UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

CÂMPUS DE ARAÇATUBA – FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA

DISCIPLINA DE ENDODONTIA

Mylena Fernanda de Oliveira Santos

Biocompatibilidade do biovidro F18 na forma de Putty em selamento de Perfuração de Furca

Araçatuba

2025

Mylena Fernanda de Oliveira Santos

Biocompatibilidade do biovidro F18 na forma de Putty em selamento de Perfuração de Furca

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (UNESP), como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista.

Área de Concentração: Endodontia

Orientador(a): Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra

Araçatuba

2025

Dedico este trabalho à minha família.
Em especial, à minha mãe, Maristela, exemplo de força, dedicação e amor, que nunca mediu esforços para que eu chegasse até aqui. Essa conquista é nossa, mãe.
E ao meu eterno amor, meu pai, Ademarino, cuja presença sinto em cada vitória. Sua memória é a luz que me guia, e sei que, onde quer que esteja, está orgulhoso deste momento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter guiado cada um dos meus passos desde 2019, quando fui aprovada no vestibular, até este momento tão especial, em que realizo o sonho de me tornar Cirurgiã-Dentista. Sempre enxerguei — e continuo enxergando — a presença de Deus em cada decisão e caminho trilhado.

Agradeço a toda minha família por ter me ajudado a chegar até aqui, em especial à minha mãe, Maristela — a mulher mais guerreira e forte que conheço. Obrigada, mãe, por ser mãe e pai para mim há tanto tempo! Obrigada por nunca medir esforços para que eu alcançasse esse sonho. Eu te amo além desta vida. Só nós sabemos o quanto foi difícil. Essa conquista é nossa!

Agradeço, com todo o meu coração, ao meu pai, Ademarino, já falecido. Mesmo não estando presente fisicamente, ele sempre esteve comigo em pensamento e no coração. Pai, senti sua presença em cada conquista, em cada semestre vencido — e agora, mais do que nunca. Como eu queria que você estivesse aqui vivendo esse momento ao meu lado. Tenho certeza de que estaria orgulhoso e ansioso, assim como eu. Eu te amo.

Agradeço também às minhas irmãs, Thamiris e Rafaella, pelo amor e carinho de sempre. O amor de vocês foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Agradeço à minha sobrinha, Stella, por ser a alegria dos meus dias e meu incentivo diário.

Agradeço também, à República Essa Fadinha e a todas as minhas amigas que se tornaram família para mim aqui em Araçatuba — Barbrinha, Fuguinha, Lets e Maria. Eu amo vocês de um jeito que não dá nem pra descrever. Obrigada por cada momento, cada dia, cada mês, cada ano vivido ao lado de vocês! Esses 7 anos morando juntas foram muito especiais, e cada uma de vocês ocupa um espaço enorme no meu coração.

Agradeço aos meus amigos da faculdade, que também foram meu suporte ao longo desses anos — João Mateus, Lívia, Gabi, Bianca e tantos outros. E também, aos meus amigos Bruna e Felipe, que sempre me ofereceram seus braços e ouvidos, estando ao meu lado sempre que precisei.

Agradeço as duas Dra´s que me incentivaram e me fizeram crescer profissionalmente. Dra Weglis e Dra Eloá me deram a oportunidade de conhecer a

Odontologia de perto ao me darem o privilégio de realizar estágio com elas. Eu aprendi muito com vocês!

Agradeço ao meu orientador, professor Luciano, que tem me orientado desde 2021. Todos esses anos sob sua orientação contribuíram imensamente para o meu crescimento na graduação. As iniciações científicas realizadas, as apresentações de trabalhos e as premiações recebidas são reflexo do trabalho que desenvolvemos juntos e da dedicação com que o senhor sempre me guiou.

Agradeço ao meu segundo orientador, Pedro, que esteve ao meu lado durante todos esses anos. Palavras não são suficientes para expressar a imensa gratidão que tenho por você! Sou e sempre serei grata por tudo o que você fez por mim e pelo quanto me ajudou a crescer na minha trajetória acadêmica. Sua disposição em revisar cada projeto, montar cada apresentação, responder às mensagens de madrugada (rsrs) e, claro, compartilhar nossos surtos pelo caminho, fez toda a diferença. Amo você, Pedrocs!

Agradeço ao Professor Edilson por ter aceitado fazer parte deste momento tão importante para mim. Sempre o admirei como docente durante as aulas de Histologia, mas o pouco que pude conhecê-lo no departamento, durante a realização das colorações de imunohistoquímica, aumentou ainda mais minha admiração, especialmente pela sua atenção, dedicação e amor pela pesquisa.

Agradeço a todo o departamento de Endodontia pelo suporte oferecido ao longo desses anos, em especial aos orientados do Professor Luciano, que, de alguma forma, contribuíram para a realização e conclusão dos projetos desenvolvidos.

Minha gratidão também se estende a todos os professores da FOA-UNESP, pelo excelente trabalho que realizam ao exercer a docência de forma tão inspiradora, dedicada e exemplar.

Agradeço ainda a todos os pacientes que passaram pelas minhas mãos durante a graduação — sempre me esforcei ao máximo para oferecer o melhor atendimento e cuidado possível.

Agradeço à FAPESP, pelos apoios financeiros, concedido por meio dos Processos nº 2022/06896-5 e 2024/04697-0.

“O conteúdo de um livro contém o poder da educação e é com esse poder que podemos moldar nosso futuro e mudar vidas”

(Malala Yousafzai,2013)

Santos, MFO. **Biocompatibilidade do biovidro F18 na forma de Putty em selamento de perfuração de furca. 2025. Trabalho de Conclusão de Curso** - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2025.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento biológico do F18 na forma de putty em área de perfuração de furca, por meio da análise da biocompatibilidade, do processo de reparo e do potencial de biomineralização, empregando as colorações de H.E, picrosirius red (PSR), assim como imunomarcação para osteocalcina (OCN). Foram utilizados 30 animais (n=10) divididos nos grupos: Controle - Guta percha (GP), MTA Angelus (MTA) e F18 na forma de putty (F18 Putty). Foram realizadas perfurações de furca nos 1º e 2º molares superiores direitos. Em seguida, um dos materiais foi empregado de forma randomizada no selamento das perfurações, seguido do selamento com ionômero de vidro. Após o período de 7 e 30 dias, os animais foram eutanasiados e as maxilas removidas e processadas para as análises. A inflamação foi avaliada em cortes teciduais corados em H.E., o processo de reparo pela formação de colágeno foi avaliado pela coloração de PSR e o potencial de biomineralização foi analisado por meio da imunomarcação para osteocalcina (OCN). Os dados foram analisados por testes estatísticos específicos, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). O infiltrado inflamatório foi semelhante para todos os grupos, considerado leve a moderado em 7 dias ($p = 0.07$) e 30 dias ($p = 0.165$). Para as fibras colágenas, em 7 dias, o grupo F18 Putty apresentou menor quantidade de fibras imaturas e maior de fibras maduras, comparado aos demais grupos ($p = 0.001$); em 30 dias, o grupo MTA apresentou maior quantidade de fibras imaturas e menor quantidade de fibras maduras, comparado aos demais grupos ($p < 0.001$). A imunomarcação para osteocalcina foi maior nos grupos MTA e F18 Putty aos 7 dias, comparado ao grupo controle ($p < 0.001$); em 30 dias, apenas o grupo MTA apresentou maior imunomarcação comparado ao grupo controle ($p < 0.001$). Conclui-se que o biovidro F18 na forma de Putty apresentou biocompatibilidade e potencial de biomineralização, porém não evidenciou resposta superior ao MTA.

Palavras-chave: Biovidros, MTA, biomaterias, endodontia

Santos, MFO. Biocompatibility of F18 bioglass in the form of Putty in furcation perforation sealing. **Trabalho de Conclusão de Curso** - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2025.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the biological behavior of F18 in the form of putty in a furcation sealling area, through the analysis of biocompatibility, the repair process and biomineralization potential, using H.E, picrosirius red (PSR) stains. , as well as immunostaining for osteocalcin (OCN). We used 30 animals (n=10) divided into groups: Control - Gutta percha (GP), MTA Angelus (MTA) and F18 in the form of putty (F18 Putty). Furcation drillings were performed on the right upper 1st and 2nd molars. Then, one of the materials was used randomly to seal the perforations, followed by sealing with glass ionomer. After a period of 7 and 30 days, the animals were euthanized and the jaws were removed and processed for analysis. Inflammation was evaluated in tissue sections stained in H.E., the repair process through collagen formation was evaluated by PSR staining and the biomineralization potential was analyzed using immunostaining for osteocalcin (OCN). The data were analyzed using specific statistical tests, considering a significance level of 5% ($p < 0.05$). The inflammatory infiltrate was similar for all groups, considered mild to moderate at 7 days ($p = 0.07$) and 30 days ($p = 0.165$). For collagen fibers, in 7 days, the F18 Putty group had fewer immature fibers and more mature fibers, compared to the other groups ($p = 0.001$); in 30 days, the MTA group presented a greater quantity of immature fibers and a smaller quantity of mature fibers, compared to the other groups ($p < 0.001$). Immunostaining for osteocalcin was higher in the MTA and F18 Putty groups at 7 days, compared to the control group ($p < 0.001$); at 30 days, only the MTA group showed greater immunostaining compared to the control group ($p < 0.001$). It is concluded that the F18 bioglass in the form of Putty presented biocompatibility and biomineralization potential, but did not show a superior response to MTA.

Keywords: Bioglasses, MTA, Furcation perforation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da divisão dos grupos experimentais. Grupo GP (n= 10); Grupo MTA (n=10) e Grupo F18 Putty (n=10). **20**

Figura 2 – Pesquisador experiente e habilitado realizando o experimento com auxílio de microscópio cirúrgico em um aumento de 40x; **B -** Animal posicionado sobre mesa cirúrgica, anestesiado e sedado para a realização da perfuração de furca; **C –** Momento da perfuração de furca no 1º e no 2º molar da hemimaxila direita do animal, utilizando uma broca esférica em baixa rotação; **D -** Sangramento provocado após a perfuração da da furca; **E -** Dentes isolados com barreira gengival para controlar a penetração de fluidos salivares e material capeador já inserido; **F** - Imagem após selamento com ionômero de vidro e resina flow. **20**

Figura 3 – Fotomicrografias representativas para os diferentes grupos e períodos. Período experimental de 7 dias, **a1** – Guta Percha, **b1** – MTA, **c1** – F18 Putty; Período experimental de 30 dias, **a2** – Guta Percha, **b2** – MTA, **b3** – F18 Putty. (Hematoxilina & Eosina, 400x). **25**

Figura 4 – Fotomicrografias representativas para os diferentes grupos e períodos. Imagens do período experimental de 7 dias, **a1** – Guta percha, **b1** – MTA e **c1** – F18 Putty); **a2** – Guta percha, **b2** – MTA e **c2** – F18 Putty. (Picrosirius red, 400x). **27**

Figura 5 – Imunomarcação de OCN. Imagens do período experimental de 7 dias. **a1** – Guta Percha, **b1** – MTA, **c1** – F18 Putty; 30 dias. **a2** – Guta Percha, b2 – MTA, **c2** – F18 Putty. (Imunohistoquímica, 1000x). As setas indicam a quantidade de células imunomarcadas. **29**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 **–** Escores e médias para análise do infiltrado inflamatório. **26**

Tabela 2 – Porcentagem de fibras colágenas e desvio padrão (DP)* de acordo com os grupos e tempos experimentais. **28**

Tabela 3 – Escores e média para análise de imunohistoquímica **29**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **15**

2 OBJETIVOS **18**

3 MATERIAIS E MÉTODOS **18**

3.1 ANIMAIS E DROGAS **18**

3.2 INDUÇÃO E SELAMENTO DAS PERFURAÇÕES DE FURCA **19**

3.3 SACRIFÍCIO E PROCESSAMENTO LABORATORIAL **21**

4 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS **23**

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA **23**

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA **24**

5 RESULTADOS **24**

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA **24**

6 DISCUSSÃO **30**

7 CONCLUSÃO **33**

8 REFERÊNCIAS **33**

1. INTRODUÇÃO

A endodontia é responsável pelo tratamento e reparo dos tecidos pulpares e periapicais, que podem ser danificados por meio de infecção, traumas ou iatrogenias. Ao longo dos anos, surgiram diversas tecnologias e materiais que favoreceram a qualidade e a previsibilidade do tratamento endodôntico. Por outro lado, é uma área da odontologia considerada de alta complexidade que leva a acidentes corriqueiros nos consultórios (Leonardo et al. 2012; Plotino et al. 2007; Medina-Fernandez et al. 2019). Uma das iatrogenias mais comuns são as perfurações de furca, que podem ocasionar lesões de furca, sendo essas as que apresentam um dos piores prognósticos e relacionada com a maior parte dos insucessos endodônticos (Lagisetti et al. 2018).

A perfuração endodôntica é uma situação clínica que ocorre em até 12% dos dentes tratados endodonticamente. Isso ocorre principalmente pela falta de domínio do profissional em acessar e instrumentar os canais radiculares, além de serem causadas por condições patológicas, como reabsorções e processos cariosos (Farzeneh et al. 2004; Mente et al. 2014). Na prática clínica, a iatrogenia profissional que leva à perfuração de furca deve ser selada imediatamente, evitando a sua contaminação e proporcionando melhores chances de reparo tecidual (Weldon et al. 2002).

As lesões de furca podem ser definidas como uma comunicação entre o sistema de canais radiculares e os tecidos periodontais (Koç et. al. 2021; American of Endodontics Association, 2003). Essa condição gera a formação de uma lesão nessa região e é considerada pela literatura uma das formas mais complexas de tratamento (Jantarat et al. 1998) e, dependendo das condições de infecção, da extensão, da localização e do grau do dano periodontal, essa pode levar a perda do elemento dentário (Koç et al. 2021; Alhadainy et al. 1994; Lagisetti et al. 2018). Estudos indicam que a maior parte dos insucessos do tratamento de perfurações de furca é devido à dificuldade de realizar um selamento hermético, decorrente da complexidade e da localização, assim como limitações apresentadas por alguns tipos de materiais presentes no mercado e disponíveis para a realização do procedimento selador (Jantarat et al. 1998).

A dificuldade do selamento está associada às propriedades dos materiais. Assim, novos estudos devem ser realizados em busca de diferentes materiais e terapias que facilitem o tratamento dos tecidos periodontais desta região (Singh et al. 2013). Através do selamento com o uso de biomateriais pode ser possível promover o reparo dos tecidos danificados na perfuração (Singh et al. 2013). É de grande importância que estes materiais apresentem características como capacidade de vedação, alta biocompatibilidade, capacidade de induzirem a osteogênese e cementogênese, propriedade antimicrobiana, fácil manipulação e inserção, além de custo condizente com a realidade do mercado. Dentre os materiais mais utilizados para esse procedimento temos o Agregado Trióxido Mineral (MTA) e o hidróxido de cálcio $Ca(OH)_2$ (Okiji & Yoshiba 2009, Cushley et al. 2020). Entretanto, o MTA apresenta propriedades superiores ao $Ca(OH)_2$, devido às suas propriedades mecânicas. Além disso, de forma semelhante ao $Ca(OH)_2$, promove a formação de tecido osteogênico e odontogênico, assim como induz a regeneração ligamentar e a deposição de cemento (Okiji & Yoshiba 2009, Parirokh et al. 2018, Cushley et al. 2020; Tawfik et al. 2016). Contudo, o MTA possui algumas limitações, como o manchamento dos dentes, difícil manipulação e aplicação, além do custo relativamente alto (Darvell et al. 2011, Haapasalo et al. 2015, Marciano et al. 2015). Com isso, se faz necessário a busca de novos materiais que apresentem melhores propriedades e custo-benefício.

Um material bioativo é conhecido pela sua capacidade de induzir uma resposta benéfica no organismo, se ligando aos tecidos do hospedeiro, especialmente ao tecido ósseo (Jones et al. 2013). Dentre esses materiais temos os biovidros, que são formados a partir de partículas de vidro (Jones et al. 2013; Revista Fapesp, 2016). Estudos envolvendo biovidros ativos vem aumentando e ganhando notoriedade no meio científico, devido a sua capacidade de promover formação tecidual, desempenhando papéis osteoindutores e osteocondutores, além da sua capacidade de induzir a formação de tecidos moles (Hench et al. 1991, 2006; Jones et al. 2013, Souza et al. 2017a). Em 1969 Hench e colaboradores desenvolveram o primeiro biovidro ativo, conhecido como 45S5, que se liga rapidamente aos tecidos ósseos induzindo a sua formação (Hench et al. 1991, 2006). Recentemente foi

formulada uma composição de biovidro conhecido como F18, que se mostrou capaz de promover a regeneração óssea (Souza et al. 2016ab, 2017bc; Gabbai-Armelin et al. 2017), colagenosa e vascular (Souza et al. 2017b), através da indução do aumento do óxido nítrico e consequentemente o aumento na produção de fatores de crescimento vascular (Keshaw et al. 2005, Gorustovich et al. 2010, Stähli et al. 2015, Oishi et al., 2019). Adicionalmente, apresenta também atividade antimicrobiana (de Araújo et al. 2020). Esse biovidro vem sendo explorado na área odontológica e já apresentou resultados promissores na endodontia (de Araújo et al. 2020, de Paula et al. 2024), levando o nosso grupo de pesquisa a questionar se o mesmo poderia ser utilizado como material selador em situações clínicas críticas, como em casos de perfurações de furca.

Estudos têm evidenciado os efeitos positivos do F18 presente nas pastas para medicação intracanal, devido a sua capacidade osteogênica e antimicrobiana que pode induzir o selamento biológico e diminuir a atividade de bactérias nos canais radiculares (de Araujo Lopes et al. 2020). Este biovidro também já foi incorporado em produtos para a hipersensibilidade dentinária (Reis et al. 2021), em membranas (Hidalgo et al. 2018) e scaffolds para guiar a regeneração tecidual (Marin et al. 2021; Gabbai-Armelin et al. 2017), em fibras condutoras para formação de nervos (Souza et al. 2016b) e em fibras para guiar a regeneração de cartilagens (Souza et al. 2017b). E, um estudo recente mostra a biocompatibilidade do F18 em casos de capeamento pulpar (Chaves et al. 2024).

Recentemente, obtivemos a nova formulação deste material, na forma de putty, que supostamente se apresenta como um biomaterial de fácil manipulação e inserção para os casos de perfuração endodôntica. Sendo assim, com todas suas propriedades em destaque, nosso grupo de pesquisa se propôs a desenvolver uma metodologia para estudo do comportamento de biomateriais em procedimentos de selamento de furca in vivo, em ratos Wistar, podendo assim, estudar as respostas biológicas do F18 em forma de putty nessa condição clínica. Deste modo, o potencial biológico do material pôde ser avaliado através de técnicas de coloração em Hematoxilina & Eosina (H&E) para verificação do infiltrado inflamatório (Gomes-Filho et al. 2009, 2011; Cintra et al. 2017a). Já o reparo, poderá ser avaliado por meio da maturidade

colagenosa por meio da coloração de Picrosirius Red (PSR) (Cintra et al. 2017a). Além disso, também podemos verificar o potencial biomineralizador deste biovidro através de uma proteína indicadora do processo de mineralização conhecida como Osteocalcina (OCN) (Silva et al. 2014; Cosme-Silva et al. 2019).

Portanto, a proposta geral deste estudo foi analisar a biocompatibilidade, o processo de reparo e o potencial biomineralizador do biovidro F18 em forma de Putty, visando identificar um possível produto para ser incorporado nas práticas clínicas da endodontia.

2. OBJETIVOS

Avaliar o biomaterial F18 em forma de Putty quanto à sua biocompatibilidade por meio da coloração de H&E, o processo de reparo, por meio da maturidade do colágeno pela coloração de PSR, e o potencial de biomineralização, pela imunomarcação para osteocalcina (OCN), empregando modelo animal para selamento de perfuração de furca.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Drogas

Foram utilizados 30 ratos machos (Rattus albinus, Wistar), pesando entre 250g e 280g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais foram mantidos em ambientes controlados, de acordo com os requisitos pré-estabelecidos pelo comitê de ética local, com um ambiente com temperatura entre 22 e 24ºC com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, contendo quatro ratos por gaiola, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 24 horas após as intervenções cirúrgicas. Os procedimentos experimentais executados foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética animal – CEUA-FOA/Unesp (nº 0293-2021).

Para anestesia dos animais foi utilizado via intramuscular um sedativo à base de Cloridrato de Xilazina a 2% (Xilazin, Syntec – Barueri, Brasil –

10mg/Kg) e um anestésico à base de Cloridrato de Cetamina a 10% (Cetamin, Syntec – Barueri, Brasil – 25mg/Kg). O período de trabalho com cada animal não ultrapassou 15 minutos para não haver necessidade de complementação anestésica.

Os animais foram monitorados após o procedimento cirúrgico e receberam uma dose de 150 mg/Kg de dipirona sódica para controle da analgesia pós-operatória.

3.2 Indução e selamento das perfurações de furca

As perfurações foram realizadas em 2 dentes da maxila direita de cada animal, totalizando 60 dentes no experimento. As perfurações de furca foram confeccionadas por um pesquisador experiente e habilitado no uso do microscópio. As furcas foram expostas no centro do assoalho das câmaras pulpares, em profundidade de 2mm nos 1º. e 2º. molares superiores direito dos animais. Para isso foi empregado uma broca em aço carbono (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,5mm de diâmetro, em baixa velocidade, e sob irrigação de solução salina (Figura 1A).

Os dentes perfurados foram isolados com barreira gengival, controlando a penetração de fluidos salivares (Figura 1B). Depois de isolados, foi utilizado hipoclorito de sódio a 1% para descontaminação superficial. Após a irrigação com hipoclorito, foi realizada irrigação com soro fisiológico para inativar a solução de hipoclorito. O local cirúrgico foi seco com bolinhas de algodão estéreis e cones de papel absorvente adaptados para a cavidade (Figura 1C). O selamento foi realizado com os diferentes materiais de forma randomizada (Figura 1D). Após o selamento da furca, os materiais seladores foram cobertos com ionômero de vidro e, em seguida, as cavidades foram condicionadas com ácido fosfórico à 37% e restauradas com resina flow (Figura 1E). Um ajuste oclusal foi realizado para que os animais não desenvolvessem trauma. Os grupos foram divididos de acordo com o tipo de material utilizado para o selamento, sendo eles: Grupo GP (Guta Percha); Grupo MTA e Grupo F18 Putty. Como cada animal foi submetido ao procedimento em dois dentes, cada grupo apresentou uma quantidade de 20 dentes selados. Considerando dois

tempos experimentais (7 e 30 dias), o número de amostras por grupos e por tempo foi de 10 dentes.

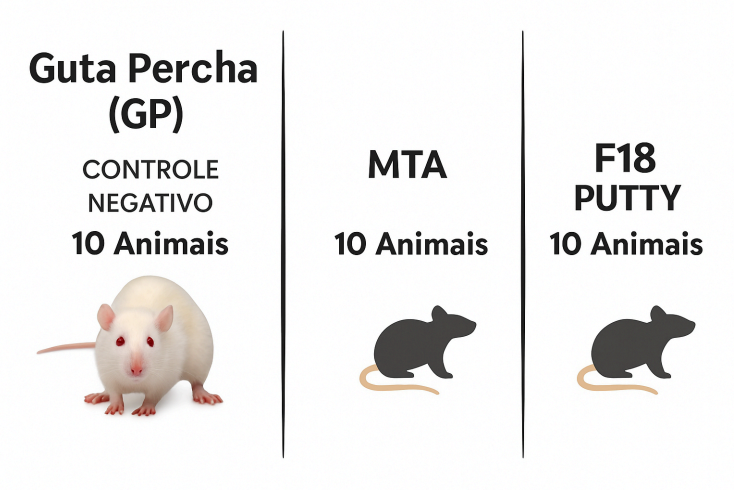


Figura 1: Esquema da divisão dos grupos experimentais. Grupo GP (n= 10); Grupo MTA (n=10) e Grupo F18 Putty (n=10).

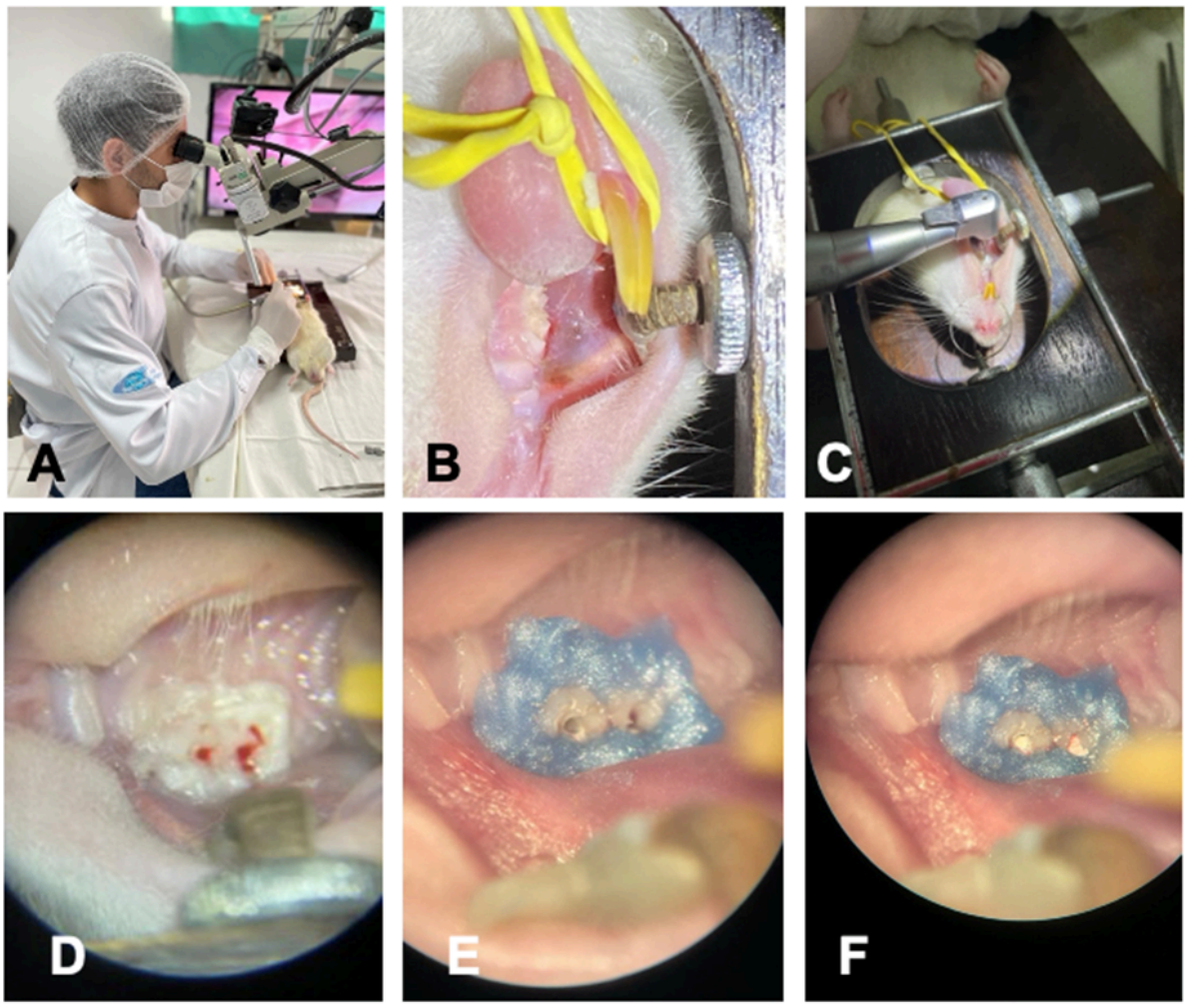


Figura 2: A - Pesquisador experiente e habilitado realizando o experimento com auxílio de microscópio cirúrgico em um aumento de 40x; **B -** Animal posicionado sobre mesa cirúrgica, anestesiado e sedado para a realização da perfuração de furca; **C –** Momento da perfuração de furca no 1º e no 2º molar da hemimaxila direita do animal, utilizando uma broca esférica em baixa rotação; **D -** Sangramento provocado após a perfuração da da furca; **E -** Dentes isolados com barreira gengival para controlar a penetração de fluidos salivares e material capeador já inserido; **F** - Imagem após selamento com ionômero de vidro e resina flow.

3.3 Sacrifício e processamento laboratorial

Os períodos de sacrifício foram de 7 e 30 dias. A cada tempo experimental, cinco animais de cada grupo, contendo 2 dentes selados cada, foram eutanasiados por meio de uma dose excessiva de Tiopental sódico (Cintra et al. 2016). Após eutanásia, a hemimaxila direita de cada animal foi removida e os espécimes foram incluídos em glicol metacrilato (GMA) para ser realizado a coloração de H&E, PSR e imunohistoquímica.

Inicialmente os espécimes foram fixados em solução formalina a 10%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 24 horas e depois lavadas em água corrente por um período de 12 horas. Após a fixação, os espécimes foram lavados em água corrente durante 5 horas para a remoção da solução de fixação e desidratadas em álcool em concentrações crescentes: álcool 70% durante uma noite, álcool 90% em 3 trocas de 30 minutos e álcool 95% em 3 trocas de 30 minutos. Para inclusão em historesina, foi utilizado o kit JB4 (Polysciences Inc), que é constituído pela Solução A, Ativador e Solução B, na qual as peças ficaram durante 72h imersas na solução A ativada (0,9mg de ativador para cada 100ml de Solução A). As peças foram colocadas em moldes de plástico, previamente preparados com Teflon em “spray”, para evitar a adesão do glicol metacrilato ao molde e o aquecimento durante a polimerização, e preenchidos com a solução de inclusão (0,04 ml da Solução B para cada ml da Solução A ativada). Para evitar que a solução entrasse em contato com o oxigênio do ar, cada molde foi coberto com resina autopolimerizável, pois este dificulta a reação normal da resina. Aguardou-se duas horas para que a polimerização se completasse. Após todo este

processo, os blocos foram cortados com lâmina de tungstênio em micrótomo (Leica - RM 2045), com espessura de 5 µm, para realização das colorações de H&E e PSR, sendo confeccionadas 2 lâminas de cada animal, com 3 cortes teciduais cada, obtidos no sentido longitudinal das faces mésio-distal, considerando a área de interesse o centro da face oclusal.

Para a técnica da imunohistoquímica, os cortes histológicos foram cortados em 5 µm e hidratados em etanol, seguindo uma sequência de três lavagens em etanol 100% por dois minutos, uma lavagem em etanol 95% por dois minutos e uma lavagem de etanol 70% por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 30 minutos. Ao término de cada uma das etapas da reação imunoistoquímica foram efetuadas lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4. Os cortes histológicos foram imersos em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora para o bloqueio da peroxidase endógena. Para o bloqueio da biotina endógena, os cortes foram mergulhados em uma solução contendo PBS e leite em pó por mais 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas em uma solução contendo PBS e 3g de soro albumina bovino por 24 horas, para o bloqueio dos sítios inespecíficos. As lâminas histológicas foram submetidas à incubação com seu anticorpo primário durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes, após as lâminas terem sido mantidas em estufa por 30min em 60ºC para remoção da água, foi empregado o reagente Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). As secções histológicas foram incubadas em anticorpo secundário biotinilado, durante 2 horas, e posteriormente tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase (HRP), por 2 horas. Na revelação foi empregado como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Antes de realizar a contra coloração, as lâminas passaram por uma lavagem em PBS por 5 minutos e em água destilado por mais 5 minutos. A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Harris, da mesma forma descrita anteriormente para a coloração de H&E. Em seguida, passaram por lavagem em água destilada, sendo realizado três

ciclos de 1 minuto. Por fim, passaram por mais uma sequência de álcool, na qual ficaram dois minutos imersas em álcool 70%, 95% e álcool 100%, sendo este último repetido três vezes, além de etanol associado a xilol por dois minutos. Por fim, passaram por uma sequência em xilol, sendo eles: Xilol I por 5 minutos, Xilol II por 5 minutos e Xilol III por 10 minutos.

4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 Análise histológica e imunohistoquimica

A análise histológica das hemimaxilas serviu para caracterização do perfil inflamatório da resposta tecidual frente aos diferentes materiais. Os resultados foram expostos por meio de duas análises, sendo uma descritiva e outra qualitativa. As lâminas contendo os cortes representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica e utilizadas na análise descritiva. A análise descritiva consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais (Cintra *et al.* 2013c). A análise qualitativa do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400x, e classificados nos seguintes escores: escore 1 para células inflamatórias ausentes ou em número desprezível; score 2 para infiltrado inflamatório discreto (menos de 10 células por campo); score 3 para infiltrado inflamatório moderado (entre 10 e 25 células por campo); e score 4 para Infiltrado inflamatório intenso (mais que 25 células por campo) (Cintra et al. 2013b; Cintra et al. 2014a; Cintra et al. 2014b).

Os níveis de maturação das fibras de colágeno foram analisados nas secções coradas por PSR sob microscopia de luz polarizada. O programa QWin foi utilizado (ampliação de 400X, Leica QWin V3, Leica Microsystems), permitindo a seleção de cores correspondentes para cada tipo de fibra de colágeno no tecido periodontal. Após a seleção de cores, o programa calculou automaticamente a área marcada. As fibras amarelas esverdeadas foram consideradas imaturas e finas, enquanto as fibras vermelhas amareladas foram consideradas maduras e grossas (Junqueira, 1982).

A análise imunohistoquímica foi realizada sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por dois investigadores

cegos e calibrados. A imunomarcação foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no citoplasma das células e/ou na matriz extracelular. A análise semiquantitativa, que fornece informações sobre o número de células imunorreativas e a intensidade de imunomarcação da matriz extracelular, foi efetuada utilizando-se cinco secções histológicas de cada animal. Os escores do padrão de imunomarcação foram: (escore 0) apresenta ausência total de imunorreação; (escore 1) < 20% das células imunorreativas e fraca marcação da matriz extracelular; (escore 2) >20% e <40% das células imunorreativas e fraca marcação da matriz extracelular; (escore 3) >40% e <60% das células imunorreativas e moderada marcação da matriz extracelular; (escore 4) >60% e <80% das células imunorreativas e forte marcação da matriz extracelular; (escore 5) >80% das células imunorreativas e forte marcação da matriz extracelular, adaptado de (Cosme-Silva et al. 2019).

4.2 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot 12.0™ (Chicago, IL, USA). A verificação da distribuição normal das variáveis contínuas quantitativas foi feita pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Para as análises que seguiram uma distribuição normal foram aplicados o teste ANOVA, já para comparações múltiplas dos resultados entre os grupos estudados, foi utilizado o teste Tukey. Para as análises que não seguiram uma distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, e quando observada alguma diferença significativa, foi realizado o cruzamento entre os grupos, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (Dunn, 1958). O nível de significância foi de 5% ($p<0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Análise Histológica

Infiltrado inflamatório

No período experimental de 7 dias, o infiltrado inflamatório foi considerado de leve a moderado para os grupos GP e F18 Putty e de leve a

intenso para o grupo MTA, sem diferenças estatísticas entre os grupos (p = 0.07). No período experimental de 30 dias a inflamação foi considerada leve a moderada para todos os grupos, sem diferença estatística (p = 0.165). Os escores atribuídos a cada grupo estão descritos na tabela 1 e as imagens representativas da análise histológica estão apresentadas na figura 1.

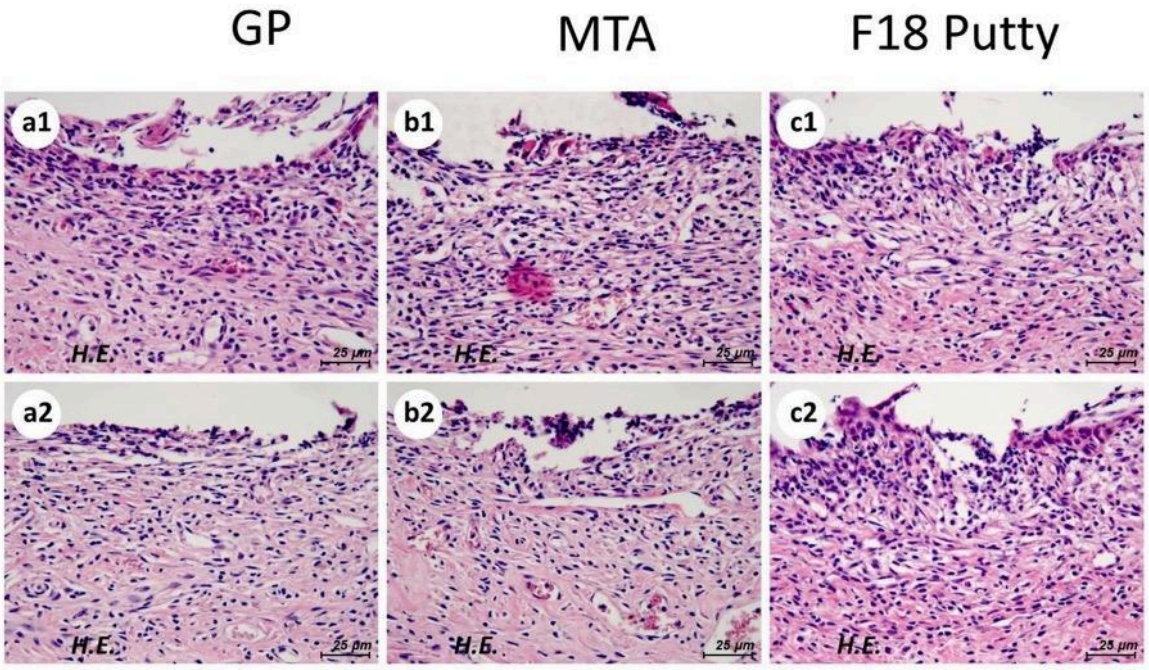


Figura 3. Fotomicrografias representativas para os diferentes grupos e períodos. Período experimental de 7 dias, **a1** – Guta Percha, **b1** – MTA, **c1** – F18 Putty; Período experimental de 30 dias, **a2** – Guta Percha, **b2** – MTA, **b3** – F18 Putty. (Hematoxilina & Eosina, 400x).

Tabela 1. Escores e médias para análise do infiltrado inflamatório.

Parâmetros de análise		7 dias				30 dias			
		GP	**MTA**	**F18 Putty**		**GP**	**MTA**	**F18 Putty**	
Infiltrado Inflamatório	**1 – Ausente**	0/10	0/10	0/10		0/10	0/10	0/10	7 dias (p= 0.07)
	2 – Leve	5/10	2/10	4/10		8/10	7/10	4/10	30 dias (p = 0.165)
	3 - Moderado	5/10	4/10	6/10		2/10	3/10	6/10	
	4 – Intenso	0/10	4/10	0/10		0/10	0/10	0/10	
	Mediana*	2.5^{A}	3^{A}	3^{A}		2^{A}	2^{A}	3^{A}	

*Letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatisticamente significante em cada período experimental ($p < 0.05$)

Maturidade do colágeno

De acordo com análise de PSR, em 7 dias, o grupo F18 Putty se difere dos demais, apresentando uma menor quantidade de fibras imaturas e maior quantidade de fibras maduras, comparado aos demais grupos ($p = 0.0001$). Aos 30 dias, o Grupo MTA se difere dos demais, apresentando uma maior quantidade de fibras imaturas e menor quantidade de fibras maduras, comparado aos demais grupos ($p < 0.0001$). As porcentagens de fibras colágenas presentes em cada grupo estão localizadas na tabela 2 e as imagens representativas da análise imunohistoquímica estão apresentadas na figura 3.

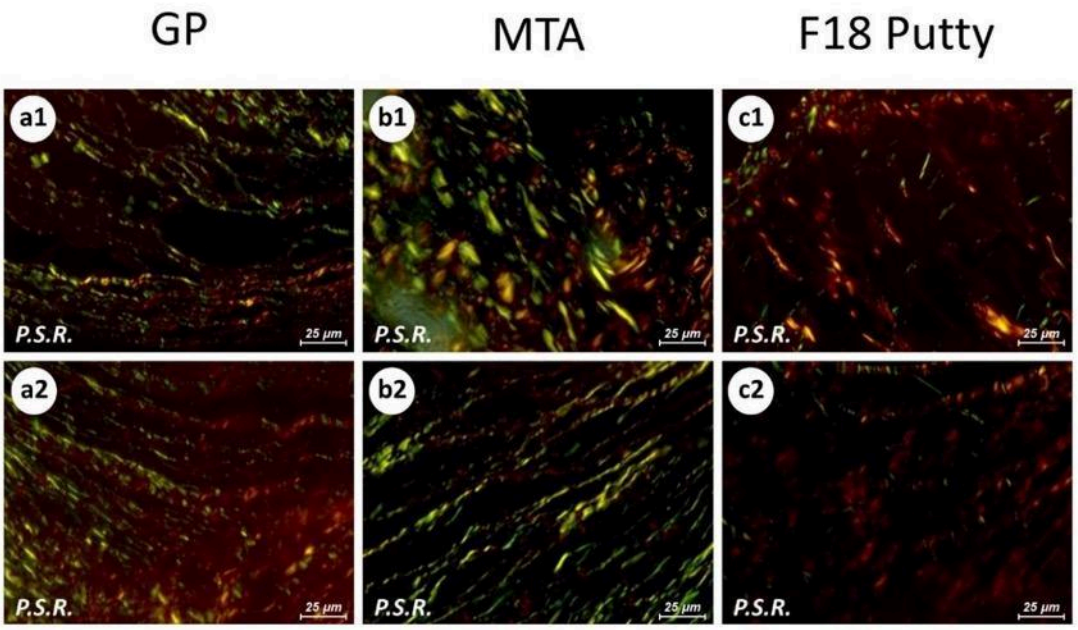


Figura 4. Fotomicrografias representativas para os diferentes grupos e períodos. Imagens do período experimental de 7 dias, **a1** – Guta percha, **b1** – MTA e **c1** – F18 Putty); **a2** – Guta percha, **b2** – MTA e **c2** – F18 Putty. (Picrosirius red, 400x).

Tabela 2 – Porcentagem de fibras colágenas e desvio padrão (DP)* de acordo com os grupos e tempos experimentais.

Tempo	Material	Fibras Imaturas Verdes		Fibras Maduras Vermelhas	
7 dias	GP	57.37 ± 11.89^{A}	p = 0.001	42.63 ± 11.89^{A}	p = 0.001
	MTA	66.73 ± 14.57^{A}		33.27 ± 14.57^{A}	
	F18 Putty	29.11 ± 06.97^{B}		70.89 ± 06.97^{B}	
30 dias	GP	38.69 ± 09.55^{A}	p < 0.001	61.31 ± 09.55^{A}	p < 0.001
	MTA	69.25 ± 11.67^{B}		30.75 ± 11.67^{B}	
	F18 Putty	25.75 ± 07.95^{A}		74.25 ± 07.95^{A}	

*Letras semelhantes sobrescritas indicam que não há diferença estatística entre os grupos para cada período experimental (p > 0.05)

Imunohistoquímica para OCN

Aos 7 dias, os grupos MTA e F18 Putty apresentaram imunomarcação leve, com células imunorreativas para OCN variando entre 20% e 40% e fraca marcação da matriz extracelular, sendo diferente do grupo GP, que apresentou imunomarcação com menos de 20% das células imunorreativas e fraca marcação da matriz extracelular (p < 0.001).

Em 30 dias, apenas o grupo MTA apresentou diferença comparado ao grupo GP, denotando mais de 80% das células imunorreativas e moderada marcação da matriz extracelular (p < 0,001); O grupo F18 putty, não apresentou diferença estatística quando comparado com os outros dois grupos. Os escores atribuídos a cada grupo estão localizados na tabela 3 e as imagens representativas da análise histológica estão apresentadas na figura 4.

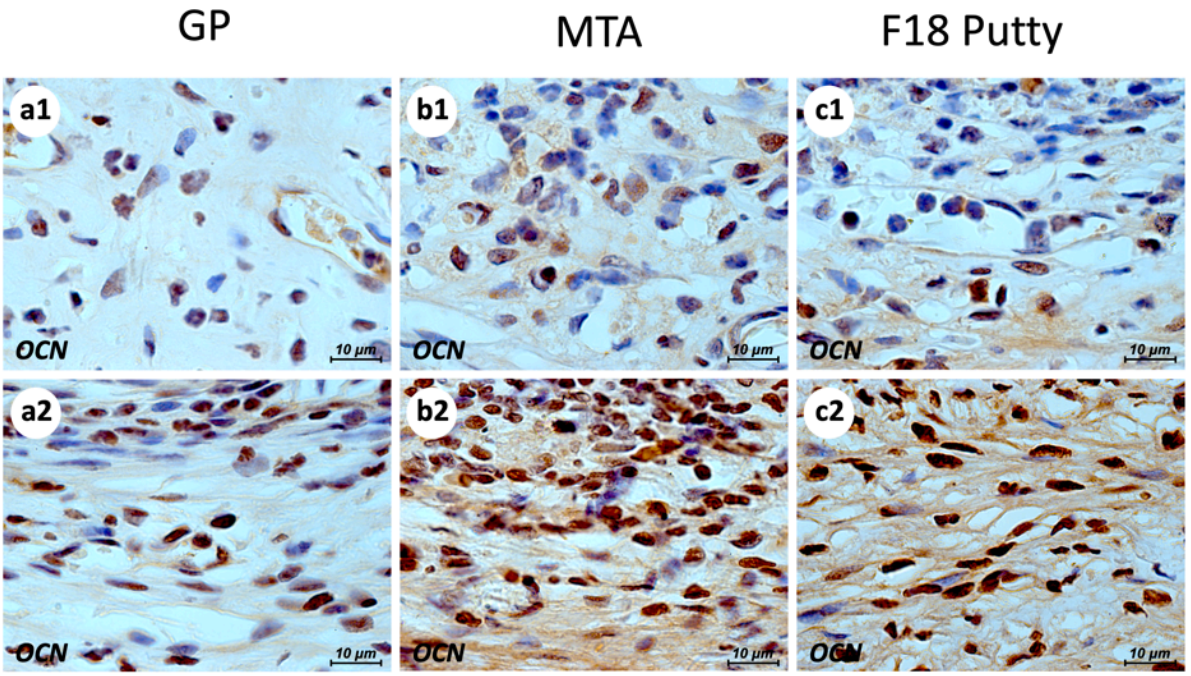


Figura 5. Imunomarcação de OCN. Imagens do período experimental de 7 dias. **a1** – Guta Percha, **b1** – MTA, **c1** – F18 Putty; 30 dias. **a2** – Guta Percha, b2 – MTA, **c2** – F18 Putty. (Imunohistoquímica, 1000x). As setas indicam a quantidade de células imunomarcadas.

Tabela 3. Escores e média para análise de imunohistoquímica

Parâmetros de análise		7 dias				30 dias			
		GP	MTA	F18 Putty		GP	MTA	F18 Putty	
OCN	0	4/10	0/10	0/10	p < 0.001	0/10	0/10	0/10	p < 0.001
	1	6/10	1/10	3/10		2/10	0/10	0/10	
	2	0/10	7/10	4/10		2/10	0/10	0/10	
	3	0/10	2/10	3/10		6/10	1/10	4/10	
	4	0/10	0/10	0/10		0/10	3/10	6/10	
	5	0/10	0/10	0/10		0/10	6/10	0/10	
	Mediana*	1_A	2_B	2_B		3_A	5_B	4_{AB}	

*Letras semelhantes indicam que não há diferença estatística entre os grupos para cada período experimental (p > 0.05)

6. DISCUSSÃO

O biovidro F18 se mostra na literatura como um material biocompatível capaz de induzir a formação de tecido ósseo, colagenoso e vascular (Souza et al. 2016ab, 2017bc; Gabbai-Armelin et al. 2017; Souza et al. 2017b; Keshaw et al. 2005, Gorustovich et al. 2010, Stähli et al. 2015, Oishi et al., 2019). Neste estudo, foi analisado o potencial do F18 na forma de Putty como possível substituto de biomateriais já consagrados no mercado, como o MTA, em casos de perfuração de furca (Camilleri et al. 2013; da Fonseca et al., 2019). O F18, em pó, já foi estudado na área das ciências odontológicas, como em pastas intracanais experimentais, utilizando tubos de polietileno implantados no tecido subcutâneo de ratos (de Araujo Lopes et al. 2020), como irrigante adicional no tratamento endodôntico (de Paula et al. 20224) e como capeador pulpar (Chaves et al. 2024). No entanto, a evidência científica na odontologia para esse material ainda é pouca, especialmente em sua forma de putty. Uma outra novidade é que, o modelo experimental utilizado procurou mimetizar uma situação clínica específica na odontologia, que ainda não havia sido proposto para o estudo de biomateriais. Portanto, nosso grupo de pesquisa objetivou analisar a resposta tecidual do F18 na forma de putty, comparando com o MTA e a guta percha em um modelo desenvolvido para selamento de furca em ratos Wistar.

Para melhor compreendermos seu comportamento tecidual, foi realizada a análise do infiltrado inflamatório pela coloração de H&E (de Oliveira et al. 2021; Gomes-Filho et al. 2009, 2011; Cintra et al. 2017a). A inflamação foi classificada de ausente a severa, por meio de escores pré-estabelecidos (Cintra et al. 2013b; Cintra et al. 2014a; Cintra et al. 2014b; Oliveira et al. 2021). Observou-se que o F18 Putty não se mostrou um biomaterial superior ao MTA, já que apresentou uma inflamação moderada, não sendo diferente estatisticamente do grupo MTA ($p>0,05$). O modelo experimental pode ter sido uma limitação, já que o MTA, que é utilizado para situações clínicas como o de selamento de furca (Camilleri et al. 2013; da Fonseca et al., 2019), também apresentou um infiltrado semelhante ao do grupo GP. Baseado nos resultados obtidos, sugere-se que estes materiais sejam testados em diferentes

circunstâncias, possibilitando uma melhor condição para a resposta e análise dos biomateriais.

O reparo tecidual, avaliado pela deposição de colágeno, é uma forma de entender o estímulo que o biomaterial desempenha no tecido, induzindo a formação de tecido colagenoso reparador (Cintra et al. 2017a). Os fibroblastos se proliferam em áreas que estão em processo de reparo (Diegelmann & Evans, 2004). Sendo assim, temos que na análise de PSR, fibras maduras indicam um reparo que se iniciou há tempo, enquanto as fibras imaturas são observadas em regiões que estão em processo de remodelação de colágeno (Cintra et al. 2017; de Oliveira et al. 2022). Contudo, fibras maduras de colágeno podem ser encontradas em regiões inflamadas devido à presença do processo de fibrose (de Oliveira et al. 2022). Observou-se que o F18 Putty apresentou menor quantidade de fibras imaturas em 7 dias ($p = 0.0001$). Este achado pode estar relacionado com a baixa velocidade de remodelação do colágeno. Aos 30 dias o MTA apresentou maior quantidade de fibras imaturas ($p< 0.0001$), evidenciando um maior potencial reparador para o MTA, quando comparado ao F18 Putty e Guta percha. Sabe-se que o MTA apresenta condições de formação tecidual consagradas pela literatura (Silva et al. 2019) e nesse estudo, mesmo com possíveis limitações do modelo experimental, estes achados também foram observados de forma comparativa a outros materiais. Em relação ao F18 Putty, Gabbai-Armelin et al. 2017, avaliou a proliferação de células fibroblásticas in vitro, destacando uma ação positiva. Porém, neste modelo in vivo, não foi possível observar superioridade comparando-o ao MTA.

Uma outra forma de analisar o potencial bioindutor de um biomaterial, é avaliar sua atividade biomineralizadora (Silva et al. 2014; Cosme-Silva et al. 2019). A OCN é uma proteína não colagenosa encontrada em osso e dentina que participa no controle da biomineralização e homeostase de íons cálcio nos tecidos frente ao contato com materiais seladores, este mecanismo é importante para o sucesso do tratamento em casos de perfurações de furca (McKee et al. 1996, Cosme-Silva et al. 2019; Zairi et al. 2012; Tani-Ishii et al. 2007). Assim, as análises da OCN nos auxiliaram a identificar o potencial biomineralizador do F18 Putty (Orimo et al. 2010; Cosme-Silva et al. 2019). Neste estudo, foi possível notar, que em 7 dias, o grupo MTA e F18 Putty,

apresentaram uma maior imunomarcação para a osteocalcina, comparado ao controle GP ($p < 0.001$). Estes achados comprovam que ambos os materiais possuem propriedade indutoras de mineralização. Por outro lado, em 30 dias, nota-se que apenas o MTA manteve seu potencial biomineralizador. O F18 Putty, apesar de apresentar imunomarcação discretamente superior ao grupo controle GP, não foi diferente do ponto de vista estatístico em 30 dias. Isso pode ser explicado, porque inicialmente, o F18 Putty permitiu o estímulo para OCN, mas não foi capaz de mantê-lo de forma efetiva nas condições apresentadas. Já a expressão de OCN no grupo GP, aconteceu pelo possível reparo induzido pelo próprio organismo e não pela atividade biomineralizadora da guta percha, que é nula (Silva et al. 2019).

Um material restaurador ideal deve apresentar características físico-químicas como estabilidade dimensional, cor, radiopacidade, selamento hermético, insolubilidade em contatos com fluídos, fluidez e fácil inserção (Camilleri et al. 2011; Marciano MA et al. 2014; Islam et al. 2005; Cavenago et al. 2014; Duarte et al. 2012; Duque et al. 2018). O biovidro F18 em forma de Putty se apresenta como um material aquoso, altamente fluído, que se mostrou ser de difícil manipulação para seu uso na região de furca perfurada. Por mais que sua proposta inicial fosse ser um material de fácil manipulação e inserção, essa característica não foi observada durante sua aplicação. Adicionalmente, este material possui coloração transparente que dificulta a sua visualização ao ser aplicado. Ademais, ao ser inserido no defeito, o biomaterial não se incorporava nas paredes adjacentes à cavidade devido ao seu alto grau de fluidez, dificultando sua adesão e resistência mecânica, característica oposta à apresentada no MTA, mesmo sendo apontado na literatura como material que carece de rigidez mecânica (Duarte et al. 2018). Por esse motivo, uma das hipóteses deste biomaterial não ter apresentado um bom desempenho em casos de perfuração de furca, foi a sua forma de Putty. Um outro aspecto importante, é a possibilidade de ter havido contaminação do local, interferindo na resposta dos biomateriais (Duarte et al. 2018). Dessa forma, com adaptações metodológicas, pode ser possível evidenciar melhores resultados biológicos. Além disso, uma melhor resposta pode ser observada, caso haja a incorporação do F18 em bases poliméricas, como hidrogéis ou scaffolds,

melhorando a distribuição e adaptação do material no tecido aplicado (Pankajakshan et al. 2020; de Souza Araújo et al. 2022).

Em resumo, observou-se que o F18 Putty apresentou um infiltrado inflamatório semelhante aos demais grupos, além de demonstrar potencial biomineralizador. Contudo, o MTA foi o material que mais induziu a formação de colágeno reparador e melhor estimulou a biomineralização. As limitações da consistência do material e a metodologia podem ter interferido nos resultados, sendo importante a busca de melhores formas de incorporação do material e de técnicas para análises das respostas de biomateriais em condições clínicas críticas, como a de perfuração de furca.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que o F18 Putty apresentou um infiltrado inflamatório semelhante ao MTA e induziu o processo de biomineralização. Entretanto, o MTA foi o material que melhor induziu a formação de colágeno reparador e o processo de biomineralização.

8. REFERÊNCIAS

1. Alhadainy HA. Root perforations. A review of literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994;78:368–74.
2. American Association of Endodontists. American Association of Endodontists Glossary of Endodontic Terms, 9th ed. Chicago: American Association of Endodontists; 2016.
3. Camilleri J, Mallia B. Evaluation of the dimensional changes of mineral trioxide aggregate sealer. Int Endod J. 2011 May;44(5):416-24.
4. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D (2013) Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate ce- ment, Biodentine and MTA Angelus. Dent Mater 29:580–593.
5. Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Marciano MA, Bramante CM et al. Influence of powder-to-water ratio on radiopacity,

setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. Int Endod J. 2014 Feb;47(2):120-6.

6. Chaves HGDS, Figueiredo B, Maia CA, Reis-Prado AHD, Antunes MM, Mesquita RA, Tavares WLF, Menezes GB, Diniz IMA, Crovace MC, Avelar GF, Benetti F. Tissue response and expression of interleukins (IL)-1ß, IL-6, IL-10 after pulp capping with bioglasses in mice. Braz Oral Res. 2024 Dec 9;38:e096.
7. Cintra LT, Ribeiro TA, Gomes-Filho JE, Bernabé PF, Watanabe S, Facundo AC, Samuel RO, Dezan-Junior E. Biocompatibility and biomineralization assessment of a new root canal sealer and root-end filling material. Dent Traumatol. 2013 Apr;29(2):145-50.
8. Cintra LTA, da Silva Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Narciso LG, Bomfim SR et al. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. Journal of Endodontics. 2014a; 40:1139-1144.
9. Cintra LTA, Ferreira LL, Benetti F, Gastélum AA, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Briso ALF. The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model. Int Endod J. 2017, V. 50, N. 8, P. 790-798. Silva LA, Barnett F, Pumarola-Suñé J, Cañadas PS, Nelson-Filho P, Silva RA. Sealapex Xpress and RealSeal XT feature tissue compatibility in vivo. J Endod. 2014 Sep;40(9):1424-8. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.040. Epub 2014 Mar 6. PMID: 25146025.
10. Cintra LTA, Samuel RO, Azuma MM, de Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH et al. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. Journal of Endodontics. 2016; 42:747-751.
11. Cosme-Silva L, Benetti F, Dal-Fabbro R, Gomes Filho JE, Sakai VT, Cintra LTA, Alvarez N, Ervolino E, Viola NV. Biocompatibility and biomineralization ability of Bio-C Pulpecto. A histological and immunohistochemical study. Int J Paediatr Dent. 2019 May;29(3):352-360.
12. Cushley S, Duncan HF, Lappin MJ, Chua P, Elamin AD, Clarke M, El-Karim IA. Efficacy of direct pulp capping for management of cariously exposed pulps in permanent teeth: a systematic review and meta-analysis. Int Endod J. 2021 Apr;54(4):556-71.

13. da Fonseca TS, Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Delfino MM, SassoCerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biodentine and MTA modulate immunoinflammatory response favoring bone formation in sealing of furcation perforations in rat molars. Clin Oral Investig. 2019 Mar;23(3):1237-1252. doi: 10.1007/s00784-018-2550-7. Epub 2018 Jul 7. PMID: 29982967.

14. Darvell BW, Wu RCT. MTA an hydraulic silicate cement: review update and setting reaction. Dent Mater. 2011;27:407-22.

15. de Araújo Lopes JM, Benetti F, Rezende GC, Souza MT, Conti LC, Ervolino E, Jacinto RC, Zanotto ED, Cintra LTA. Biocompatibility, induction of mineralization and antimicrobial activity of experimental intracanal pastes based on glass and glass-ceramic materials. Int Endod J. 2020 Nov;53(11):1494-1505.

16. de Souza Araújo IJ, Ferreira JA, Daghrery A, Ribeiro JS, Castilho M, Puppin-Rontani RM, Bottino MC. Self-assembling peptide-laden electrospun scaffolds for guided mineralized tissue regeneration. Dent Mater. 2022 Nov;38(11):1749-1762. doi: 10.1016/j.dental.2022.09.011. Epub 2022 Sep 28. PMID: 36180310; PMCID: PMC9881689.

17. de Oliveira PHC, Gomes Filho JE, Rodrigues MJDS, da Silva CC, Cardoso CDBM, Cosme daSilva L, Ervolino E, Cintra LTA. Influence of supplement administration of omega-3 on the subcutaneous tissue response of endodontic sealers in Wistar rats. Int Endod J. 2022 Oct;55(10):10261041. doi: 10.1111/iej.13795. Epub 2022 Jul 16. PMID: 35791796.

18. de Paula KDS, Dos Reis-Prado AH, de Jesus WP, Goto J, de Arantes LC, Verçosa M, Cintra LTA, Ervolino E, Szawka RE, Crovace MC, de Mesquita RA, Benetti F. Final irrigation with bioglass solution in regenerative endodontic procedure induces tissue formation inside the root canals, collagen maturation, proliferation cell and presence of osteocalcin. Int Endod J. 2024 Feb 7. doi: 10.1111/iej.14033. Epub ahead of print. PMID: 38323923.

19. Diegelmann, R.F. & Evans, M.C. (2004) Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library, 9, 283– 289. https://doi.org/10.2741/1184.

20. Duarte, M. A. H., Marciano, M. A., Vivan, R. R., Tanomaru Filho, M., Tanomaru, J. M. G., & Camilleri, J.. (2018). Tricalcium silicate-based cements: properties and modifications. Brazilian Oral Research, 32, e70.
21. Duque JA, Fernandes SL, Bubola JP, Duarte MA, Camilleri J, Marciano MA. The effect of mixing method on tricalcium silicate-based cement. Int Endod J. 2018 Jan;51(1):69-78.
22. Farzaneh M, Abitbol S, Friedman S. Treatment outcome in endodontics: the Toronto study – phases I and II: orthograde retreatment. J Endod. 2004; 30(9):627-633.
23. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PF, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. J Endod 2009, V. 35, P. 25641.Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, Ferreira LL, Massunari L, Bueno CRE, de Oliveira SHP, Gomes-Filho JE. Evaluation of the Cytotoxicity and Biocompatibility of New Resin Epoxy-based Endodontic Sealer Containing Calcium Hydroxide. J Endod. 2017. V. 43, N. 12, P. 2088-2092.
24. Gorustovich AA, Roether JA, Boccaccini AR. Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. Tissue Eng Part B Rev. 2010 Apr;16(2):199-207.
25. Haapasalo M, Parhar M, Huang X, Wei X, Lin J, Shen Y. Clinical use of bioceramic materials. Endod Top. 2015;32:97–117.
26. Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. Journal of the American Ceramic Society 1991;74 1487-510.
27. Hench LL. The story of Bioglass. Journal of materials science Materials in medicine 2006;17:967-78.
28. Hidalgo Pitaluga L, Trevelin Souza M, Dutra Zanotto E, Santocildes Romero ME, Hatton PV. Electrospun F18 Bioactive Glass/PCL-Poly (ε-caprolactone)Membrane for Guided Tissue Regeneration. Materials (Basel). 2018 Mar 8;11(3):400.
29. https://revistapesquisa.fapesp.br/implante-com-biovidro/ edição 241, 2016.
30. Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland

30.iji T, Yoshiba K. Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. Int J Dent. 2009;2009:464280.

31. Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and portland cement. J Endod. 2006 Mar;32(3):193-7.

32. Jantarat J, Dashper SG, Messer HH. Sealing ability of furcation perforation repair. Aust Endod J. 1998 Dec;24(3):109-10. doi: 10.1111/j.17474477.1998.tb00031.x. PMID: 11431824.

33. Jones JR. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. Acta biomaterialia 2013;9:4457-86.

34. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Junqueira MA, Cunha NNO, Caixeta FF, Marques CT, Oliveira TM, Moretti ABS, Cosme-Silva L, Sakai VT. Clinical, radiographic and histological evaluation of primary teeth pulpotomy using MTA and Ferric sulfate. Braz Dent J 2018;29(2):159-165

35. Keshaw H, Forbes A, Day RM. Release of angiogenic growth factors from cells encapsulated in alginate beads with bioactive glass. Biomaterials. 2005 Jul;26(19):4171-9.

36. Koç C, Aslan B, Ulusoy Z, Oruçoğlu H. Sealing ability of three different materials to repair furcation perforations using computerized fluid filtration method. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2021 Summer;15(3):183187. doi: 10.34172/joddd.2021.031. Epub 2021 Aug 25. PMID: 34712409; PMCID: PMC8538151

37. Lagisetti AK, Hegde P, Hegde MN. Evaluation of bioceramics and zirconiareinforced glass ionomer cement in repair of furcation perforations: An in vitro study. J Conserv Dent. 2018 Mar-Apr;21(2):184-189.

38. Leonardo RT; Leonardo MR. Aspectos atuais do tratamento da infecção endodôntica. Revista da Associacao Paulista de Cirurgioes Dentistas, 2012; 66(3), 80-174.

39. Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RF, Guimarães BM, Duarte MA. Assessment of color stability of white mineral trioxide aggregate angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. J Endod. 2014 Aug;40(8):1235-40.

45. Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. Clin Oral Investig. 2015 Dec;19(9):2201-9.

46. Marin CP, Santana GL, Robinson M, Willerth SM, Crovace MC, Zanotto ED. Effect of bioactive Biosilicate® /F18 glass scaffolds on osteogenic differentiation of human adipose stem cells. J Biomed Mater Res A. 2021 Aug;109(8):12931308.

47. McKee MD, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distri-bution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. Microsc Res Tech. 1996;33:141-16

48. Medina-Fernandez I,Celiz AD. Acellular biomaterial strategies for endodontic regeneration. Biomater Sci. 2019 Jan 29;7(2):506519.doi: 10.1039/c8bm01296b. PMID: 30569918.

49. Mente J, Leo M, Panagidis D, Saure D, Pfefferle T. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate: repair of root perforation – long-term results. J Endod. 2014; 40(6): 791-796.

50. Oishi JC, Souza MT, Martinelli A, Buzinari TC, Zanotto ED, Rodrigues GJ. Influence of a melt derived bioactive glass (F18) over endothelial cells nitric oxide production. Material Letters 2019;X3 100022

51. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. J Nippon Med Sch. 2010 Feb;77(1):4-

12. doi: 10.1272/jnms.77.4. PMID: 20154452.

52. Pankajakshan D, Voytik-Harbin SL, Nör JE, Bottino MC. Injectable Highly

Tunable Oligomeric Collagen Matrices for Dental Tissue Regeneration. ACS Appl Bio Mater. 2020 Feb 17;3(2):859-868. doi: 10.1021/acsabm.9b00944. Epub 2020 Jan 6. PMID: 32734173; PMCID: PMC7391263.

53. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. Int Endod J. 2018 Feb;51(2):177-205.

54. Plotino G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. Ultrasonics in endodontics: a review of the literature. J Endod. 2007 Feb;33(2):81-95.
55. Rahimi S, Ghasemi N, Shahi S, Lotfi M, Froughreyhani M, Milani AS, Bahari M. Effect of blood contamination on the retention characteristics of two endodontic biomaterials in simulated furcation perforations. J Endod. 2013 May;39(5):697-700.
56. Reis BO, Prakki A, Stavroullakis AT, Souza MT, Siqueira RL, Zanotto ED, Briso ALF, Tavares Ângelo Cintra L, Henrique Dos Santos P. Analysis of permeability and biological properties of dentin treated with experimental bioactive glasses. J Dent. 2021 Aug;111:103719.
57. Santos, Verônica Ribeiro e Moreira Bastos Campos, Tiago e Anselmi, Caroline e Thim, Gilmar Patrocínio e Bottino, Marco Cícero e Borges, Alexandre Luiz Souto e de Sousa Trichês, Eliandra, Efeito dos Íons Co, Cu e Zn na Bioatividade, e propriedades antibacterianas de um vidro bioativo de borato. Disponível em SSRN: https://ssrn.com/abstract=4510178 ou http://dx.doi.org/10.2139/ss rn.4510178
58. Silva RAB, Borges ATN, Hernandéz-Gatón P, de Queiroz AM, Arzate H, Romualdo PC, Nelson-Filho P, Silva LAB. Histopathological, histoenzymological, immunohistochemical and immunofluorescence analysis of tissue response to sealing materials after furcation perforation. Int Endod J. 2019 Oct;52(10):1489-1500.
59. Singh P, Paul J, Al-Khuraif AA, Vellappally S, Halawany HS, Hashim M, Abraham NB, Jacob V, Thavarajah R. Sealing ability of mineral trioxide aggregate, calcium phosphate cement, and glass ionomer cement in the repair of furcation perforations. Acta Medica (Hradec Kralove). 2013;56(3):97-103.
60. Stähli C, James-Bhasin M, Hoppe A, Boccaccini AR, Nazhat SN. Effect of ion release from Cu-doped 45S5 Bioglass® on 3D endothelial cell morphogenesis.Acta Biomater. 2015 Jun;19:15-22.
61. Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T (2007) Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. Journal of Endodontics 33, 836–39.

62. Tawfik HE, Abu-Seida AM, Hashem AA, El-Khawlani MM. Treatment of experimental furcation perforations with mineral trioxide aggregate, platelet rich plasma or platelet rich fibrin in dogs' teeth. Exp Toxicol Pathol. 2016 Jun;68(6):321-7. doi: 10.1016/j.etp.2016.03.004. Epub 2016 Mar 28. PMID: 27033179.
63. Weldon JK Jr, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough WF. Sealing ability of mineral trioxide aggregate and super-EBA when used as furcation repair materials: a longitudinal study. J Endod. 2002 Jun;28(6):467-70.
64. Weldon JK Jr, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough WF. Sealing ability of mineral trioxide aggregate and super-EBA when used as furcation repair materials: a longitudinal study. J Endod. 2002 Jun;28(6):467-70.
65. Zairi A, Lambrianidis T, Pantelidou O, Papadimitriou S, Tziafas D (2012) Periradicular tissue responses to biologically active molecules or MTA when applied in furcal perforation of dogs’ teeth. International Journal of Dentistry 2012, 257832.