J Biomed Mater Res*. 2007; 81A: 171–7.
10. Becker RM, Hume WR, Wolinsky LE. Release of eugenol from mixtures of Zoe in vitro. *J Pedod*. 1983; 8(1): 71–7.
11. Bernabé PF, Holland R, Morandi R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, et al. Comparative study of MTA and others materials in retrofilling of pulpless dog's teeth. *Braz Dent J*. 2005; 16(2): 149-55.
12. Bernardes RA, de Amorim Campelo A, Junior DS, Pereira LO, Duarte MA, Moraes IG, et al. Evaluation of the flow rate of 3 endodontic sealers: Sealer 26, AH Plus, and MTA Obtura. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(1): 47-9.
13. Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. 2012; 38(4): 495-500.
14. Blackman R, Gross M, Seltzer S. An evaluation of the biocompatibility of a glass ionomer-silver cement in rat connective tissue. *J Endod*. 1989; 15(2): 76-8.
15. Bogen G, Kuttler S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series *J Endod*. 2009; 35(6): 777-90.
16. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater*. 2013; 29(5): 580-93.
17. Camilleri J, Formosa L, Damidot D. The setting characteristics of MTA Plus in different environmental conditions. *Int Endod J*. 2013; 46(9): 831-40.

18. Camilleri J. Staining potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine used for pulpotomy procedures. *J Endod*. 2015; 41(7): 1139-45.
19. Cañadas PS1, Berástegui E, Gaton-Hernández P, Silva LA, Leite GA, Silva RS. Physicochemical properties and interfacial adaptation of root canal sealers. *Braz Dent J*. 2014; 25(5): 435-41.
20. Chávez-Andrade GM, Kuga MC, Duarte MA, Leonardo Rde T, Keine KC, Sant'Anna-Junior A, et al . Evaluation of the physicochemical properties and push-out bond strength of MTA-based root canal cement. *J Contemp Dent Pract*. 2013; 14(6): 1094-9.
21. Chong BS, Pitt Ford TR, Hudson MB. A prospective clinical study of Mineral Trioxide Aggregate and IRM when used as root-end filling materials in endodontic surgery. *Int Endod J*. 2003; 36(8): 520-6.
22. Christian Gomes Moura C, Cristina Cunha T, Oliveira Crema V, Dechichi P, Carlos Gabrielli Biffi J. A study on biocompatibility of three endodontic sealers: intensity and duration of tissue irritation. *Iran Endod J*. 2014; 9(2): 137-43.
23. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radiopacified content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod*. 2007; 33(3): 295-8.
24. Correa GT, Veranio GA, Silva LE, Hirata Junior R, Coil JM, Scelza MF. Citotoxicity evaluation of two root canal sealer and a commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by Trypan Blue assay. *J Appl Oral Sci*. 2009; 17(5): 457-61.
25. 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 IL6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J*. 2016; 49(2): 145-53.

26. da Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J*. 2011; 44(2): 100-10.
27. de Oliveira PA, de Pizzol-Júnior JP, Longhini R, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine reduces interleukin-6, matrix metalloproteinases-1 and -9 immunoexpression in the gingival mucosa of rat molars with induced periodontal disease. *J Periodontol*. 2017; 88(1): 100-11.
28. Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod*. 1995; 21(3): 122-7.
29. Farhad AR, Hasheminia S, Razavi S, Feizi M. Histopathologic evaluation of subcutaneous tissue response to three endodontic sealers in rats. *J Oral Sci*. 2011; 53(1): 15-21.
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. Ferino RV. Reação histológica ao cimento endodôntico à base de MTA (Fillapex®) em subcutâneo de ratos [dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp; 2012.
32. Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 421746.
33. Formosa LM, Mallia B, Bull T, Camilleri J. The microstructure and surface morphology of radiopaque tricalcium silicate cement exposed to different curing conditions. *Dent Mater*. 2012; 28(5): 584-95.

34. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. A quantitative method for determining the antiwashout characteristics of cement-based dental materials including mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2013; 46(2): 179-86.
35. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. Mineral trioxide aggregate with anti-washout gel - properties and microstructure. *Dent Mater*. 2013; 29(3): 294-306.
36. Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. Immune responses to implants – a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*. 2011; 32(28): 6692-709.
37. Garrido AD, Lia RC, França SC, da Silva JF, Astolfi-Filho S, Sousa-Neto MD. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on *Copaifera multijuga* oil-resin. *Int Endod J*. 2010; 43(4): 283- 91.
38. Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Bioactivity of MTA Plus, Biodentine and an experimental calcium silicate-based cement on human osteoblast-like cells. *Int Endod J*. 2017; 50(1): 39-47.
39. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Nery MJ, Filho JA, et al. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX®. *Dent Traumatol*. 2012; 28(6): 452-6.
40. Görduysus MO, Etikan I, Gököz A. Histopathological evaluation of the tissue reactions to Endo-Fill root canal sealant and filling material in rats. *J Endod* 1998; 24(3): 194–6.
41. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set intermediate restorative material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J*. 2013; 46(7): 632-41.
42. Grossman LI, Oliet S, Del Rio CE. *Endodontic practice*. 11th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1988.

43. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabe PF, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*. 1999; 25(3): 161–6.
44. Hrabák A, Bajor T, Csuka I. The effect of various inflammatory agents on the phagocytosis and cytokine profile of mouse and rat macrophages. *Inflamm Res*. 2008; 57(2): 75-83.
45. Jho W, Park JW, Kim E, Song M, Seo DG, Yang DK, Shin SJ. Comparison of root canal filling quality by mineral trioxide aggregate and gutta percha cones/AH plus sealer. *Dent Mater J*. 2016; 35(4): 644-50.
46. Khalil I, Naaman A, Camilleri J. Properties of Tricalcium Silicate Sealers. *J Endod*. 2016; 42(10): 1529-35.
47. Kishimoto T . IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol*. 2010; 22(5): 347-52.
48. Kolokouris I, Economides N, Beltes P, Vlemmas I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod*. 1998; 24(2): 82-5.
49. Koshimizu JY, Beltrame FL, de Pizzol JP Jr, Cerri PS, Caneguim BH, Sasso-Cerri E. NF – kB overexpression and decreased immunoexpression of AR in the muscular layer is related to structural damages and apoptosis in cimetidine-trated rat vas deferens. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013; 9: 11-29.
50. Kozam G, Mantell GM. The effect of eugenol on oral mucous membranes. *J Dent Res*. 1978; 57(11-12): 954-7.
51. Kramer PR, Woodmansey KF, White R, Primus CM, Opperman LA. Capping a pulpotomy with calcium aluminosilicate cement: comparison to mineral trioxide aggregates. *J Endod*. 2014; 40(9): 1429-34.

52. Lee SK, Lorenzo JA. Regulation of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin mRNA expression by parathyroid hormone is predominantly mediated by the protein kinase a pathway in murine bone marrow cultures. *Bone*. 2002; 31(1): 252-9.
53. Leonardo MR, Flores DSH, Silva FWGP, Leonardo RT, Silva LAB. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using Roeko Seal and AH Plus Root Canal Sealers: a histopathological evaluation. *J Endod*. 2008; 34(7): 822-5.
54. Leonardo MR, Almeida WA, da Silva LA, Utrilla LS. Histological evaluation of the response of apical tissues to glass ionomer and zinc oxide-eugenol based sealers in dog teeth after root canal treatment. *Endod Dent Traumatol*. 1998; 14(6): 257-61.
55. Leonardo MR, da Silva LA, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol* 1999; 15(1): 28-32.
56. Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999; 88(2): 221-5.
57. Leonardo MR, Salgado AAM, Silva LAB, Filho MT. Apical and periapical repair of dog's teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 17(1): 69–74.
58. Leonardo MR, Leal JM. 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.
59. Lewis BB, Chestner SB. Formaldehyde in dentistry: a review of mutagenic and carcinogenic potential. *J Am Dent Assoc*. 1981; 103(3): 429-34.

60. 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.
61. Longhini R, Aparecida de Oliveira P, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Cimetidine reduces alveolar bone loss in induced periodontitis in rat molars. *J Periodontol* 2014; 85(8) : 1115-25.
62. 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.
63. 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.
64. Mestieri LB, Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Biocompatibility and bioactivity of calcium silicate-based endodontic sealers in human dental pulp cells. *J Appl Oral Sci*. 2015; 23(5): 467-71.
65. Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PM. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int Endod J*. 2011; 44(12): 1128-33.
66. Mori GG, Teixeira LM, de Oliveira DL, Jacomini LM, da Silva SR. Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats *J Endod*. 2014; 40(9): 1485-8.
67. Mori GG, Rodrigues Das S, Shibayama ST, Pomini M, do Amaral CO. Biocompatibility of a calcium hydroxide-propolis experimental paste in rat subcutaneous tissue. *Braz Dent J*. 2014; 25(2): 104-8.

68. MTA Plus [bula]. Bradenton: Avalon Biomed Inc; 2012.
69. Nagas E, Uyanik MO, Eymirli A, Cehreli ZC, Vallittu PK, Lassila LV, Durmaz V. Dentin moisture conditions affect the adhesion of root canal sealers. *J Endod.* 2012; 38(2): 240-4.
70. 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.
71. Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis.* 2012;18(3): 236-46.
72. Qi YP, Li N, Niu LN, Primus CM, Ling JQ, Pashley DH, Tay FR. Remineralization of artificial dentinal caries lesions by biomimetically modified mineral trioxide aggregate. *Acta Biomater.* 2012; 8(2): 836-42.
73. Queiroz AM, Assed S, Consolaro A, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva RAB, et al. Subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. *Braz Dent J.* 2011; 22(3): 203-11.
74. Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater* 2008; 24(2): 149–64.
75. 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.
76. Santos J, Tjäderhane L, Ferraz C, Zaia A. Long-term sealing ability of resin based root canal fillings. *Int Endod J.* 2010; 43(6): 455-60.

77. Saunders WP. A prospective clinical study of periradicular surgery using mineral trioxide aggregate as a root-end filling. *J Endod.* 2008; 34 (6): 660-5.
78. Scarparo RK, Haddad D, Acasigua GA, Fossati AC, Fachin EV, Grecca FS. Mineral trioxide aggregate–based sealer: analysis of tissue reactions to a new endodontic material. *J Endod.* 2010; 36(7): 1174–8.
79. Scarparo RK, Grecca FS, Fachin EV. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealer. *J Endod.* 2009; 35(2): 229-32.
80. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J.* 2012; 45(11): 12-8.
81. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1813(5): 878-88.
82. Schilder H. Filling root canals in three dimensions. *J Endod.* 1967, 32(4): 281- 90.
83. Schmalz G, Hoffmann M, Weis K, Schweikl H. Influence of albumin and collagen on the cell mortality evoked by zinc oxide-eugenol in vitro. *J Endod.* 2000; 26(5): 284-7.
84. Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Mokhtari H, Roshangar L, Abasi MM, et al. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. *J Endod.* 2010; 36(5): 899-903.
85. Shakya VK, Gupta P, Tikku AP, Pathak AK, Chandra A, Yadav RK, Bharti R, Singh RK. An Invitro evaluationof 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): 104-8.

86. 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.
87. Silva EJ, Accorsi-Mendonça T, Pedrosa AC, Granjeiro JM, Zaia AA. Long-term cytotoxicity, pH and dissolution rate of AH Plus and MTA Fillapex. *Braz Dent J*. 2016; 27(4): 419-23.
88. Silva GF, Bosso R, Ferino RV, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102(12): 4336-45.
89. 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.
90. Silva LA, Leonardo MR, Oliveira DS, Silva RA, Queiroz AM, Hernández PG, Nelson-Filho P. Histopathological evaluation of root canal filling materials for primary teeth. *Braz Dent J*. 2010; 21(1): 38-45.
91. Silveira CM, Pinto SC, Zedebski Rde A, Santos FA, Pilatti GL. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J*. 2011; 22(1): 21-7.
92. Sipert CR, Hussne RP, Nishiyama CK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. *Int Endod J*. 2005; 38(8): 539-43.
93. Tanomaru-Filho M, Chaves Faleiros FB, Saçaki JN, Hungaro Duarte MA, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2009; 35(10): 1418-21.

94. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Utrilla LS. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. *Int Endod J*. 1998; 31(2): 85-9.
95. 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.
96. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used rootend filling materials. *J Endod*. 1995; 21(6): 295–9.
97. Torabinejad M, Pitt Ford TR. Root and filling materials: a review. *Endod Dent Traumatol*. 1996; 12(4): 161-78.
98. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review – part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*. 2010; 36(2): 190-202.
99. Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012; 100(7): 1773-81.
100. Whitworth J. Methods of filling root canals: principles and practice. *Endod Topics*. 2005; 12(1) 2–24.
101. Wisithphrom K, Windsor LJ. The effects of tumor necrosis factor- α , interleukin- 1β , interleukin-6, and transforming growth factor-b1 on pulp fibroblast mediated collagen degradation. *J Endod*. 2006; 32(9): 853-61.
102. Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshida K, Yoshida N, Okiji T. Immunohistochemical analysis of subcutaneous tissue reactions to methacrylate resin-based root canal sealers. *Int Endod J*. 2011; 44(7): 669-75.

103. Yoshino P, Nishiyama CK, Modena KC, Santos CF, Sipert CR. In vitro cytotoxicity of white MTA, MTA Fillapex® and Portland cement on human periodontal ligament fibroblasts. *Braz Dent J.* 2013; 24(2): 111-6.
104. Zhang JY, Dong Q, Li TJ. Differences in collagen fibres in the capsule walls of parakeratinized and orthokeratinized odontogenic cysts. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 40(11): 1296-300.
105. 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.

ANEXO

Comprovante do CEUA autorizando a realização da pesquisa.



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

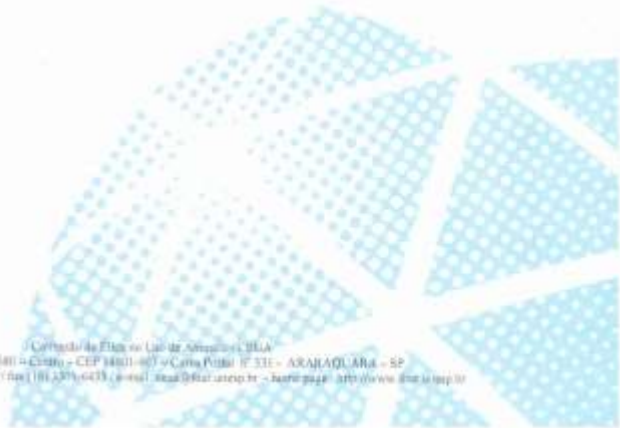


DECLARAÇÃO

DECLARO, para os devidos fins, que a CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Faculdade de Odontologia, recebeu o projeto **"AVALIAÇÃO DA REAÇÃO TECIDUAL PROMOVIDA PELO MTA PLUS™ NO SUBCUTÂNEO DE RATOS"** (Processo CEUA nº 27/2013), apresentado pelo Pesquisador Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI. O referido projeto deu entrada nesta Comissão em 06/12/2013, não apresenta pendências até o momento e seu relatório final está em fase de tramitação para análise.

Araraquara, 24 de fevereiro de 2017.


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



Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
 Rua Henrich 1º 1.480 - Centro - CEP 14601-907 - Caixa Postal 1º 331 - ARARAQUARA - SP
 5º andar - Fone (16) 3101-6459 / fax (16) 2375-6433 / e-mail: ceua@faoar.unesp.br - <http://www.faoar.unesp.br>

Autorizo a reprodução deste trabalho
(Direitos de publicação reservados à autora)
Araraquara, 15 de março de 2017

Juliana Alcarás Saraiva