



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



Tiago Silva da Fonseca

Reação do periodonto e parâmetros bioquímicos sistêmicos em resposta ao selamento de perfurações de furca de molares de ratos com Biodentine e MTA

Araraquara

2018



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



Tiago Silva da Fonseca

Reação do periodonto e parâmetros bioquímicos sistêmicos em resposta ao selamento de perfurações de furca de molares de ratos com Biodentine e MTA

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

Orientador: Paulo Sérgio Cerri

Araraquara

2018

Fonseca, Tiago Silva da

Reação do periodonto e parâmetros bioquímicos sistêmicos em resposta ao selamento de perfurações de furca de molares de ratos com Biodentine e MTA / Tiago Silva da Fonseca. – Araraquara: [s.n.], 2018

87 f. ; 30 cm

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

1. Endodontia 2. Doença iatrogênica 3. Teste de materiais
4. Periodonto 5. Análise química do sangue I. Título

Tiago Silva da Fonseca

Reação do periodonto e parâmetros bioquímicos sistêmicos em resposta ao selamento de perfurações de furca de molares de ratos com Biodentine e MTA

Comissão julgadora

Tese para obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

2ª examinadora: Prof.^a Dr.^a Naiana Viana Viola Nícoli

3º examinador: Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte

4ª examinadora: Prof.^a Dr.^a Ticiane Sidorenko de Oliveira Capote

5º examinador: Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

Araraquara, 28 de março de 2018.

DADOS CURRICULARES

Tiago Silva da Fonseca

Nascido a 31 de agosto de 1988 em Manaus – Amazonas

Filiação: José Anísio Vasconcelos da Fonseca
Ana Lucia da Silva Fonseca

2005/2010 Graduação em Odontologia
Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus

2010/2012 Especialização em Endodontia
Universidade Paulista – UNIP, Manaus

2012/2014 Mestrado em Odontologia, Área de Endodontia
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, Araraquara

2014/2018 Doutorado em Odontologia, Área de Endodontia
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, Araraquara



Este trabalho foi desenvolvido com o apoio do Governo do Estado do Amazonas por meio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, com a concessão de bolsa de estudo.

Dedicado aos meus pais, **José Anísio Vasconcelos da Fonseca** e **Ana Lucia da Silva Fonseca**, sem os quais eu nada seria. Sou grato por todo o apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Às minhas avós **Maria de Lourdes Vale e Silva** e **Júlia Vasconcelos da Fonseca** (*in memoriam*), as quais possuem papel fundamental no meu desenvolvimento.

Às minhas irmãs **Rosana Vale da Silva** e **Michelle Bianca Vasconcelos da Fonseca** por todo o carinho fraternal e por sempre torcerem por mim.

Aos meus sobrinhos **Vinicius Vale Uchoa de Paula** e **Rafael Vale Uchoa**, tesouros tão importantes em minha vida.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, pela confiança em mim depositada, pela amizade firmada no decorrer dos meus seis anos em Araraquara e por ter conduzido meus passos no decorrer da Pós-Graduação e na Histologia. Seus ensinamentos sempre nortearão minha vida profissional como docente e pesquisador.

À **Prof.^a Dr.^a Estela Sasso Cerri**, pela amizade estabelecida no decorrer da Pós-Graduação e por seu conhecimento compartilhado de Biologia e Histologia.

Ao **Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva**, por ter se mostrado um amigo acolhedor desde os primeiros momentos e pela colaboração na execução deste trabalho.

Aos professores da FOAr/UNESP da disciplina de Endodontia **Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho**, **Prof.^a Dr.^a Juliane Maria Guerreiro Tanomaru**, **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**, **Prof. Dr. Fabio Luiz Camargo Vilella Berbert** e **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho** e da disciplina de Urgência em Odontologia **Prof.^a Dr.^a Gisele Faria** e **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga**, pela acolhida neste grupo de relevância internacional, pela boa convivência no Departamento e pela oportunidade de expandir os conhecimentos sobre Endodontia.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini**, pela valorização imprescindível da pesquisa no panorama brasileiro.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara**, na pessoa da Diretora **Prof.^a Dr.^a Elaine Maria Sgavioli Massucato**, pela infraestrutura desta instituição grandiosa em seu contexto histórico.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, FOAr/UNESP, na pessoa do Coordenador **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**, pela oportunidade de se obter uma formação acadêmica de excelência.

Aos técnicos do Laboratório de Histologia e Embriologia **Pedro Sérgio Simões** e **Luis Antonio Potenza**, pela valorosa habilidade técnica, pelos ensinamentos laboratoriais e por toda a colaboração na execução deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. André Augusto Franco Marques**, meu primeiro orientador, grande amigo responsável por guiar meus primeiros passos na Endodontia durante a Graduação e pelo incentivo ao ter notado em mim potencial para a vida acadêmica.

Ao grande amigo **Vinícius de Paiva Gonçalves**, por todos os ótimos momentos desde os primeiros dias em Araraquara, pelo ombro amigo, pelas viagens, pelo apoio e companheirismo em todos os momentos. Fui acolhido por sua família de um modo muito especial. Sentirei falta destes nossos seis anos de convívio diário, mas tenho a certeza de que nossa amizade ainda será bastante longa. Torço pelo seu sucesso e sempre estarei na primeira fila aplaudindo seus êxitos. Conte sempre comigo.

À grande amiga **Lauriê Garcia Belizário**, alguém muito especial que traduz para mim o significado da palavra sintonia. Sou muito grato por nossa amizade, por todos os ótimos momentos que tivemos diariamente em Araraquara, todas as viagens, nosso apoio mútuo e nosso companheirismo. Sua família é muito querida e todos são muito especiais para mim. Também torço pelo seu sucesso e estarei sempre ao seu lado.

Aos amigos **Adriana Alicia Cabrera Ortega**, **Patricia Milagros Maquera Huacho**, **Gabriela Oliveira Teixeira**, **Cristiane Lopes Zordan Bronzel**, **João Luiz Bronzel**

Junior, Fábio Regis Garcia, Camila de Foggi e aos também conterrâneos **Mariana Mena Barreto Pivoto João, Gabriel Pivoto João, Luis Carlos Leal Santana** e **Hércules Bezerra Dias**, por terem feito os dias em Araraquara mais divertidos.

Aos colegas da Turma de Doutorado em Endodontia **Adinael Trindade Junior** (*in memoriam*), **Ana Carolina Venção, Camila Galletti Espir Passador, Kátia Cristina Keine** e **Miriam Graziele Magro**, e a todos os demais colegas da Pós-Graduação em Endodontia, pela convivência e mútua contribuição sempre que necessário.

Aos colegas do Laboratório de Histologia e Embriologia **Fabiane de Santi, Karina Borges Salomão, Mateus Machado Delfino, Roberto Almela Hoshino, Juliana Alcarás Saraiva, José Paulo de Pizzol Junior** e **Flávia Luciana Beltrame**, por todos os bons momentos, pela agradável convivência e pela prestatividade recíproca.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas**, FAPEAM, pela concessão de auxílio financeiro em forma de bolsa de estudo.

A todos que contribuíram para que eu me sentisse em casa em Araraquara nestes seis anos de Mestrado e Doutorado.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desta tese.

“Foi quando [Alice] se surpreendeu, ao ver o Gato Inglês sentado num galho de árvore a pouca distância dali. O Gato apenas sorriu quando viu Alice.

[...]

– Você poderia me dizer, por gentileza, como é que eu faço para sair daqui?

– Isso depende muito de para onde você pretende ir – disse o Gato.

– Para mim tanto faz para onde quer que seja... – respondeu Alice.

– Então, pouco importa o caminho que você tome – disse o Gato.

– ... contanto que eu chegue em algum lugar... – acrescentou Alice, explicando-se melhor.

– Ah, então certamente você chegará lá se continuar andando bastante... – respondeu o Gato.”

Fonseca TS. Reação do periodonto e parâmetros bioquímicos sistêmicos em resposta ao selamento de perfurações de furca de molares de ratos com Biodentine e MTA [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Biodentine é um cimento reparador à base de silicato tricálcico com indicações semelhantes ao MTA. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta do periodonto ao selamento de perfurações de furca em molares de ratos com Biodentine ou MTA e as possíveis alterações séricas em marcadores de atividade hepática e renal. As perfurações realizadas nos primeiros molares da maxila direita de 60 ratos foram preenchidas com Biodentine, MTA ou algodão (Sham). As maxilas contralaterais do grupo Sham foram utilizadas como grupo Controle. Após 7, 15, 30 e 60 dias, o sangue foi coletado e as maxilas foram fixadas e incluídas em parafina (n=5). A partir do soro foram mensurados os níveis de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), ureia e creatinina. O sangue de 5 animais sem qualquer procedimento foi coletado para mensurar os padrões sorológicos de referência. O espaço periodontal (EP), densidade de volume de células inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (VvFb) e o número de osteoclastos TRAP-positivos foram obtidos. Interleucina-6 (IL-6) e osterix foram detectados por imuno-histoquímica. O conteúdo de colágeno birrefringente foi quantificado a partir de cortes corados com picosírius. Os dados foram submetidos à ANOVA e ao teste Tukey ($p \leq 0,05$). Diferenças significantes nos níveis séricos de TGO ($p \geq 0,1258$) e TGP ($p \geq 0,5827$) não foram detectadas nos grupos Biodentine, MTA e Sham em comparação aos níveis de referência. Aos 7 dias, a concentração de ureia sérica foi significativamente maior nos grupos Biodentine e MTA em comparação aos níveis de referência ($p = 0,0166$). Um nível mais alto de creatinina sérica no grupo Biodentine aos 60 dias foi detectado em comparação aos valores de referência ($p = 0,0222$). Aos 7 dias, os altos valores de VvCI, células IL-6-positivas e número de osteoclastos foram acompanhados por reduzido conteúdo de colágeno no EP alargado dos grupos experimentais. Em todos os períodos, VvCI, número de osteoclastos e de células IL-6-positivas e EP foram significativamente maiores em Sham que nos grupos Biodentine e MTA ($p < 0,0001$). Do 7º ao 60º dia, significativa redução de VvCI, expressão de IL-6 e osteoclastos foi acompanhada por significativo aumento de VvFb, osteoblastos e conteúdo de colágeno nos grupos Biodentine e MTA. Aos 60 dias, diferenças significantes em VvCI, espessura do LP, imunoexpressão de IL-6 e número de osteoclastos e osteoblastos não foram detectadas entre Biodentine e MTA ($p \geq 0,3255$). Aos 30 e 60 dias, o número de osteoblastos osterix-positivos foi significativamente mais alto nos grupos Biodentine e MTA que no grupo controle ($p < 0,0001$) enquanto diferenças significantes no número de osteoclastos não foram observadas ($p \geq 0,8933$). A análise bioquímica sugere que Biodentine e MTA não induzem mudanças hepáticas no decorrer do tempo. No entanto, é possível que mudanças renais sejam promovidas por Biodentine. Apesar da reação inflamatória e reabsorção óssea iniciais, o selamento de perfurações de furca com Biodentine e MTA promovem condições para o reparo periodontal.

Palavras-chave: Endodontia. Doença iatrogênica. Teste de materiais. Periodonto. Análise química do sangue.

Fonseca TS. Periodontal reaction and systemic biochemical parameters in response to sealing of furcation perforations in rat molars with Biodentine and MTA [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

Biodentine is a calcium silicate-based cement with similar indications of MTA. The aim of this study was to evaluate the periodontium response in the sealing of furcation perforations in rat molars with Biodentine and MTA, and its potential systemic effects in serum levels of hepatic and renal functions. The pulp chamber floor of right upper first molars of 60 rats were perforated and filled with Biodentine, MTA or sterile cotton pellet (Sham); the left first molars were used as control. After 7, 15, 30 and 60 days, the blood was collected and serum glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT), creatinine and urea levels were measured. The blood of 5 rats without any treatment was collected to measure serum reference levels. The maxillary fragments were fixed and processed for paraffin-embedding. The periodontal space (PS), volume density of inflammatory cells (VvIC) and of fibroblasts (VvFb), and number of TRAP-positive osteoclasts were obtained. Interleukin-6 (IL-6), a pro-inflammatory cytokine, and osterix, an osteoblast marker, were detected by immunohistochemistry. The birefringent collagen content was quantified from picosirius-stained sections. Data were submitted to ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). Significant differences in GOT ($p \geq 0.1258$) and GPT ($p \geq 0.5827$) serum levels were not observed in the Biodentine, MTA and Sham groups in comparison with reference levels. At 7 days, the concentration of serum urea increased significantly in the Biodentine and MTA groups compared with reference levels ($p = 0.0166$). A higher concentration of serum creatinine in Biodentine group than reference level ($p = 0.0222$) was detected at 60 days. At 7 days, the high values in VvIC, IL-6-immunolabelled cells and number of osteoclasts were accompanied by reduced collagen content in the enlarged PS of experimental groups. In all periods, VvIC, number of osteoclasts and IL-6, and PS were significantly higher in Sham than Biodentine and MTA groups ($p < 0.0001$). From 7 to 60 days, significant reduction in VvIC, IL-6 immunoexpression and osteoclasts was accompanied by significant increase in VvFb, osteoblasts and collagen content in Biodentine and MTA groups. At 60 days, significant differences in VvIC, width of PS, IL-6 immunoexpression, in the number of osteoclasts and osteoblasts were not found between Biodentine and MTA ($p \geq 0.3255$). At 30 and 60 days, the number of osterix-immunolabelled osteoblasts was significantly higher in Biodentine and MTA than control group ($p < 0.0001$) while significant differences in the number of osteoclasts were not observed ($p \geq 0.8933$). The biochemical analyses suggest that Biodentine and MTA did not induce changes in the liver over time. However, it is possible that kidney changes may be promoted by Biodentine. Despite the initial inflammatory reaction and bone resorption, the sealing of furcation perforations with Biodentine or MTA provide conditions to the periodontium repair.

Keywords: Endodontics. Iatrogenic disease. Materials testing. Periodontium. Blood chemical analysis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	PROPOSIÇÃO	16
3	REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1	Mineral Trióxido Agregado	17
3.2	Biodentine	18
3.3	Biocompatibilidade	19
3.4	Reações Sistêmicas	20
4	MATERIAL E MÉTODO	23
4.1	Animais	23
4.2	Procedimentos Experimentais	24
4.3	Processamento do Sangue	27
4.3.1	Análise bioquímica	27
4.4	Processamento Histológico	29
4.5	Métodos de Análise dos Resultados	30
4.5.1	Análise morfológica do periodonto subjacente às perfurações	30
4.5.2	Espaço periodontal	30
4.5.3	Densidade de volume de células inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (vvFb)	32
4.5.4	Reação imuno-histoquímica para IL-6	32
4.5.5	Número de osteoclastos TRAP-positivos na superfície óssea	33
4.5.6	Reação imuno-histoquímica para osterix	34
4.5.7	Mensuração de colágeno birrefringente	35
4.6	Análise Estatística	36
5	RESULTADOS	37
5.1	Análise Bioquímica	37

5.2	Descrição Morfológica da Região de Furca	41
5.3	Mensuração do Espaço Periodontal	46
5.4	Densidade de Volume de Células Inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (VvFb)	47
5.5	Detecção Imuno-Histoquímica de IL-6	49
5.6	Osteoclastos TRAP-Positivos na Superfície Óssea	51
5.7	Número de Células Imunopositivas ao Osterix na Superfície Óssea	53
5.8	Conteúdo de Colágeno Birrefringente	56
6	DISCUSSÃO	59
7	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXO A – Submissão do protocolo de pesquisa à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	87

1 INTRODUÇÃO

Perfurações endodônticas são comunicações artificiais entre a câmara pulpar e/ou canais radiculares e o ligamento periodontal resultantes de aberturas acidentalmente criadas na dentina. Estes defeitos podem ser ocasionados tanto por iatrogenia quanto por lesão cariosa e estão entre as mais comuns complicações relacionadas ao tratamento endodôntico^{2,3}. Este acidente pode ser prevenido com a adoção de princípios básicos inerentes à abertura coronária, como a completa remoção de teto da câmara pulpar, adequada limpeza com remoção de restaurações e de tecido cariado e modelagem com fresas em sentido coronário sem realizar movimentos bruscos em direção apical.

Uma vez não tratadas adequadamente, estas falhas podem resultar em baixo prognóstico e subsequente perda do elemento dentário^{4,5}. O prognóstico para dentes perfurados é determinado pela localização da perfuração, o tempo decorrido desde o acidente até o tratamento, a capacidade de se obter selamento da perfuração e a acessibilidade dos canais radiculares remanescentes para a finalização do tratamento endodôntico. Quanto mais próxima a perfuração estiver do sulco gengival, principalmente no terço cervical radicular ou na região de furca, maior a probabilidade de migração apical do epitélio gengival iniciando uma lesão periodontal⁶. O potencial de reparo é drasticamente reduzido em dentes com presença de contaminação no sítio das perfurações⁷.

Quando ocorre perfuração do soalho da câmara pulpar atingindo o processo alveolar, o ligamento periodontal e o tecido ósseo são destruídos em intensidade variada, dependendo da extensão da comunicação, instalando-se um processo inflamatório nos tecidos^{2,3,8}. O tecido periodontal inflamado pode invaginar para o interior da câmara pulpar a partir da trajetória da perfuração e formar um pólipos com pedículo aderido ao ligamento periodontal^{2,8-10}. A ausência de tratamento desta perfuração permite a contaminação via meio bucal, determinando a progressão do processo inflamatório, o qual leva a uma maior destruição óssea do processo alveolar^{2,5,9-11}, além de possivelmente levar à perda do dente^{5,12}.

Cimentos reparadores à base de silicato de cálcio têm sido considerados os biomateriais de escolha para o selamento de defeitos dentinários com comunicações entre a cavidade pulpar e o ligamento periodontal¹²⁻¹⁹. O exemplo mais conhecido, utilizado e estudado desta categoria de materiais é o mineral trióxido agregado

(MTA), pioneiramente proposto para o selamento de perfurações radiculares laterais²⁰. Outros materiais à base de silicato de cálcio também têm sido propostos, como o Biodentine (Septodont® Inc., Saint Maur des Fossés, Île-de-France, França). Para avaliar a resposta do ligamento periodontal após o selamento de perfurações de furca, este procedimento pode ser realizado em molares de ratos¹⁵. É necessário compreender a composição e os efeitos induzidos por estes materiais quando aplicados para a resolução desta complicação do tratamento endodôntico.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a reação tecidual causada pelo Biodentine e MTA no selamento de perfurações do soalho da câmara pulpar de molares de ratos. Além disso, foi nosso objetivo avaliar se o Biodentine e o MTA causam alterações sistêmicas.

Os objetivos específicos foram avaliar:

- Se estes cimentos induzem alterações sistêmicas em marcadores séricos das funções hepática e renal;
- Os danos aos tecidos periodontais subjacentes às cavidades seladas com Biodentine e MTA;
- A interferência do Biodentine e MTA na instalação e evolução do processo inflamatório provocado pelas perfurações na região de furca;
- Se estes materiais interferem no processo de reabsorção óssea do processo alveolar inter-radicular subjacente às perfurações;
- Se estes materiais apresentam atividade osteogênica quando aplicados no selamento de perfurações.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mineral Trióxido Agregado

O MTA Angelus Branco (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil) é um pó branco constituído de partículas hidrofílicas, composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, dióxido de silício, óxido de alumínio e, como radiopacificador, óxido de bismuto^{21,22}. Por suas adequadas propriedades biológicas^{15,16,23-28}, baixa citotoxicidade^{29,30} e boas propriedades físicas, químicas e mecânicas³¹, o MTA tem sido o material mais indicado para diferentes situações clínicas^{14,32,33}, incluindo capeamento pulpar^{14,33-38}, pulpotomia^{14,33,35,39,40}, apicificação^{14,33,41}, retrobturação em cirurgias parendodônticas^{14,33,42} e selamento de comunicações entre a cavidade pulpar e os tecidos periodontais tais como reabsorções internas e externas e perfurações radiculares e de furca^{7,14-16,20,33}.

Quando o MTA é hidratado, as partículas de silicato de cálcio se convertem em um gel coloidal o qual se cristaliza, resultando em sua oportuna e desejável capacidade seladora^{43,44}. O cálcio liberado durante a reação de hidratação do silicato de cálcio precipita-se como hidróxido de cálcio, o qual forma hidroxiapatita na superfície do material ao reagir com fluidos tissulares⁴⁴ e proporciona um pH alcalino ao MTA, de aproximadamente 10,34 após 24 horas e 9,69 após 28 dias de presa⁴⁵. Partículas birrefringentes sob luz polarizada ficam dispersas pelo tecido quando este material é implantado no subcutâneo de ratos^{46,47}; é sugerido que estas granulações seriam cristais de calcita formados a partir da reação do cálcio derivado do hidróxido de cálcio com o gás carbônico e os íons fosfato tissulares^{23,46,48}. Assim, a bioatividade do MTA é atribuída à formação de cristais de apatita quando em contato com soluções fisiológicas^{23,49-51}.

Ao entrar em contato com tecidos, o MTA induz o recrutamento de células inflamatórias a partir dos vasos sanguíneos, levando inicialmente a um processo inflamatório moderado nos tecidos adjacentes^{24,26-28,45,52,53} e estimulando também a produção e secreção de citocinas moduladoras da inflamação⁵⁴. Uma gradativa redução no número de células inflamatórias em resposta ao MTA ocorre no decorrer do tempo^{15,26-28,45}, indicando a compatibilidade biológica deste cimento reparador. O MTA possivelmente interfere na homeostase tecidual ao inibir ou induzir a secreção

de citocinas pelas células do tecido conjuntivo quando em contato com estes tecidos. Assim, a interação hospedeiro-material envolve mecanismos moleculares e constitui possíveis vias fundamentais à resposta biológica, tanto na reação inflamatória quanto no processo de reparo tecidual.

Apesar de suas vantagens, o MTA apresenta longo tempo de presa^{55,56} e é de difícil manuseio por possuir consistência arenosa, a qual dificulta a inserção e a condensação no local adequado^{32,33}; pode, ainda, alterar a cor da estrutura dentária^{57,58}. Além disso, o óxido de bismuto, radiopacificador utilizado neste material, pode ocasionar uma redução da resistência de compressão e aumento da porosidade do material^{59,60}; também já foi reportado que o óxido de bismuto inibe a proliferação celular⁶¹. Assim, outros radiopacificadores têm sido estudados em substituição ao óxido de bismuto, como o óxido de zircônio^{26,52,62-64}. Considerando as boas propriedades dos cimentos à base de silicato de cálcio e em busca de contornar as adversidades inerentes ao MTA, diversos materiais alternativos têm sido propostos.

3.2 Biodentine

Biodentine (Septodont[®] Inc., Saint Maur des Fossés, Île-de-France, França) é um cimento à base de silicato de cálcio considerado um substituto dentinário bioativo^{17,65-69} com propriedades mecânicas semelhantes à dentina⁶⁷ e que pode ser utilizado tanto na coroa quanto na raiz dentária, com indicações semelhantes às do MTA^{17,49,50,65,70}. Comercialmente, este cimento é disponibilizado na forma pó-líquido. Seu pó é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de cálcio, óxido de ferro, carbonato de cálcio e, como agente radiopacificador, óxido de zircônio, enquanto o líquido é uma solução aquosa com cloreto de cálcio e policarboxilato, o qual atua como surfactante^{17,22,50,68,71}. O principal constituinte é o silicato tricálcico, manufaturado pelo fabricante com a tecnologia de silicato bioativo (Active Biosilicate Technology[™], no original em inglês), garantindo alto grau de pureza do material^{68,72}. O carbonato de cálcio adicionado ao pó aumenta a disponibilidade de cálcio do material^{17,71}. O policarboxilato presente no líquido é um polímero hidrossolúvel surfactante o qual reduz a quantidade de água necessária, além de possibilitar uma mistura mais homogênea^{17,68,73}.

Biodentine possui indicações tanto em Dentística quanto em Endodontia, ou

seja, pode ser utilizado para restaurações temporárias em esmalte e definitivas em dentina^{17,65,74,75}, forramento de cavidades profundas^{17,65,76}, restaurações cervicais e radiculares^{17,75,76}, capeamento pulpar direto e pulpotomia^{17,35,36,38,39,77}, apicificação^{68,73,78}, obturação retrógrada em cirurgias pararendodônticas^{17,22,79,80} e selamento de comunicações entre a cavidade pulpar e o ligamento periodontal, como reabsorções internas e externas e perfurações radiculares e de furca^{17,19,81,82}. A consistência cremosa¹⁷ deste cimento permite uma utilização clínica mais simplificada quando comparada ao aspecto arenoso do MTA.

Biodentine tem demonstrado adequada resposta biológica in vivo, comparável ao MTA. Apesar de induzir moderada reação inflamatória quando inicialmente em contato com tecido subcutâneo de ratos, Biodentine apresenta significativa redução desta resposta a longo prazo de modo semelhante ao MTA^{27,83}. Quando inserido em cavidades confeccionadas em tíbias de coelhos, Biodentine apresentou atividade osteoindutora e mineralizadora, com neoformação óssea após 30 dias⁸⁴. Em tecido pulpar, Biodentine induz proliferação celular e expressão de sialoproteína dentinária e osteopontina³⁶. Além disso, estimula a formação de barreira de tecido mineralizado no tecido pulpar após capeamento pulpar direto^{35,85-87} e pulpotomia^{35,39,85}. Estudos in vitro também reportaram biocompatibilidade de Biodentine com osteoblastos⁸⁸⁻⁹⁰ e fibroblastos do ligamento periodontal^{91,92}. Estudos clínicos também confirmam que este cimento é capaz de induzir a formação de barreira de tecido mineralizado em dentes humanos^{38,93}.

Não há, atualmente, um material com todas as características desejadas para o tratamento de comunicações entre a cavidade pulpar e o periodonto adjacente. Assim, busca-se um biomaterial que promova um ambiente favorável ao processo de reparo tanto do tecido conjuntivo quanto do tecido ósseo, ao modular o curso da resposta inflamatória e estimular a liberação de fatores de crescimento, favorecendo, como resultado, o reparo tecidual. Para tanto, é fundamental que o biomaterial seja biocompatível^{94,95}.

3.3 Biocompatibilidade

A biocompatibilidade é a habilidade de um biomaterial exercer suas funções de acordo com a terapia proposta para sua utilização sem gerar efeitos danosos aos tecidos hospedeiros e, ao mesmo tempo, estimular uma resposta celular e tecidual

que permita a restituição estrutural e funcional dos tecidos ou sua reparação⁹⁴, sendo, portanto, considerada um dos requisitos fundamentais na avaliação de um material endodôntico^{96,97}. Um biomaterial a ser aplicado em situações clínicas não deve apenas ser inofensivo ao hospedeiro, como também deve, preferencialmente, induzir uma resposta minimamente favorável à situação clínica para a qual foi planejado⁹⁴. Materiais biologicamente incompatíveis podem induzir injúrias químicas aos tecidos, levando ao retardo do potencial de reparo destas áreas, além de intensificar o processo inflamatório previamente instalado, como lesões dos tecidos perirradiculares, prejudicando os índices de sucesso do tratamento⁹⁷. Há três níveis de testes para avaliação de compatibilidade biológica de materiais odontológicos⁹⁷: os testes primários, com análise *in vitro*, como o teste de citotoxicidade; os testes secundários, de avaliação *in vivo*, como implantação óssea ou subcutânea; e os testes de aplicação clínica, onde são utilizados modelos animais para simulação de aplicação dos materiais segundo as recomendações de uso clínico.

Quando utilizados para o selamento de perfurações radiculares ou de furca, os cimentos reparadores permanecem em contato com o tecido conjuntivo do ligamento periodontal por período indeterminado, ou seja, pelo tempo em que o dente for mantido em função na cavidade bucal. Para compreender os mecanismos que conduzem o processo de biocompatibilidade, é importante analisar as propriedades físicas, químicas e biológicas da interface de contato entre o biomaterial implantado e os tecidos do hospedeiro^{16,32,94,98-100}. Deste modo, a análise dos tecidos periodontais adjacentes a perfurações de furca é primordial para compreender a reposta biológica dos cimentos reparadores e também seus possíveis efeitos induzidos durante o selamento, assim como as consequências da ausência de tratamento deste acidente endodôntico. Além disso, devido ao contato destes materiais com o sangue, é importante observar também se os cimentos induzem ou não efeitos adversos em nível sistêmico¹⁰¹⁻¹⁰⁵.

3.4 Reações sistêmicas

O fígado está envolvido em diversas funções do corpo e é o principal local para biotransformação e remoção de macromoléculas da corrente sanguínea¹⁰⁶, feita através do sistema reticuloendotelial hepático, o qual é composto por capilares sinusoides e macrófagos conhecidos como células de Kupffer¹⁰⁷. As células de

Kupffer liberam citocinas como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF- α), fator de crescimento transformante β (TGF- β) e interferon γ (IFN- γ) e sua principal função é remover partículas advindas pelo sistema porta hepático¹⁰⁸. A resposta destas células a patógenos ou xenobióticos pode contribuir com lesões hepáticas por levar a danos aos hepatócitos^{106,107,109}. Ensaio pré-clínicos de toxicidade hepática devem incluir biomarcadores mensuráveis a partir de amostras obtidas em procedimentos não invasivos, como coleta de sangue¹¹⁰.

Os testes bioquímicos de rotina para assegurar a função hepática incluem a mensuração dos níveis séricos das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP)^{101-103,106,110-113}. A TGO está localizada tanto no citosol quanto nas mitocôndrias, enquanto a TGP está localizada exclusivamente no citosol dos hepatócitos¹¹¹. Danos na membrana celular de hepatócitos levam à liberação de enzimas intracelulares para a corrente sanguínea, elevando os níveis séricos de TGO e TGP¹¹⁴. Ambas são sensíveis indicadores de lesão celular hepática, de modo que são bastante úteis no diagnóstico de alterações hepáticas como hepatites ou hepatotoxicidade^{110,114,115}. No entanto, apesar da alta sensibilidade, ambas as enzimas são inespecíficas^{110,111,114}. Além do fígado, a TGO pode ser encontrada também no coração, músculo esquelético, rins, pâncreas, pulmões, leucócitos e hemácias¹¹¹; a elevação de sua atividade está relacionada à toxicidade hepática, mas também a danos nos músculos cardíaco e esquelético¹¹⁰. A TGP, apesar de ser um biomarcador de lesão hepática com especificidade maior que a TGO¹¹¹, também está presente em menores quantidades nos rins, coração e músculo esquelético¹¹¹ e pode ser um indicador de necrose muscular¹¹⁰. Contudo, estas enzimas continuam a ser ensaios fundamentais na Bioquímica Clínica para a busca por lesões hepáticas^{110-112,114,115}.

Os rins exercem diversas funções excretórias e regulatórias necessárias à manutenção do *status* fisiológico sistêmico. Estes órgãos mantêm a harmonia do meio extracelular, ajustam o equilíbrio hidroeletrólítico, participam na regulação da pressão sanguínea e no metabolismo mineral ósseo¹¹⁶. Os rins são os principais responsáveis pela remoção de detritos metabólicos sistêmicos, como ureia e amônia¹¹⁷. Estes órgãos recebem aproximadamente 25% do débito cardíaco¹¹⁸, contribuindo significativamente para biotransformação de partículas dispersas pela corrente sanguínea. O grande fluxo sanguíneo direcionado aos rins os torna

altamente suscetíveis a danos induzidos por xenobióticos e, subsequentemente, a lesões de células epiteliais tubulares^{117,118}. Danos irreversíveis às células renais levam à redução da taxa de filtração glomerular, comprometendo as funções renais¹¹⁸. Deste modo, a função de filtração para eliminação de substâncias potencialmente nocivas torna os rins alvos importantes na investigação da potencial toxicidade de materiais em contato com a corrente sanguínea¹¹⁷.

Os testes bioquímicos de rotina para assegurar a função renal incluem a mensuração dos níveis séricos de ureia e de creatinina^{101–103,106,113,116,119,120}. A ureia é um composto gerado no fígado a partir do catabolismo proteico e é eliminada quase completamente por via urinária^{116,119}. A creatinina é produzida como resultado da desidratação não enzimática da creatina contida no músculo esquelético^{119,121}; é filtrada nos glomérulos e não é reabsorvida pelos túbulos renais¹¹⁶. A elevação nos níveis de ureia e creatinina no sangue refletem os efeitos do dano celular nas funções renais e são possíveis sinais de nefropatia^{106,118}. Apesar da baixa sensibilidade, a ureia e a creatinina continuam a ser consideradas o padrão ouro no monitoramento da função renal e na detecção de nefrotoxicidade¹²⁰ e sua interpretação deve ser meticulosamente interpretada de acordo com o contexto clínico.

Como o objetivo do selamento de perfurações de furca é o restabelecimento da estrutura dentinária perdida nesta região^{2,3,5,14,19,122}, os cimentos à base de silicato de cálcio permanecem permanentemente em contato com os fluidos teciduais do periodonto durante todo o tempo de sobrevivência do elemento dentário. Alguns materiais podem afetar à distância órgãos vulneráveis com grande aporte sanguíneo, como fígado e rins, potencialmente alterando parâmetros bioquímicos destes órgãos^{101–103,117}. Assim, é fundamental entender se estes materiais induzem alterações tanto em nível local, nos tecidos de suporte do dente, como também em nível sistêmico, como potencial hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

O protocolo experimental desta pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Processo nº 015/2012 - FOAr/UNESP, Anexo A).

Foram utilizados sessenta e cinco ratos Holtzman (*Rattus norvegicus albinus*) machos, adultos jovens, com peso aproximado de 220 gramas. Os animais foram mantidos no Biotério do Subsolo da FOAr/UNESP em gaiolas de polietileno forradas com maravalha, em temperatura controlada (23 ± 2 °C), fotoperíodo de 12 horas e ração (Special Diet RC; Socil Evialis Nutrição Animal Indústria e Comércio Ltda., Descalvado, SP, Brasil) e água *ad libitum*. A cada dois dias, a maravalha foi substituída e tanto as gaiolas quanto os bebedouros foram higienizados.

Foi realizada uma perfuração no soalho da câmara pulpar do primeiro molar superior direito de sessenta animais, os quais foram distribuídos equitativamente em quatro grupos, de acordo com o protocolo adotado para o selamento. Nos grupos Biodentine e MTA, o selamento da comunicação foi efetuado com um destes materiais (Quadro 1), enquanto no grupo Sham uma diminuta bola de algodão esterilizado foi colocada nas perfurações do soalho da câmara pulpar.

A abertura coronária de todos os grupos foi restaurada de modo semelhante. As hemimaxilas contralaterais dos animais do grupo Sham foram utilizadas como controle negativo, constituindo o grupo Controle, onde nenhum procedimento foi efetuado e os molares permaneceram hígidos. Cada grupo foi composto por vinte animais, os quais foram acompanhados pelos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias ($n=5/\text{grupo}/\text{período}$). Cinco animais não foram submetidos a nenhum procedimento experimental e, uma semana após ambientação no biotério, foram sacrificados e tiveram o sangue coletado para constituir os valores de referência dos parâmetros de análise bioquímica.

Quadro 1 – Composição, procedência e proporção dos cimentos utilizados

Material	Pó	Líquido	Pó : líquido
Biodentine™ (Septodont® Inc., Saint Maur des Fossés, Île-de-France, França)	Silicato tricálcico, silicato dicálcico, óxido de cálcio, óxido de ferro, carbonato de cálcio, óxido de zircônio	Água, cloreto de cálcio, policarboxilato	700 mg : 0,18 mL
MTA Angelus Branco (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos Ltda., Londrina, PR, Brasil)	Silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, dióxido de silício, óxido de alumínio, óxido de bismuto	Água destilada	1 g : 0,3 mL

Fonte: Elaboração própria.

Biodentine apresenta-se comercialmente em uma cápsula individual contendo 700 g de um pó esbranquiçado e uma embalagem individual contendo 0,18 mL de uma solução aquosa. Ambos devem ser misturados por trinta segundos em amalgamador para completa homogeneização e obtenção de um cimento com consistência cremosa, adequada para manipulação clínica. O MTA é um pó branco o qual deve ser manipulado com uma espátula metálica flexível em uma placa de vidro na proporção de 1g de pó para 0,3 mL de água destilada⁴⁵, incorporando-se as partes até que se obtenha uma mistura homogênea adequada ao manuseio.

4.2 Procedimentos Experimentais

Os animais foram anestesiados com 80 mg/kg de cloridrato de cetamina a 10% (Dopalen; Ceva Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) associado a 8 mg/kg de cloridrato de xilazina a 2% (Anasedan; Ceva Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) por via intraperitoneal, com seringa e agulha de insulina. Os ratos foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica e tiveram a mandíbula e a maxila fixadas com auxílio de argolas ajustadas aos incisivos (Figura 1A). Um microscópio estereoscópico (Wild M7; Wild Heerbrugg Company, Heerbrugg, St. Gallen, Suíça) foi utilizado para observação do campo operatório.

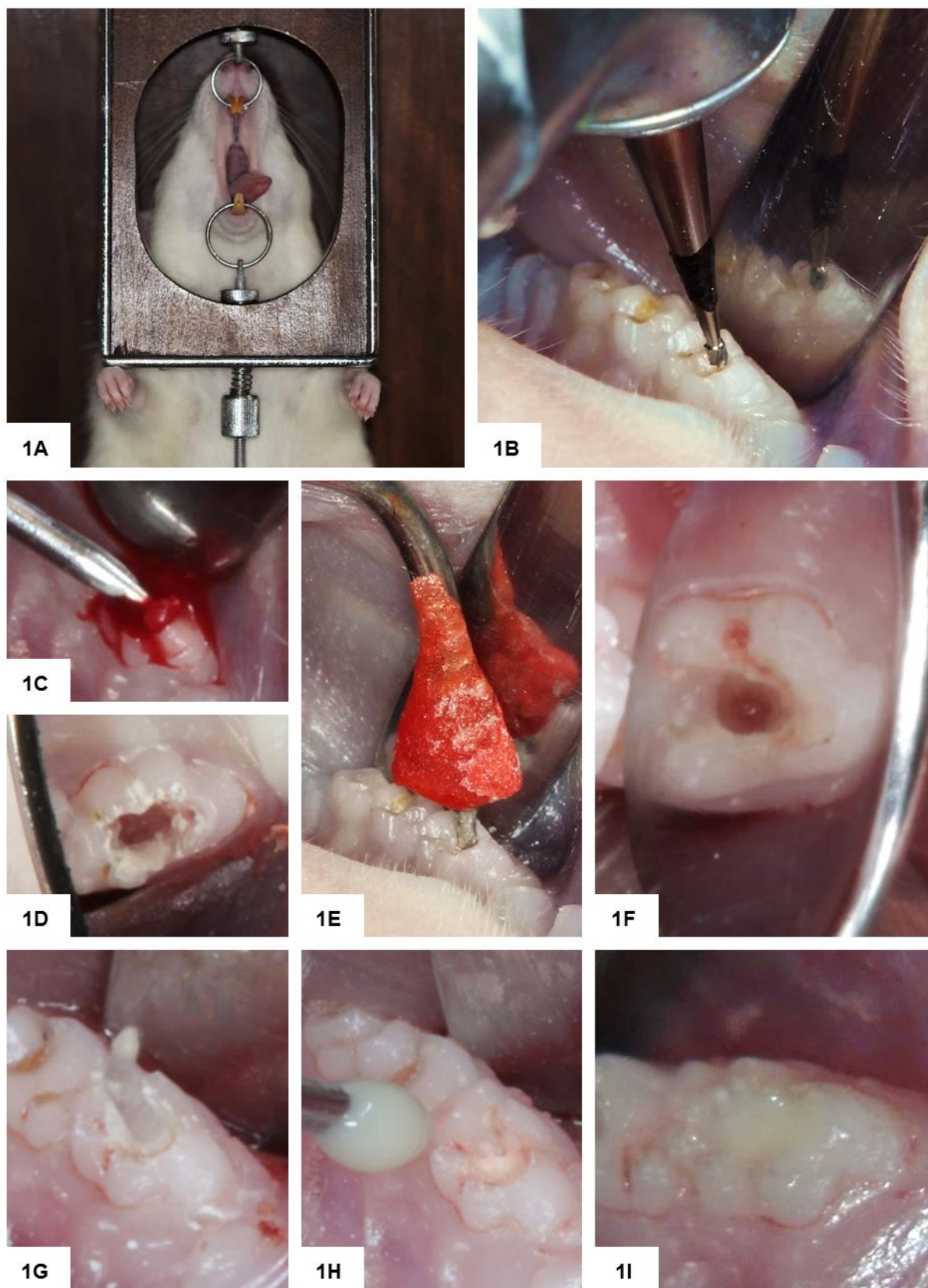
Após antisepsia da cavidade oral com gluconato de clorexidina a 0,12%

(PerioGard®; Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda., São Bernardo do Campo, SP, Brasil), foi realizada abertura coronária convencional no primeiro molar superior direito utilizando-se uma fresa esférica carbide nº ¼ (KG Sorensen; Medical Burs Indústria e Comércio de Pontas e Brocas Cirúrgicas Ltda., Cotia, SP, Brasil) em baixa rotação (KaVo do Brasil Indústria e Comércio Ltda., Joinville, SC, Brasil) (Figura 1B). Após extirpação da polpa coronária (Figura 1C), o soalho da cavidade pulpar (Figura 1D) foi inspecionado com o auxílio de uma sonda exploradora número 47 (S. S. White Duflex Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil), na qual foi adaptada uma marcação com resina acrílica (DuraLay; Reliance Dental Manufacturing Company, Worth, IL, Estados Unidos) ajustada ao comprimento de trabalho de 2 mm (Figura 1E).

Com a fresa nº ¼ confeccionou-se uma perfuração no centro do soalho da câmara pulpar, na área de furca (Figura 1F). O diâmetro da perfuração correspondeu ao da fresa e a profundidade estabelecida foi de dois milímetros¹⁵; com o objetivo de padronizar a profundidade da perfuração, esta distância foi demarcada na fresa utilizando-se um pincel permanente (Pilot Pen do Brasil S/A Indústria e Comércio, São Paulo, SP, Brasil). Durante todo o procedimento, irrigou-se copiosamente com soro fisiológico a 0,9% (Eurofarma Laboratórios S/A, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para hemostasia e remoção das raspas de dentina. A secagem da cavidade foi feita com cones de papel absorvente de ponta #15 (Tanariman Industrial Ltda., Manacapuru, AM, Brasil) previamente esterilizados.

Os materiais de cada grupo foram manipulados e imediatamente inseridos na perfuração, estendendo-se por todo o soalho da câmara pulpar e embocaduras dos canais radiculares, com o auxílio de sonda exploradora e cones de papel absorvente (Tanariman Industrial Ltda., Manacapuru, Amazonas, Brasil) #20 e #25 (Figura 1G). No grupo Sham, uma pelota de algodão previamente esterilizada foi inserida na região da perfuração. Em todos os grupos, as aberturas coronárias foram seladas (Figura 1H) com cimento de ionômero de vidro fotopolimerizável (Vitremér™; 3M ESPE Dental Products, Saint Paul, MN, Estados Unidos) ativado com fotopolimerizador (Curing Light XL3000; 3M ESPE Dental Products, Saint Paul, MN, Estados Unidos) por quarenta segundos.

Após os procedimentos (Figura 1I), os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno identificadas de acordo com o grupo e período experimental e foram observados até a recuperação da anestesia. Administrou-se no pós-operatório



Fonte: Elaboração própria.

Figuras 1A-1H – Sequência técnica do procedimento experimental. Figura 1A – Animal posicionado em decúbito dorsal na mesa cirúrgica; as argolas de aço são ajustadas aos incisivos, mantendo a mandíbula e a maxila fixas. Figura 1B – Fresa com a demarcação em 2 mm, acoplada ao contra-ângulo e posicionada sobre o primeiro molar superior direito. Figura 1C – Remoção da polpa coronária após acesso à câmara pulpar. Figura 1D – Câmara pulpar após pulpectomia coronária. Figura 1E – Sonda exploradora com marcação em resina acrílica para confirmação do comprimento de trabalho da perfuração (2 mm). Figura 1F – Câmara pulpar com perfuração do soalho na região de furca. Figura 1G – Inserção do cimento reparador. Figura 1H – cimento reparador acomodado na região de perfuração e inserção do cimento de ionômero de vidro. Figura 1I – Restauração coronária com cimento de ionômero de vidro fotoativado.

dipirona sódica (dipirona monoidratada 500 mg/mL; Medley Indústria Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil) na proporção de 0,03 mg / 100 g de peso corporal nos três primeiros dias após a cirurgia.

As restaurações foram reavaliadas semanalmente para verificar a manutenção de sua integridade e selamento. Para isto, os animais foram anestesiados e posicionados na mesa cirúrgica como previamente descrito. Uma sonda exploradora foi utilizada para verificar a qualidade da restauração. Os animais com falha na restauração foram descartados da amostra.

Decorridos os períodos experimentais previamente estabelecidos, os animais foram anestesiados, como previamente descrito. Subsequentemente, foi realizada uma incisão longitudinal no abdome, divulsão da cavidade abdominal até a cavidade torácica e exposição do coração. O sangue foi coletado por punção cardíaca do ventrículo esquerdo com tubo a vácuo (Vacuette®, Z soro ativador de coágulo gel; Greiner Bio-One Brasil Produtos Médicos Hospitalares Ltda., Americana, SP, Brasil) acoplado a uma agulha múltipla (MedMúltipla, 25 x 8, 21G x 1"; Med Goldman Indústria e Comércio Ltda., Manaus, AM, Brasil) conectada a um adaptador BD Vacutainer® (Becton Dickinson Indústrias Cirúrgicas Ltda., Curitiba, PR, Brasil). Em seguida, o sangue foi processado para análise bioquímica e as maxilas foram removidas para processamento histológico.

4.3 Processamento do Sangue

Após a coleta, os tubos contendo o sangue de cada animal foram mantidos em temperatura ambiente por quinze minutos para a formação do coágulo. Em seguida, os tubos foram centrifugados (Excelsa® II 206 BL; Fanem Ltda., Guarulhos, SP, Brasil) a 3500 rpm durante 10 minutos para a separação entre o soro e o coágulo. O soro foi reservado e encaminhado para análise laboratorial (Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, Araraquara, SP, Brasil).

4.3.1 Análise bioquímica

A partir do soro, em um analisador automático multiparamétrico (Cobas ÍNTEGRA® 400 Plus; Roche Diagnóstica Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), foi obtida a quantificação (Laboratório de Análises Clínicas São Lucas, Araraquara, SP,

Brasil) dos níveis séricos de transaminase glutâmico-oxalacética (ASTL, System-ID 07 6494 9; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), transaminase glutâmico-pirúvica (ALTL, System-ID 07 6495 7; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), creatinina (CREP2, System-ID 07 6612 7; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e ureia (UREAL, System-ID 07 6303 9; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) de cada animal.

A transaminase glutâmico-oxalacética presente no soro catalisa a transferência de um grupo amino entre L-aspartato e 2-oxogluconato, formando oxaloacetato e L-glutamato. O oxaloacetato reage com nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH), na presença de malato desidrogenase (MDH), formando nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD⁺). O fosfato de piridoxal atua como coenzima na reação de transferência de amino. A taxa de oxidação de NADH é diretamente proporcional à atividade catalítica de TGO e é determinada pela medida da diminuição da absorbância a 340 nm. Os resultados da reação foram automaticamente convertidos de $\mu\text{kat/L}$ para U/L.

A transaminase glutâmico-pirúvica do soro catalisa a reação entre L-alanina e 2-oxoglutarato. O piruvato resultante é reduzido por NADH em uma reação catalisada por lactato desidrogenase (LDH), formando L-lactato e NAD⁺. O fosfato de piridoxal atua como uma coenzima na reação de transferência de amino. A taxa de oxidação de NADH é diretamente proporcional à atividade catalítica de TGP e é determinada ao medir a diminuição da absorbância a 340 nm. Assim como a reação para detecção de TGO, os resultados foram automaticamente convertidos de $\mu\text{kat/L}$ para U/L.

A creatinina foi detectada pelo método colorimétrico enzimático com o auxílio de creatininase, creatinase e sarcosina oxidase para glicina, formaldeído e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio liberado em uma reação catalisada pela peroxidase reage com 4-aminofenazona e ácido 2,4,6-triiodo-3-hidroxibenzóico para formar um cromógeno quinona-imina. A intensidade da cor do cromógeno formado é diretamente proporcional à concentração de creatinina na mistura da reação. Os resultados foram calculados em $\mu\text{mol/L}$ e automaticamente convertidos para mg/dL.

A mensuração de ureia foi feita a partir do teste cinético com urease e glutamato desidrogenase. A ureia é hidrolisada pela urease, dando origem a amônia e carbonato. Em seguida, o 2-oxoglutarato reage com a amônia na presença de glutamato desidrogenase e da coenzima NADH, dando origem a L-glutamato. Nesta

reação, dois mols de NADH são oxidados a NAD^+ por cada mol de ureia hidrolisada. A taxa de diminuição na concentração de NADH é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra e é determinada medindo-se a absorbância a 340 nm. A concentração de ureia foi calculada automaticamente e convertida de mmol/L para mg/dL.

A média dos valores dos cinco animais os quais não foram submetidos a perfurações constituíram os valores de referência de cada parâmetro. Foi estabelecida uma média para cada período dos grupos Biodentine, MTA e Sham em cada um dos critérios analisados. Comparou-se os dados de cada parâmetro com os valores de referência, assim como analisou-se os valores de cada grupo no decorrer do tempo e todos os grupos em cada período.

4.4 Processamento Histológico

As cinco maxilas de cada grupo em cada período foram fixadas em formaldeído (paraformaldeído PA; Labsynth Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil) a 4% tamponado com fosfato de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, SP, Brasil) 0,1 M, com pH ajustado em 7,2, durante 72 horas. Após a fixação, as maxilas foram descalcificadas em micro-ondas (Pelco BioWave® Pro; Pelco Corporation, Clovis, CA, Estados Unidos) com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA sal dissódico PA; Labsynth Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil) a 7% tamponado com fosfato de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, SP, Brasil) 0,1 M em pH 7,2 por vinte dias.

Em seguida, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (Ciclo Farma Indústria Química Ltda., Serrana, SP, Brasil), a partir do álcool 70 °GL até o álcool absoluto. Subsequentemente, as peças foram diafanizadas em xilol (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil) e, após a infiltração em parafina líquida (58-60 °C), foram incluídas em parafina de modo a obter cortes sagitais seriados com espessura de 6 µm da região de furca dos molares contendo as cavidades no soalho da câmara pulpar.

Os cortes foram aderidos a lâminas de vidro e corados com hematoxilina de Carazzi e eosina de Lison (HE), picrosirius ou submetidos à reação histoquímica para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP, acrônimo de Tartrate Resistant

Acid Phosphatase). Alguns cortes foram aderidos a lâminas de vidro tratadas com silano (3-aminopropyltrimethoxysilane; Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, Estados Unidos) e submetidos a reações imuno-histoquímicas para detecção de IL-6 e osterix.

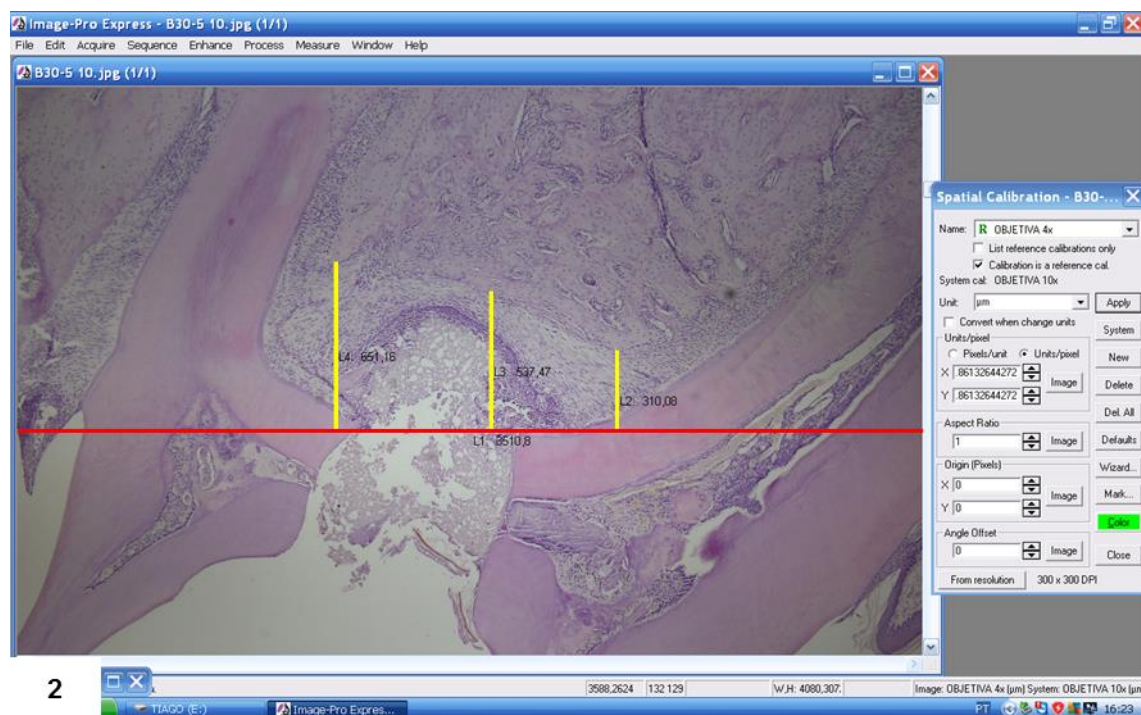
4.5 Métodos de Análise dos Resultados

4.5.1 Análise morfológica do periodonto subjacente às perfurações

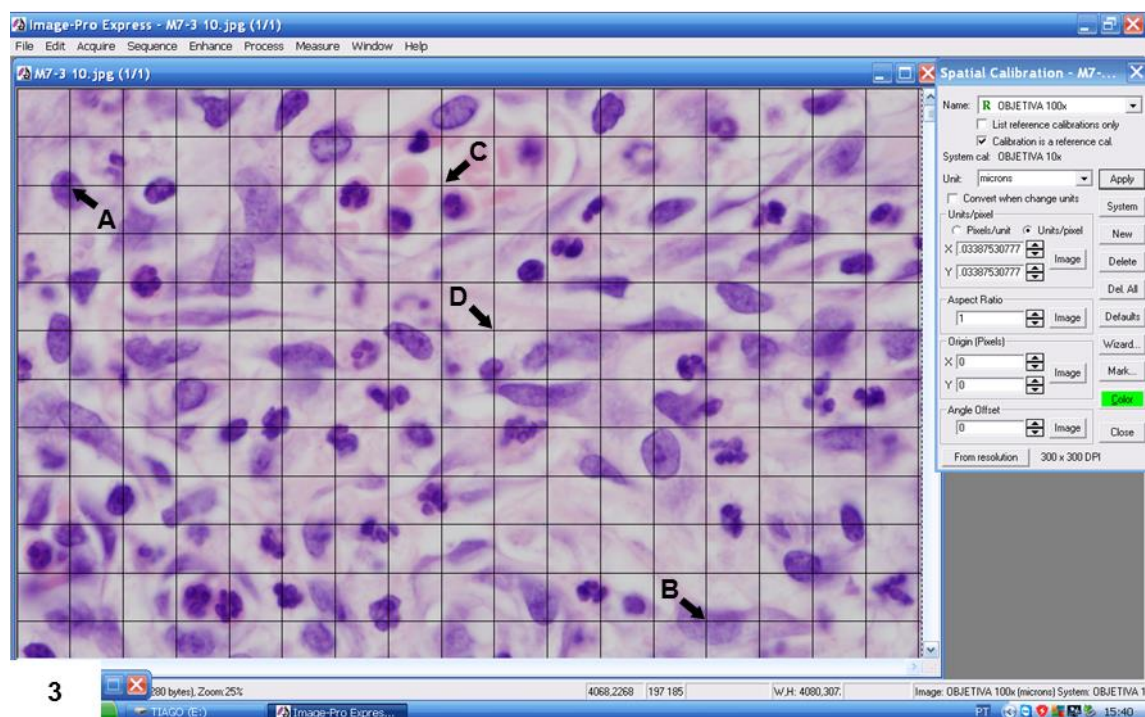
A partir dos cortes corados com HE, foi realizada a análise morfológica do periodonto subjacente às perfurações no soalho da câmara pulpar dos molares de todos os grupos e períodos. Nesta análise foram considerados os seguintes parâmetros: presença ou ausência de processo inflamatório, assim como sua extensão; presença de osteoclastos e osteoblastos na superfície do processo alveolar em proximidade com as perfurações; presença de feixes de fibras colágenas; espaço periodontal.

4.5.2 Espaço periodontal

O espaço ocupado pelo ligamento periodontal foi mensurado a partir de três cortes não seriados de cada hemimaxila corados com HE, com intervalo mínimo de 100 µm. As imagens foram capturadas com uma câmera digital (DP-71; Olympus Corporation, Shinjuku, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX-51; Olympus Corporation, Shinjuku, Tóquio, Japão), com a objetiva de 4x (aumento final de 65x). Com um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0; Olympus Corporation, Shinjuku, Tóquio, Japão), delimitou-se em cada fotomicrografia três linhas perpendiculares entre a região da perfuração e a superfície do osso alveolar, resultando em uma média para cada imagem (Figura 2). A partir das médias dos três cortes, calculou-se a média do espaço periodontal em cada hemimaxila.



Fonte: Elaboração própria.



Fonte: Elaboração própria.

Figura 2 – *Print screen* de uma fotomicrografia da tela do computador. Usando um programa (Image Pro-Express 6.0, Olympus), uma imagem capturada previamente com objetiva de 4x foi aberta para mensuração do espaço periodontal. Inicialmente, foi informado ao sistema de análise o aumento utilizado para a obtenção da imagem e, após a calibração, foi traçada uma linha (em vermelho) paralela às bordas da perfuração. A partir desta linha foram realizadas três medidas (em amarelo) perpendicularmente à linha traçada em vermelho em direção à superfície do processo alveolar. As três linhas foram traçadas equidistantes entre si, ou seja, uma próxima à raiz mesial, uma próxima à raiz distal e uma intermediária, obtendo-se assim um valor médio (em micrômetros) do espaço periodontal.

Figura 3 – *Print screen* da tela do computador de uma fotomicrografia capturada com a objetiva de 100x mostrando o ligamento periodontal próximo à perfuração do soalho da câmara pulpar. Com auxílio do programa de análise de imagem (Image-Pro Express 6.0, Olympus), a fotomicrografia foi aberta e, após a calibração, uma grade reticular contendo 208 intersecções/pontos (sistema teste) foi sobreposta à imagem. Para facilitar a identificação das células e demais estruturas foi dada uma ampliação de 25% e, conseqüentemente, não estão ilustradas as 208 intersecções do sistema teste. As intersecções incidentes sobre as células inflamatórias (A) e fibroblastos (B) foram computadas. Vasos sanguíneos (C) e matriz extracelular (D) incidentes sobre os pontos das intersecções foram computados como outras estruturas.

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

A densidade de volume de células inflamatórias (VvCI) e de fibroblastos (VvFb) foi estimada a partir de três cortes não seriados corados com HE de cada hemimaxila. As imagens do espaço periodontal subjacente à perfuração do soalho da câmara pulpar na região de furca foram capturadas com uma câmera (DP-71; Olympus) acoplada a um microscópio de luz (BX-51; Olympus) usando a objetiva de 100x (aumento final de 1745x), conforme metodologia descrita previamente^{28,123,124}. Com o programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0; Olympus), uma grade reticular contendo 208 intersecções/pontos foi sobreposta a cada imagem (Figura 3).

O número de pontos incidentes sobre células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos) e fibroblastos foi computado. Vasos sanguíneos, hemácias, matriz extracelular, espaços extracelulares e partículas de material foram computados como outras estruturas (VvO). Considerando o número total de intersecções da grade reticular e o número que incidiu sobre cada estrutura, obteve-se a densidade de volume (em porcentagem), ou seja, a frequência de cada estrutura. Ao final, foi estabelecida uma média para cada grupo em cada período. A VvCI e a VvFb foram obtidas por um examinador calibrado e cego às identificações.

4.5.4 Reação imuno-histoquímica para IL-6

Após desparafinização, hidratação e imersão em tampão citrato de sódio 0,001 M com pH 6,0, a recuperação antigênica dos cortes foi realizada em micro-ondas com dois ciclos de dez minutos cada a 90-94 °C. Após o resfriamento, a peroxidase endógena foi inativada em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3%. Os cortes foram lavados com tampão Tris-HCl 0,05 M e incubados com albumina sérica bovina (BSA) a 2% para o bloqueio de reações inespecíficas. Em seguida, os cortes foram incubados por 18 horas com anticorpo primário policlonal anti-IL-6 produzido em cabra (M-19, sc-1265; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, Estados Unidos), na diluição de 1:80 em uma solução de tampão Tris-HCl e BSA em partes iguais.

Após lavagens em tampão Tris-HCl 0,05 M, os cortes foram tratados com

anticorpo secundário de coelho/camundongo/cabra anti-IgG biotinilado (Biotinylated LINK Universal, Dako LSAB + System-HRP, K0690; Dako Inc., Carpinteria, CA, Estados Unidos) por 40 minutos. Após lavagens em tampão Tris-HCl 0,05 M, os cortes foram incubados com o complexo Streptavidin-HRP (Dako LSAB + System-HRP, K0690; Dako Inc.) por 40 minutos. Após lavagens, a peroxidase foi detectada com aplicação do cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (Dako Chromogen System; Dako Inc., Carpinteria, CA, Estados Unidos) durante cinco minutos e, em seguida, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Carazzi, desidratados, diafanizados e montados em meio resinoso para análise microscópica. Como controle negativo, alguns cortes foram submetidos a todas as etapas exceto a incubação com anticorpo primário, onde utilizou-se soro não imune.

O número de células imunopositivas foi quantificado no ligamento periodontal dos cinco animais de cada grupo/período, de acordo com metodologia previamente descrita^{27,125}. Com uma câmera (DP-71; Olympus) acoplada a um microscópio de luz (BX-51; Olympus), uma área padrão de 0,09 mm² subjacente às perfurações de furca foi capturada. O número de células IL-6-positivas (em castanho) foi computado com o auxílio de um programa de análise de imagens (Image Pro-Express 6.0; Olympus) e, em seguida, calculou-se a média para cada grupo em cada período.

4.5.5 Número de osteoclastos TRAP-positivos na superfície óssea

A reação histoquímica TRAP, usada como marcador de osteoclastos, foi realizada seguindo protocolo descrito previamente^{15,126,127}. Os cortes foram incubados em uma solução de 50 mL de tampão acetato de sódio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) 0,2M em pH 5,0, acrescido de 70 mg de Fast Red Salt TR (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, Estados Unidos) e 8 mg de naftol AS-BI (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, Estados Unidos), previamente dissolvido em 500 µL de N-dimetilformamida (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, Estados Unidos), com adição de 50 mM de tartarato de sódio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda., Diadema, SP, Brasil). Após incubação a 37 °C por quatro horas, os cortes foram lavados em água destilada, contracolorados com hematoxilina de Carazzi e montados em glicerina. Como controle de especificidade, alguns cortes foram incubados na ausência de naftol AS-BI.

A estimativa do número de osteoclastos TRAP-positivos foi realizada de

acordo com metodologia previamente descrita^{15,125,127}. Para obtenção do número de osteoclastos TRAP-positivos na superfície óssea, foram utilizados dois cortes não seriados, com intervalo mínimo de 100 µm entre si, de cada hemimaxila. Com auxílio de uma câmera (DP-71; Olympus) acoplada a um microscópio de luz (BX-51; Olympus) imagens do processo alveolar subjacente à perfuração do soalho da câmara pulpar foram capturadas com a objetiva de 4x (aumento final de 65x). Com o auxílio de um sistema de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0; Olympus), a superfície óssea linear do processo alveolar inter-radicular foi delimitada e mensurada. Nesta superfície óssea previamente mensurada, osteoclastos multinucleados com dois ou mais núcleos e exibindo citoplasma positivo ao TRAP (em vermelho) foram computados com auxílio de um microscópio (Primo Star; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha), com aumento de 400x. Desta maneira, foi obtido o número de osteoclastos por milímetro de superfície linear do processo alveolar da região de furca, calculada a média para cada hemimaxila e, finalmente, estabelecida uma média para cada grupo por período.

4.5.6 Reação imuno-histoquímica para osterix

A imunodeteção de osterix foi realizada de modo semelhante à imunomarcção para IL-6. Após desparafinização e hidratação, cortes aderidos a lâminas silanizadas foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001 M com pH 6,0 e submetidos ao tratamento com micro-ondas para recuperação antigênica. Após o resfriamento, as lâminas foram imersas em solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 3% para inativação da peroxidase endógena. Os cortes foram lavados em tampão Tris-HCl 0,05 M em pH 7,3 e, após a incubação com BSA a 2%, foram incubados durante 18 horas em anticorpo primário anti-osterix policlonal produzido em coelho (anti-Sp7/Osterix ab22552; Abcam PLC, Cambridge, Reino Unido), na diluição de 1:2500.

Subsequentemente a lavagens em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados em anticorpo secundário anti-IgG biotilado de coelho (ImmunoCruz™ LSAB Staining System SC-2051; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, Estados Unidos) por 40 minutos. Após lavagens em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados com o complexo HRP-avidina (ImmunoCruz™ LSAB Staining System SC-2051, Santa Cruz) por 40 minutos. Após novas lavagens, a atividade da

peroxidase foi marcada pelo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (Dako Chromogen System; Dako Inc., Carpinteria, CA, Estados Unidos) durante dois minutos e, subsequentemente, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Carazzi, desidratados, diafanizados e montados em meio resinoso para análise microscópica. Como controle negativo, alguns cortes foram submetidos a todas as etapas, exceto a incubação com anticorpo primário, onde foram incubados com soro não imune.

A partir de um corte de cada hemimaxila, quantificou-se o número de osteoblastos osterix-positivos (em castanho) na superfície do processo alveolar subjacente à região de furca, de modo semelhante à quantificação de osteoclastos TRAP-positivos. Imagens do processo alveolar subjacente à região do soalho da câmara pulpar foram obtidas com uma câmera (DP-71; Olympus) acoplada a um microscópio de luz (BX-51; Olympus) com a objetiva de 4x (aumento final de 65x). Com o auxílio de um sistema de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0; Olympus), a superfície óssea linear do processo alveolar inter-radicular foi delimitada e mensurada. Com o auxílio de um microscópio (Primo Star; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemanha), osteoblastos imunopositivos na superfície do processo alveolar foram quantificados em aumento final de 400x. Assim, obteve-se o número de osteoblastos osterix-positivos por milímetro de superfície linear do processo alveolar da região de furca de cada animal, estabelecendo-se uma média para cada grupo por período.

4.5.7 Mensuração de colágeno birrefringente

A quantidade de colágeno no espaço periodontal da região de furca subjacente à perfuração do soalho da câmara pulpar foi estimada a partir de dois cortes não seriados por hemimaxila, com intervalo mínimo de 100 µm entre os cortes, submetidos ao método picrosírius. Em cada corte, uma imagem do espaço periodontal subjacente à perfuração foi capturada usando um microscópio de luz (BX-51; Olympus) com os filtros de polarização, com a objetiva de 40x (aumento final de 695x). Uma vez que o objetivo era estimar o conteúdo de colágeno birrefringente e verificar possíveis variações entre os grupos, todas as imagens foram capturadas com parâmetros padronizados: intensidade da luz; altura do condensador; abertura do diafragma de campo; abertura do diafragma do condensador; objetiva de 40x; polarizador em ângulo de 90 graus; tempo de exposição; brilho e contraste da

imagem.

Com o processador de imagens ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, Estados Unidos), as cores indicativas de birrefringência, nos comprimentos de onda vermelho/laranja (matiz de 2 a 38 e de 230 a 256), amarelo (matiz de 39 a 51), e verde (matiz de 52 a 128), foram isoladas e convertidas para tons de cinza com a ferramenta Threshold, de modo que cada pixel não preto (oriundo da birrefringência) se tornou branco e cada pixel preto permaneceu preto. O número de pixels brancos foi mensurado e expresso na forma de porcentagem do total de colágeno birrefringente de cada imagem. Foi obtida uma média do total de colágeno no espaço periodontal subjacente à região de furca para cada hemimaxila a partir dos dois cortes analisados.

4.6 Análise Estatística

Com o programa GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, Estados Unidos), os dados bioquímicos de transaminase glutâmico-oxalacética, transaminase glutâmico-pirúvica, creatinina e ureia foram submetidos à análise de variância e pós-teste de Dunnett, com valor-p de 0,05. Além disso, tanto os dados bioquímicos quanto os dados obtidos a partir das hemimaxilas foram submetidos à análise de variância de dois fatores e pós-teste de Tukey, adotando-se como variáveis os protocolos experimentais e os períodos de análise, com nível de significância aceito de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Bioquímica

Como mostrado na Tabela 1, os níveis de TGO dos animais dos grupos Biodentine, MTA e Sham não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados com os valores de referência dos ratos sem perfuração de furca ($p \geq 0,1258$). No decorrer do tempo, não houve diferença estatisticamente significativa nos grupos Biodentine ($p \geq 0,564$) e Sham ($p \geq 0,185$). No entanto, o grupo MTA apresentou níveis mais elevados de TGO aos 60 dias em comparação com o período de 7 dias ($p = 0,0102$). Não houve diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,1171$) nos níveis de TGO entre os grupos Biodentine, MTA e Sham nos períodos de 7, 15 e 30 dias. Aos 60 dias, no entanto, o grupo MTA apresentou valores significativamente maiores em comparação ao grupo Biodentine ($p = 0,0193$). Neste período, o grupo Sham não apresentou diferença significativa com os grupos Biodentine ($p = 0,2799$) e MTA ($p = 0,2855$).

Conforme ilustrado na Tabela 1, não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de TGP nos grupos Biodentine, MTA e Sham em relação aos valores de referência ($p \geq 0,5827$). Além disso, não houve diferença significativa nos grupos entre os períodos ($p \geq 0,2775$) nem quando comparados entre si em cada período ($p \geq 0,1488$).

Tabela 1 – Valores de transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) dos animais sem tratamento (valores de referência) e dos grupos Biodentine, MTA e Sham após 7, 15, 30 e 60 dias

		TGO (U/L)	TGP (U/L)
Valor de referência		584,4 ± 201,6 *	86,0 ± 9,4 *
7 dias	Biodentine	388,2 ± 217,9 * a,1	106,2 ± 33,4 * a,1
	MTA	430,2 ± 175,4 * a,1	101,0 ± 10,5 * a,1
	Sham	501,6 ± 195,0 * a,1	93,6 ± 18,8 * a,1
15 dias	Biodentine	498,0 ± 143,9 * a,1	98,4 ± 14,8 * a,1
	MTA	638,2 ± 111,9 * a,1-2	102,0 ± 14,1 * a,1
	Sham	442,2 ± 167,0 * a,1	89,6 ± 17,9 * a,1
30 dias	Biodentine	517,4 ± 126,0 * a,1	95,4 ± 17,3 * a,1
	MTA	577,2 ± 163,2 * a,1-2	107,0 ± 27,5 * a,1
	Sham	456,0 ± 166,3 * a,1	82,8 ± 4,1 * a,1
60 dias	Biodentine	488,0 ± 108,2 * a,1	106,4 ± 41,3 * a,1
	MTA	853,6 ± 252,8 * b,2	105,4 ± 21,7 * a,1
	Sham	671,6 ± 148,8 * a-b,1	98,4 ± 2,3 * a,1

Valores numéricos representam média ± desvio padrão.

Símbolos diferentes representam diferença estatisticamente significativa em comparação com os valores de referência em cada parâmetro.

Letras sobrescritas diferentes representam diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos no mesmo período em cada parâmetro.

Números sobrescritos diferentes representam diferença estatisticamente significativa na comparação de cada grupo no decorrer do tempo em cada parâmetro.

Testes de Dunnett e de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com a Tabela 2, diferenças estatisticamente significantes no nível de creatinina não foram observadas entre os valores dos animais de referência e dos grupos experimentais em todos os períodos ($p \geq 0,1059$), exceto o grupo Biodentine aos 60 dias; neste período, o grupo Biodentine apresentou o valor de creatinina maior significativamente ($p = 0,0222$) em relação ao valor de referência. Entre os grupos Biodentine, MTA e Sham não houve diferença estatisticamente significativa nos períodos de 7 dias ($p \geq 0,4619$), 15 dias ($p \geq 0,2967$) e 30 dias ($p > 0,9999$). Porém, aos 60 dias o grupo Biodentine exibiu valores mais altos em comparação aos grupos MTA ($p = 0,0232$) e Sham ($p = 0,0015$), os quais não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p = 0,304$). No decorrer do tempo, não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de creatinina nos grupos MTA ($p \geq 0,1884$) e Sham ($p \geq 0,3734$). No entanto, o grupo Biodentine apresentou valor estatisticamente maior de creatinina aos 60 dias em comparação com o período de 30 dias ($p = 0,0198$).

Com relação aos valores de ureia (Tabela 2), os grupos Biodentine e MTA aos 7 dias mostraram valores significativamente mais elevados ($p = 0,0166$) em comparação ao valor de referência; diferenças significantes ($p \geq 0,5154$) não foram detectadas nos demais períodos. Quando comparados entre si em cada período, os três grupos não apresentaram diferença estatística em nenhum dos períodos de análise ($p \geq 0,0508$). Não houve diferença estatisticamente significativa no decorrer do tempo tanto no grupo Biodentine ($p \geq 0,325$) quanto no grupo Sham ($p \geq 0,07$). Por outro lado, redução significativa ($p = 0,0052$) foi detectada aos 60 dias em comparação ao período de 7 no grupo MTA.

Tabela 2 – Valores de creatinina e de ureia dos animais sem tratamento (valores de referência) e dos grupos Biodentine, MTA e Sham após 7, 15, 30 e 60 dias

		Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
Valor de referência		0,32 ± 0,04 *	43,4 ± 6,0 *
7 dias	Biodentine	0,38 ± 0,04 * a,1-2	52,4 ± 6,8 † a,1
	MTA	0,36 ± 0,05 * a,1	52,4 ± 3,2 † a,1
	Sham	0,34 ± 0,05 * a,1	47,0 ± 4,7 * a,1
15 dias	Biodentine	0,34 ± 0,05 * a,1-2	47,2 ± 5,4 * a,1
	MTA	0,40 ± 0,00 * a,1	45,4 ± 4,0 * a,2
	Sham	0,36 ± 0,09 * a,1	47,4 ± 2,5 * a,1
30 dias	Biodentine	0,32 ± 0,04 * a,1	48,0 ± 5,5 * a,1
	MTA	0,32 ± 0,04 * a,1	47,2 ± 1,3 * a,1-2
	Sham	0,32 ± 0,04 * a,1	42,0 ± 2,4 * a,1
60 dias	Biodentine	0,42 ± 0,04 † a,2	46,0 ± 4,9 * a,1
	MTA	0,34 ± 0,05 * b,1	45,0 ± 2,4 * a,2
	Sham	0,30 ± 0,00 * b,1	43,2 ± 2,4 * a,1

Valores numéricos representam média ± desvio padrão.

Símbolos diferentes representam diferença estatisticamente significativa em comparação com os valores de referência em cada parâmetro.

Letras sobrescritas diferentes representam diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos no mesmo período em cada parâmetro.

Números sobrescritos diferentes representam diferença estatisticamente significativa na comparação de cada grupo no decorrer do tempo em cada parâmetro.

Testes de Dunnett e de Tukey ($p \leq 0,05$).

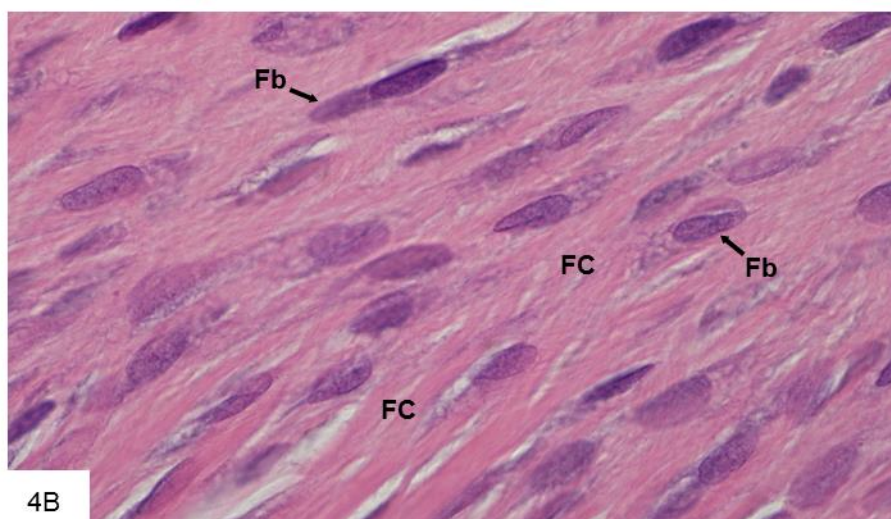
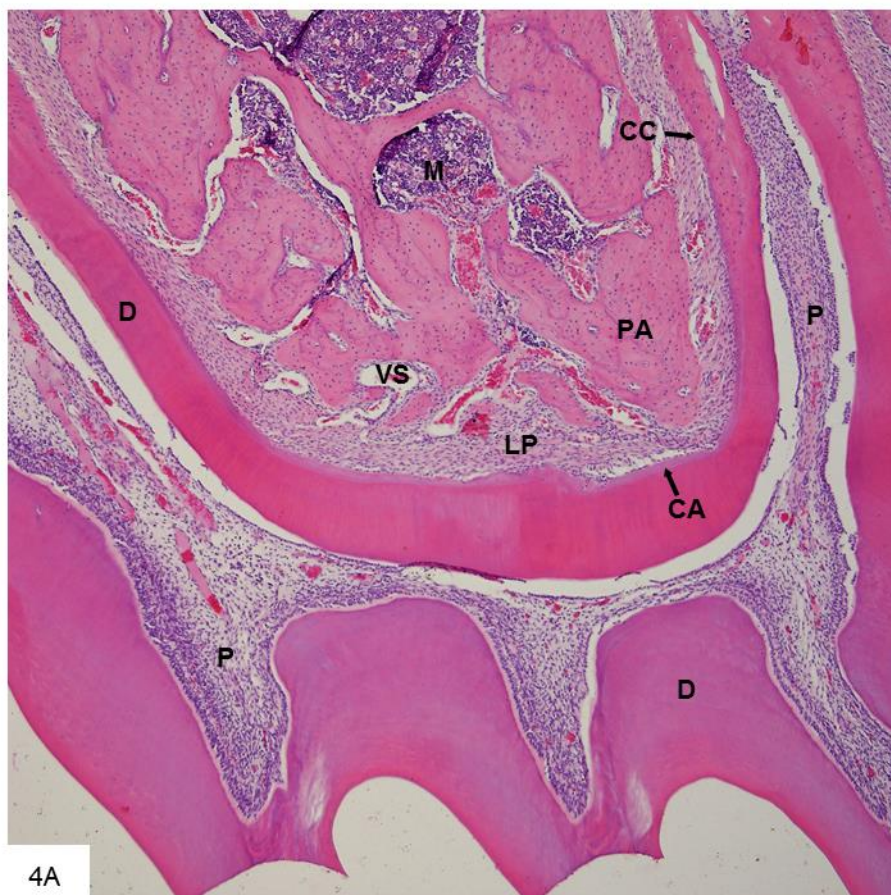
Fonte: Elaboração própria.

5.2 Descrição Morfológica da Região de Furca

Os molares hígidos (grupo Controle) apresentaram ligamento periodontal circundando as raízes dentárias, com diversos fibroblastos entre os feixes de fibras colágenas (Figuras 4A e 4B). O processo alveolar inter-radicular apresentava contorno irregular e canais vasculares interconectando os espaços medulares ao ligamento periodontal foram frequentemente observados (Figura 4A).

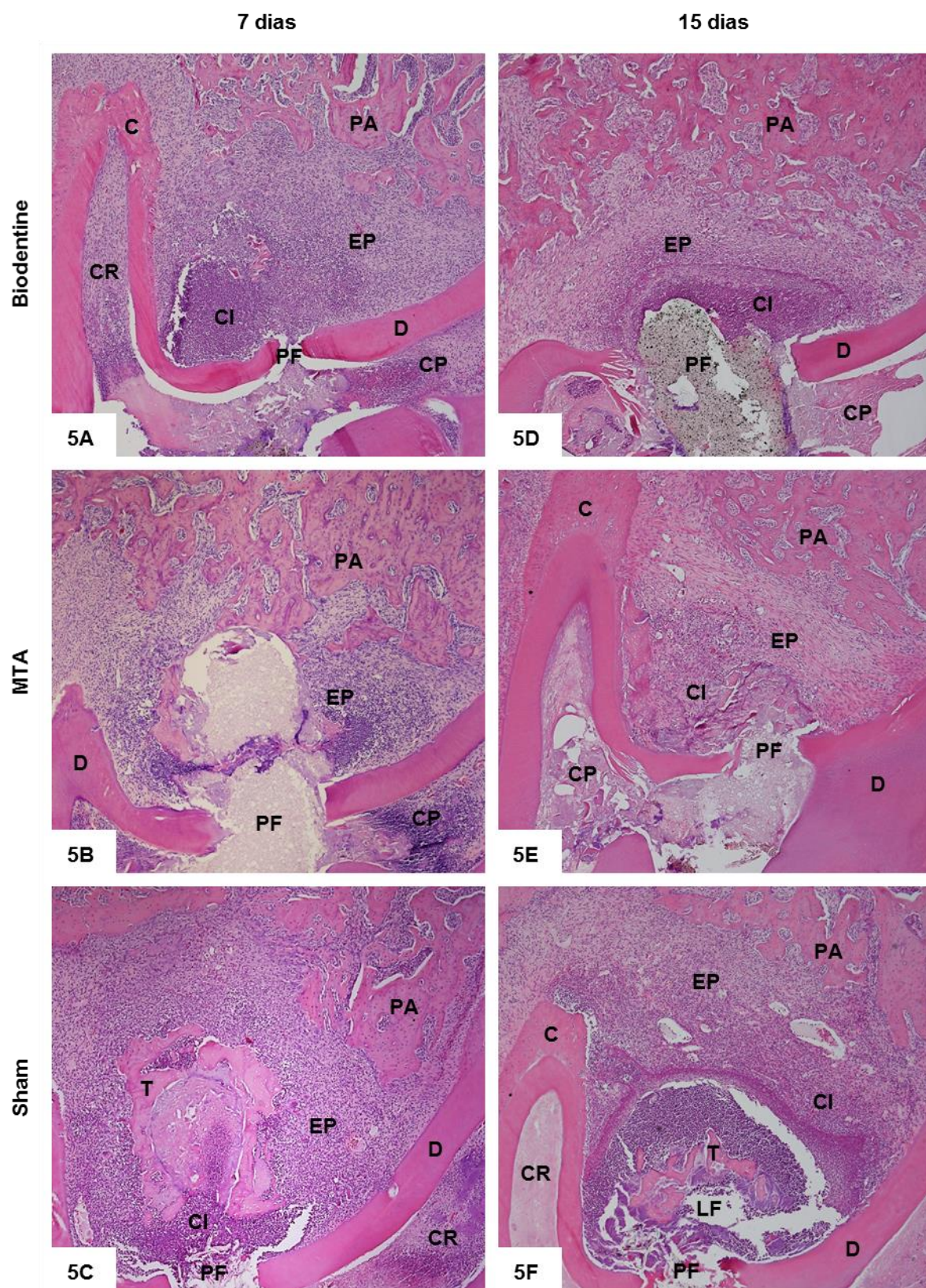
Aos 7 e 15 dias, os grupos Biodentine (Figuras 5A e 5D), MTA (Figuras 5B e 5E) e Sham (Figuras 5C e 5F) apresentaram evidente perda do processo alveolar na região subjacente às perfurações de furca dos molares e, conseqüentemente, espaço periodontal ampliado. Intenso infiltrado inflamatório foi observado no espaço periodontal dos grupos Biodentine e Sham (Figuras 5A, 5C, 7A e 7C), enquanto que no grupo MTA este apresentou-se como moderado (Figuras 5B e 7B). No período de 15 dias, extensa lesão com evidente proliferação epitelial foi observada na região de furca dos molares, subjacente às perfurações do grupo Sham (Figura 5F).

Nos períodos de 30 e 60 dias, poucas células inflamatórias foram observadas no espaço periodontal ainda ampliado dos molares dos grupos Biodentine (Figuras 6A, 6D e 7D) e MTA (Figuras 6B, 6E e 7E). Por outro lado, no grupo Sham extensas lesões foram observadas na região de furca dos molares (Figuras 6C e 6F), além de moderada quantidade de células inflamatórias aos 60 dias (Figura 7F).



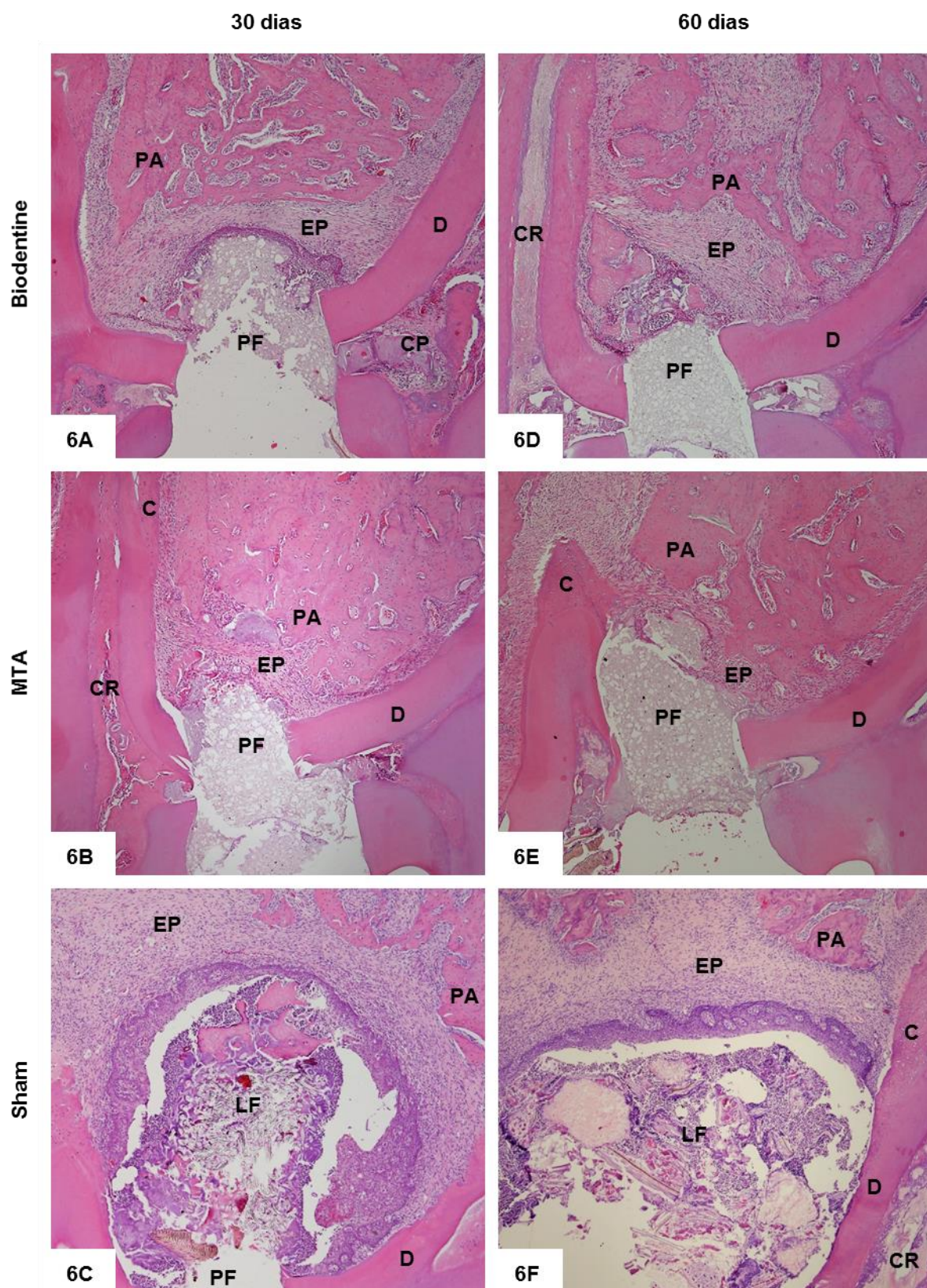
Fonte: Elaboração própria.

Figuras 4A-4B – Fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas mostrando uma porção do primeiro molar do grupo Controle. Figura 4A – o ligamento periodontal (LP) preenche o espaço entre as raízes do molar e o processo alveolar (PA). D, dentina; P, polpa dentária; M, medula óssea, VS, vasos sanguíneos; CA, cimento acelular; CC, cimento celular. Figura 4B – uma porção do ligamento periodontal, na região de furca, adjacente à superfície da raiz. Diversos fibroblastos (Fb) estão situados entre feixes de fibras colágenas (FC). HE. Figura 4A: 45x; Figura 4B: 350x.



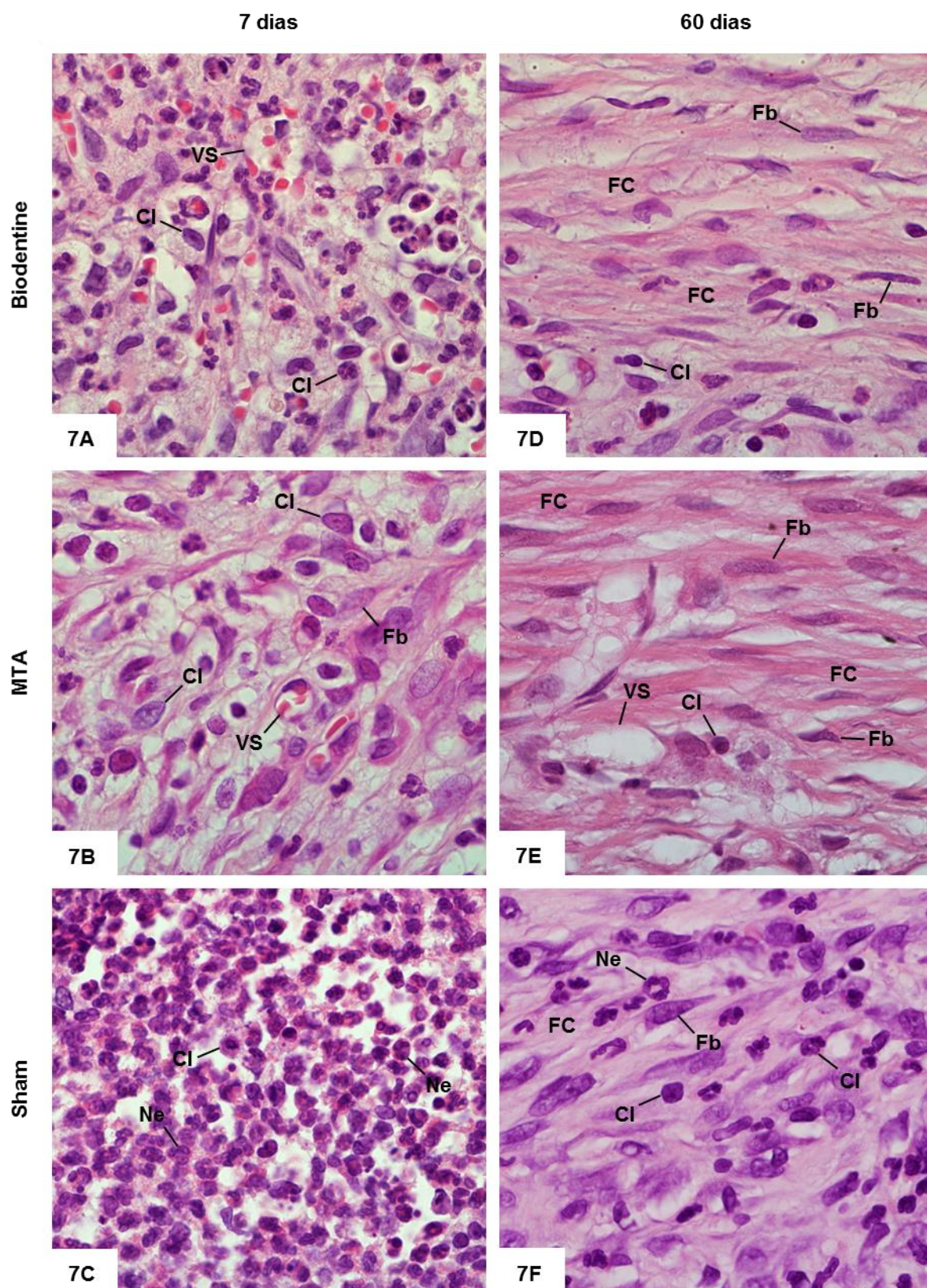
Fonte: Elaboração própria.

Figuras 5A-5F – Fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas mostrando o primeiro molar dos grupos Biodentine (Figuras 5A e 5D), MTA (Figuras 5B e 5E) e Sham (Figuras 5C e 5F) aos 7 dias (Figuras 5A-5C) e 15 dias (Figuras 5D-5F). Aos 7 e 15 dias, inúmeras células inflamatórias (CI) estão presentes no espaço periodontal (EP) subjacente às perfurações de furca (PF), particularmente nos grupos Biodentine (Figuras 5A e 5D) e Sham (Figuras 5C e 5F). Espaço periodontal ampliado e evidente perda do processo alveolar (PA) são observados em todos os grupos. No grupo Sham, trabéculas ósseas (T) rodeadas pelo infiltrado inflamatório são observadas próximo às perfurações (Figuras 5C e 5F). Aos 15 dias, há presença de lesão de furca (LF) na região subjacente ao molar do grupo Sham (Figura 5F). D, dentina; CP, câmara pulpar; CR, canal radicular; C, cimento. HE. 35x.



Fonte: Elaboração própria.

Figuras 6A-6F – Fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas mostrando o primeiro molar dos grupos Biodentine (Figuras 6A e 6D), MTA (Figuras 6B e 6E) e Sham (Figuras 6C e 6F) aos 30 dias (Figuras 6A-6C) e 60 dias (Figuras 6D-6F). Os grupos Biodentine e MTA apresentam poucas células inflamatórias no espaço periodontal (EP) na região subjacente às perfurações de furca (PF), tanto aos 30 quanto aos 60 dias. O grupo Sham exibe extensas lesões de furca (LF) adjacentes às perfurações (Figuras 6C e 6F). PA, processo alveolar; D, dentina; CP, câmara pulpar; CR, canal radicular; C, cimento. HE. 35x.



Fonte: Elaboração própria.

Figuras 7A-7F – Fotomicrografias de porções do ligamento periodontal subjacente às perfurações de furca dos grupos Biodentine (Figuras 7A e 7D), MTA (Figuras 7B e 7E) e Sham (Figuras 7C e 7F) aos 7 dias (Figuras 7A-7C) e 60 dias (Figuras 7D-7F). Aos 7 dias, os grupos Biodentine (Figura 7A) e MTA (Figura 7B) apresentam moderada quantidade de células inflamatórias (CI) dispersas pelo tecido conjuntivo; no grupo Sham (Figura 7C), intenso infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos (Ne) preenche o espaço periodontal. No período de 60 dias, os grupos Biodentine (Figura 7D) e MTA (Figura 7E) apresentam escassas células inflamatórias (CI) e moderada quantidade de fibroblastos (Fb) dispersos entre feixes de fibras colágenas (FC). No grupo Sham (Figura 7F) diversas células inflamatórias (CI) entre fibroblastos (Fb) e poucas fibras colágenas (FC) são observadas. VS, vasos sanguíneos. HE. 680x.

5.3 Mensuração do Espaço Periodontal

Conforme observado na Tabela 3, um aumento significativo ($p < 0,001$) do espaço periodontal foi observado nos grupos Biodentine, MTA e Sham em comparação ao grupo Controle, em todos os períodos. Não houve diferenças significantes no grupo Controle no decorrer do tempo ($p > 0,9999$).

Aos 7 dias, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,999$) entre os grupos Biodentine e Sham, mas ambos tiveram valores estatisticamente superiores quando comparados ao grupo MTA ($p = 0,0381$ e $p = 0,0266$, respectivamente). Diferenças significantes ($p \geq 0,132$) entre os grupos Biodentine, MTA e Sham não foram observadas no período de 15 dias. Aos 30 dias ($p = 0,6944$) e 60 dias ($p = 0,9974$), não houve diferença significativa entre os grupos Biodentine e MTA enquanto que o grupo Sham apresentou valores estatisticamente superiores a ambos ($p < 0,0001$).

O grupo Biodentine não mostrou diferenças significantes entre os períodos de 7 e 15 dias ($p = 0,5807$) e entre os períodos de 30 e 60 dias ($p = 0,9996$). Em comparação aos 15 dias, uma redução significativa do espaço periodontal foi observada neste grupo nos períodos de 30 ($p = 0,0099$) e 60 dias ($p = 0,0132$). No entanto, o período de 7 dias não apresentou diferença significativa quando comparado aos períodos de 30 ($p = 0,1987$) e 60 ($p = 0,2394$) dias.

O grupo MTA apresentou aumento significativo ($p = 0,002$) de 7 dias para 15 dias. Neste grupo, diferenças significantes entre os períodos de 15 e 30 dias não foram detectadas ($p = 0,292$); aos 60 dias, significativa redução do espaço periodontal foi observada em comparação ao período de 15 dias ($p = 0,0191$). Além disso, não houve diferença significativa ($p = 0,8548$) entre os períodos de 7 e 60 dias.

No grupo Sham, foi observado aumento progressivo e significativo ($p < 0,0001$) no espaço periodontal no decorrer do tempo.

Tabela 3 – Espessura do espaço periodontal (mm) nos grupos Biodentine, MTA, Sham e Controle após 7, 15, 30 e 60 dias

	Biodentine	MTA	Sham	Controle
7 dias	0,684 ± 0,079 ^{a,1-2}	0,433 ± 0,077 ^{b,1}	0,696 ± 0,074 ^{a,1}	0,126 ± 0,029 ^{c,1}
15 dias	0,794 ± 0,075 ^{a,1}	0,764 ± 0,121 ^{a,2}	0,966 ± 0,186 ^{a,2}	0,127 ± 0,022 ^{b,1}
30 dias	0,511 ± 0,060 ^{a,2}	0,611 ± 0,113 ^{a,1-2}	1,476 ± 0,303 ^{b,3}	0,125 ± 0,010 ^{c,1}
60 dias	0,520 ± 0,122 ^{a,2}	0,502 ± 0,054 ^{a,1}	1,719 ± 0,363 ^{b,4}	0,124 ± 0,037 ^{c,1}

Valores numéricos representam média ± desvio padrão.

Comparação entre os grupos no mesmo período é indicada por letras sobrescritas nas linhas; mesma letra = sem diferença estatística.

Comparação de cada grupo no decorrer do tempo é indicada por números sobrescritos nas colunas; mesmo número = sem diferença estatística.

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

Fonte: Elaboração própria.

5.4 Densidade de Volume de Células Inflamatórias (VvCI) e de Fibroblastos (VvFb)

Conforme a Tabela 4, o grupo Controle apresentou os menores valores da VvCI e os maiores da VvFb em comparação aos demais grupos em todos os períodos ($p \leq 0,001$). Além disso, diferenças significantes nos valores da VvCI ($p \geq 0,996$) e VvFb ($p \geq 0,6414$) não foram observadas no decorrer do tempo neste grupo.

Aos 7 dias, a VvCI foi significativamente maior no grupo Biodentine em comparação ao MTA ($p < 0,0001$), porém foi significativamente menor ($p < 0,0001$) que no grupo Sham. Quanto à frequência de fibroblastos, diferenças significantes entre o grupo Biodentine com os grupos MTA ($p = 0,2554$) e Sham ($p = 0,6404$) não foram observadas, porém a VvFb do grupo MTA foi significativamente maior que a do grupo Sham ($p = 0,0175$). Nos períodos de 15, 30 e 60 dias, diferenças significantes não foram detectadas tanto na VvCI ($p \geq 0,1419$) quanto na VvFb ($p \geq 0,1928$) entre os grupos Biodentine e MTA. Além disso, o grupo Sham exibiu valores de VvCI ($p < 0,0001$) e de VvFb ($p \leq 0,015$) significativamente maiores e menores, respectivamente, quando comparados aos demais grupos nestes períodos.

Quanto à análise de cada grupo no decorrer do tempo, os grupos Biodentine,

MTA e Sham apresentaram uma redução gradual e estatisticamente significativa na VvCI, com diferenças significantes entre todos os períodos ($p < 0,0001$). Quanto à VvFb, um aumento gradativo e significativo ($p \leq 0,0064$) foi observado nos grupos Biodentine e MTA de 7 a 30 dias. De 30 para 60 dias, diferenças significantes não foram observadas na VvFb nos grupos Biodentine ($p = 0,938$) e MTA ($p = 0,7858$). O grupo Sham não apresentou diferenças significantes na VvFb entre os períodos de 7 e 15 dias ($p = 0,4551$) e entre 30 e 60 dias ($p = 0,7236$); um aumento significativo foi somente observado de 15 para 30 dias ($p = 0,0047$).

Tabela 4 – Densidade de volume (em porcentagem) de células inflamatórias (VvCI), fibroblastos (VvFb) e outras estruturas (VvO) nos grupos Biodentine, MTA, Sham e Controle após 7, 15, 30 e 60 dias

		Biodentine	MTA	Sham	Controle
7 dias	VvCI	35,26 $\pm$ 2,17 ^{a,1}	26,70 $\pm$ 3,72 ^{b,1}	42,18 $\pm$ 1,46 ^{c,1}	0,58 $\pm$ 0,18 ^{d,1}
	VvFb	1,47 $\pm$ 0,84 ^{a-b,1}	3,69 $\pm$ 1,59 ^{a,1}	0,06 $\pm$ 0,09 ^{b,1}	20,51 $\pm$ 0,89 ^{c,1}
	VvO	63,27 $\pm$ 1,92	69,62 $\pm$ 3,09	57,76 $\pm$ 1,54	78,91 $\pm$ 0,97
15 dias	VvCI	23,94 $\pm$ 3,53 ^{a,2}	20,90 $\pm$ 4,01 ^{a,2}	34,58 $\pm$ 1,75 ^{b,2}	0,38 $\pm$ 0,14 ^{c,1}
	VvFb	5,48 $\pm$ 1,04 ^{a,2}	7,88 $\pm$ 3,31 ^{a,2}	1,79 $\pm$ 0,63 ^{b,1}	19,36 $\pm$ 2,11 ^{c,1}
	VvO	70,58 $\pm$ 3,51	71,22 $\pm$ 2,88	63,62 $\pm$ 2,02	80,26 $\pm$ 2,02
30 dias	VvCI	10,67 $\pm$ 2,42 ^{a,3}	10,10 $\pm$ 0,99 ^{a,3}	27,28 $\pm$ 3,54 ^{b,3}	0,71 $\pm$ 0,27 ^{c,1}
	VvFb	11,47 $\pm$ 2,56 ^{a,3}	13,14 $\pm$ 1,65 ^{a,3}	5,93 $\pm$ 2,60 ^{b,2}	19,13 $\pm$ 1,71 ^{c,1}
	VvO	77,85 $\pm$ 2,18	76,76 $\pm$ 1,24	66,79 $\pm$ 2,77	80,16 $\pm$ 1,88
60 dias	VvCI	5,64 $\pm$ 1,40 ^{a,4}	5,83 $\pm$ 1,16 ^{a,4}	19,65 $\pm$ 1,81 ^{b,4}	0,45 $\pm$ 0,26 ^{c,1}
	VvFb	12,15 $\pm$ 2,60 ^{a,3}	14,23 $\pm$ 1,93 ^{a,3}	7,15 $\pm$ 1,33 ^{b,2}	19,68 $\pm$ 2,17 ^{c,1}
	VvO	82,21 $\pm$ 2,40	79,94 $\pm$ 2,64	73,21 $\pm$ 0,97	79,87 $\pm$ 2,33

Valores numéricos (em %) representam média $\pm$ desvio padrão.

Comparação entre os grupos no mesmo período é indicada por letras sobrescritas nas linhas; mesma letra = sem diferença estatística.

Comparação de cada grupo no decorrer do tempo é indicada por números sobrescritos nas colunas; mesmo número = sem diferença estatística.

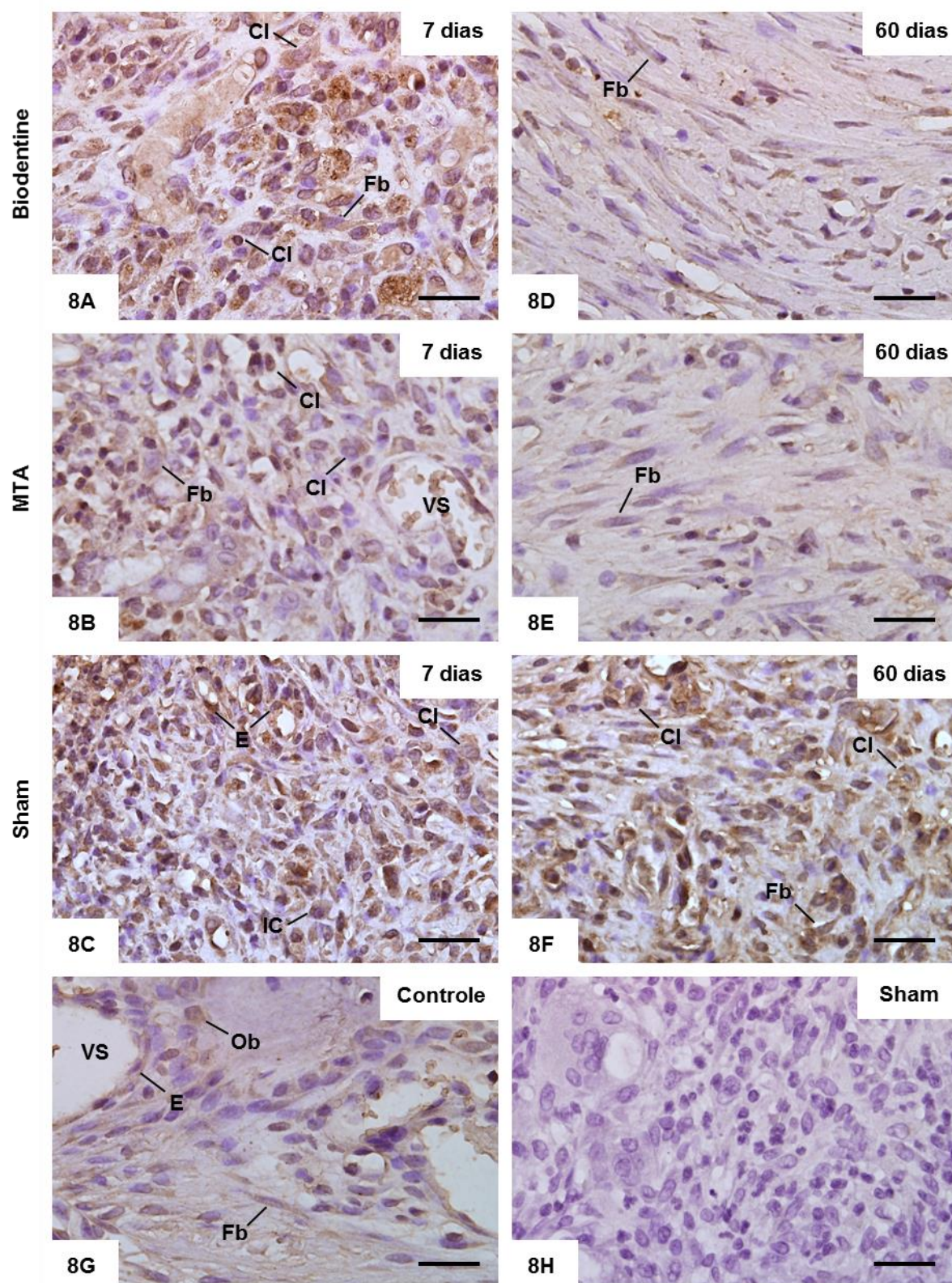
Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

5.5 Detecção Imuno-Histoquímica de IL-6

A reação imuno-histoquímica para detecção de IL-6 evidenciou imunopositividade citoplasmática (em castanho) nas células inflamatórias e fibroblastos (Figuras 8A-8G) no ligamento periodontal subjacente à região de furca. Aos 7 dias, os grupos Biodentine (Figura 8A) e MTA (Figura 8B) mostraram moderada imunomarcação em comparação ao grupo Sham (Figura 8C). No período de 60 dias, evidente redução na imunoexpressão foi observada nos grupos Biodentine (Figura 8D) e MTA (Figura 8E), enquanto que inúmeras células imunopositivas estavam ainda presentes no grupo Sham (Figura 8F). No grupo Controle, alguns fibroblastos do ligamento periodontal e osteoblastos adjacentes à superfície óssea exibiram fraca imunopositividade (Figura 8G). Os cortes incubados com soro em substituição ao anticorpo primário (controle negativo), as células não exibiram positividade (Figura 8H).

De acordo com a Tabela 5, o número de células imunopositivas à IL-6 foi maior significativamente no grupo Biodentine em comparação ao MTA, aos 7 ($p = 0,0002$) e 15 ($p = 0,0042$) dias. No entanto, diferenças significantes não foram observadas entre estes grupos nos períodos de 30 ($p = 0,7274$) e 60 ($p = 0,9663$) dias. Aos 60 dias, diferenças significantes não foram detectadas entre os grupos Biodentine, MTA e Controle. No entanto, o grupo Controle exibiu os menores valores aos 7, 15 e 30 dias ($p \leq 0,0437$); neste grupo, diferença estatisticamente significativa não foi detectada no decorrer do tempo ($p \geq 0,9998$). Em contraposição, o número de células imunopositivas foi maior significativamente ($p \leq 0,0001$) no grupo Sham em comparação aos demais grupos, em todos os períodos.



Fonte: Elaboração própria.

Figuras 8A-8H – Fotomicrografias de porções de cortes de maxilas submetidos à imuno-histoquímica para detecção de IL-6 (em castanho) e contracorados com hematoxilina. As fotomicrografias mostram porções do ligamento periodontal subjacente à região de furca dos grupos Biodentine (Figuras 8A e 8D), MTA (Figuras 8B e 8E), Sham (Figuras 8C, 8F e 8H) e Controle (Figura 8G) aos 7 dias (Figuras 8A-8C, 8G e 8H) e 60 dias (Figuras 8D-8F). Aos 7 dias, os grupos Biodentine (Figura 8A), MTA (Figura 8B) e Sham (Figura 8C) apresentam diversas células imunopositivas, predominantemente células inflamatórias (CI) entre alguns fibroblastos (Fb). Aos 60 dias, poucas células imunopositivas são observadas no ligamento periodontal dos grupos Biodentine (Figura 8D) e MTA (Figura 8E). Note que intensa imunomarcagem é observada nas células do ligamento periodontal no grupo Sham aos 60 dias (Figura 8F). A Figura 8G, uma porção do ligamento periodontal do grupo Controle, mostra poucas células positivas à IL-6; dentre elas, alguns fibroblastos (Fb) e osteoblastos (Ob). Figura 8H – corte incubado com soro não imune em substituição ao anticorpo primário (controle negativo) mostra ausência de imunorreatividade. E, célula endotelial imunopositiva; VS, vasos sanguíneos. 350x.

Tabela 5 – Número de células IL-6-positivas/mm² no ligamento periodontal dos grupos Biodentine, MTA, Sham e Controle após 7, 15, 30 e 60 dias

	Biodentine	MTA	Sham	Controle
7 dias	3431,1 ± 509,9 ^{a,1}	2242,2 ± 230,6 ^{b,1}	6017,8 ± 1073,9 ^{c,1}	486,7 ± 19,9 ^{d,1}
15 dias	3173,3 ± 208,1 ^{a,1}	2228,9 ± 314,4 ^{b,1}	4397,8 ± 556,7 ^{c,2}	477,8 ± 20,8 ^{d,1}
30 dias	1468,9 ± 173,8 ^{a,2}	1191,1 ± 71,8 ^{a,2}	3424,4 ± 720,5 ^{b,3}	471,1 ± 18,6 ^{c,1}
60 dias	813,3 ± 44,0 ^{a,2}	688,9 ± 65,7 ^{a,2}	3013,3 ± 616,2 ^{b,3}	464,4 ± 18,3 ^{a,1}

Valores numéricos representam média ± desvio padrão.

Comparação entre os grupos no mesmo período é indicada por letras sobrescritas nas linhas; mesma letra = sem diferença estatística.

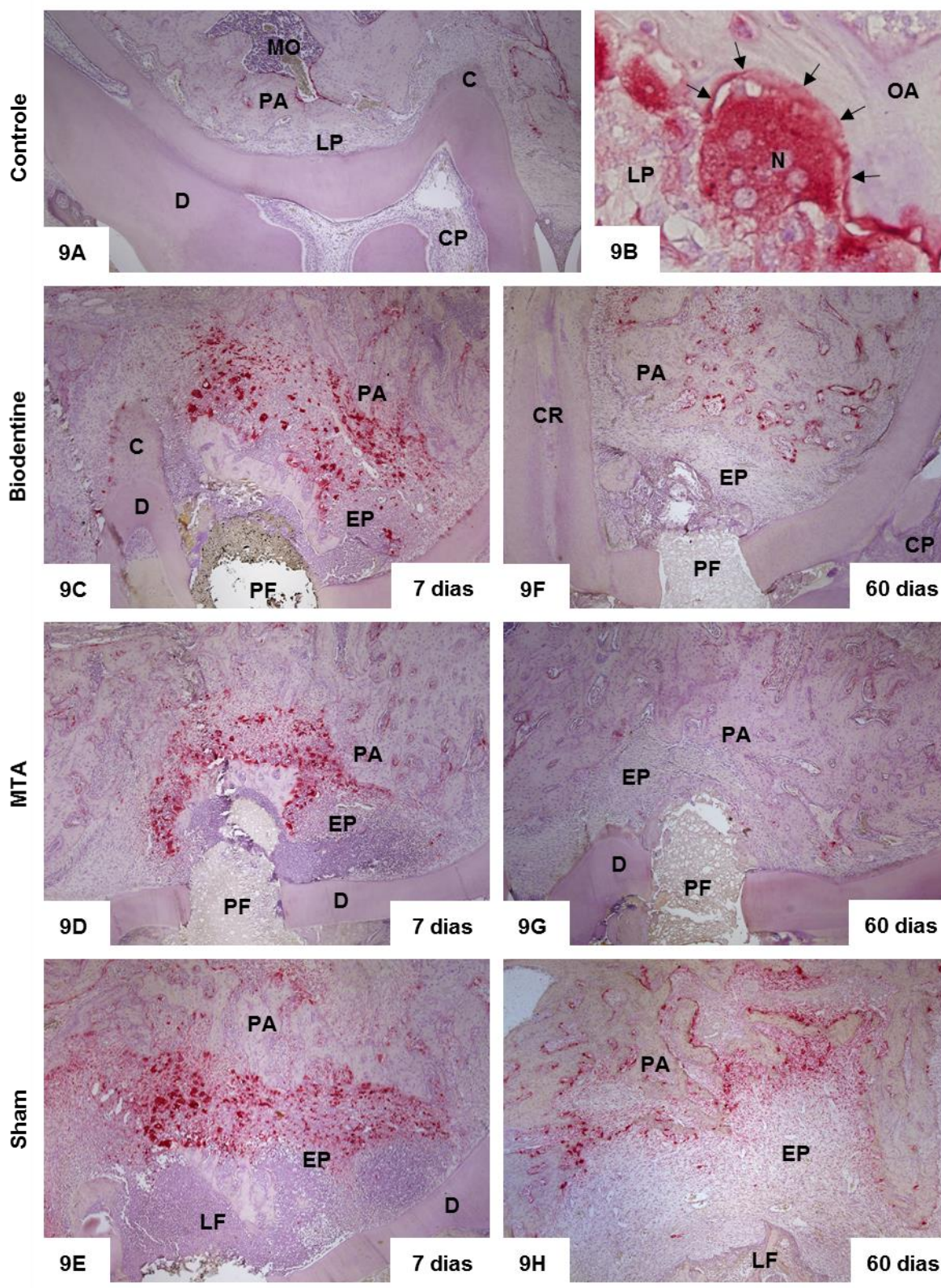
Comparação de cada grupo no decorrer do tempo é indicada por números sobrescritos nas colunas; mesmo número = sem diferença estatística.

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

Fonte: Elaboração própria.

5.6 Osteoclastos TRAP-Positivos na Superfície Óssea

A reação histoquímica para detecção da enzima TRAP evidenciou osteoclastos multinucleados exibindo citoplasma positivo à fosfatase ácida tartarato-resistente (em vermelho) na superfície do processo alveolar da região de furca dos molares de ratos. No grupo Controle (Figuras 9A e 9B), alguns osteoclastos foram observados na superfície óssea, justapostos às lacunas de Howship (Figura 9B). Em contraposição, numerosos osteoclastos foram observados próximos à superfície do processo alveolar inter-radicular dos molares dos grupos Biodentine, MTA e Sham 7 dias após perfuração do soalho da câmara pulpar (Figuras 9C-9E). Aos 60 dias, foi notada uma aparente redução na presença de osteoclastos na superfície do processo alveolar dos grupos Biodentine e MTA (Figuras 9F e 9G) enquanto que diversos osteoclastos estavam presentes no grupo Sham (Figura 9H).



Fonte: Elaboração própria.

Figuras 9A-9H – Fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas submetidos ao método TRAP e contracolorados com hematoxilina dos grupos Controle (Figuras 9A e 9B), Biodentine (Figuras 9C e 9F), MTA (Figuras 9D e 9G) e Sham (Figuras 9E e 9H) aos 7 dias (Figuras 9A-9E) e 60 dias (Figuras 9F-9H). A Figura 9A exibe poucos osteoclastos TRAP-positivos (em vermelho) na superfície óssea do processo alveolar (PA). Na Figura 9B, em aumento maior, um osteoclasto multinucleado (N) exibindo atividade positiva à fosfatase ácida tartarato-resistente em seu citoplasma (em vermelho) está adjacente à lacuna de Howship (setas) na superfície do osso alveolar (OA). Aos 7 dias (Figuras 9C-9E), diversos osteoclastos (em vermelho) são observados no espaço periodontal (EP) próximos à superfície do processo alveolar (PA). Aos 60 dias, poucos osteoclastos estão adjacentes à superfície óssea nos grupos Biodentine (Figura 9F) e MTA (Figura 9G) em comparação ao grupo Sham (Figura 9H). LP, ligamento periodontal; MO, medula óssea; PF, perfuração de furca; LF, lesão de furca; D, dentina; CP, câmara pulpar; CR, canal radicular; C, cimento. Figuras 9A, 9C-9H: 25x; Figura 9B: 465x.

De acordo com a Tabela 6, diferenças estatisticamente significantes não foram observadas no número de osteoclastos na superfície do processo alveolar dos grupos Controle ($p \geq 0,9997$) e Sham ($p \geq 0,1638$) no decorrer do tempo. Em todos os períodos, o número de osteoclastos foi estatisticamente superior no grupo Sham em comparação aos demais grupos ($p \leq 0,0003$). Em todos os períodos, os grupos Biodentine e MTA não apresentaram diferenças significantes entre si ($p \geq 0,9701$). Nos períodos de 30 e 60 dias, diferenças estatisticamente significantes não foram detectadas entre os grupos Biodentine, MTA e Controle ($p \geq 0,8933$).

O número de osteoclastos nos grupos Biodentine e MTA não mostrou diferenças significantes entre os períodos de 7 e 15 dias ($p \geq 0,845$ e $p \geq 0,692$, respectivamente) e de 30 para 60 dias ($p \geq 0,8267$ e $p \geq 0,9582$, respectivamente); em contraposição, redução significativa foi observada nos grupos Biodentine ($p = 0,0247$) e MTA ($p = 0,0206$) do período de 15 para o de 30 dias.

Tabela 6 – Número de osteoclastos por milímetro de superfície óssea nos grupos Biodentine, MTA, Sham e Controle após 7, 15, 30 e 60 dias

	Biodentine	MTA	Sham	Controle
7 dias	3,34 $\pm$ 0,47 ^{a,1}	3,31 $\pm$ 0,63 ^{a,1}	5,15 $\pm$ 0,64 ^{b,1}	1,49 $\pm$ 0,24 ^{c,1}
15 dias	3,00 $\pm$ 0,67 ^{a,1}	2,84 $\pm$ 0,87 ^{a,1}	5,46 $\pm$ 1,00 ^{b,1}	1,48 $\pm$ 0,19 ^{c,1}
30 dias	1,75 $\pm$ 0,74 ^{a,2}	1,57 $\pm$ 1,15 ^{a,2}	5,64 $\pm$ 0,76 ^{b,1}	1,46 $\pm$ 0,45 ^{a,1}
60 dias	1,39 $\pm$ 0,34 ^{a,2}	1,35 $\pm$ 0,33 ^{a,2}	4,75 $\pm$ 0,74 ^{b,1}	1,45 $\pm$ 0,20 ^{a,1}

Valores numéricos representam média $\pm$ desvio padrão.

Comparação entre os grupos no mesmo período é indicada por letras sobrescritas nas linhas; mesma letra = sem diferença estatística.

Comparação de cada grupo no decorrer do tempo é indicada por números sobrescritos nas colunas; mesmo número = sem diferença estatística.

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

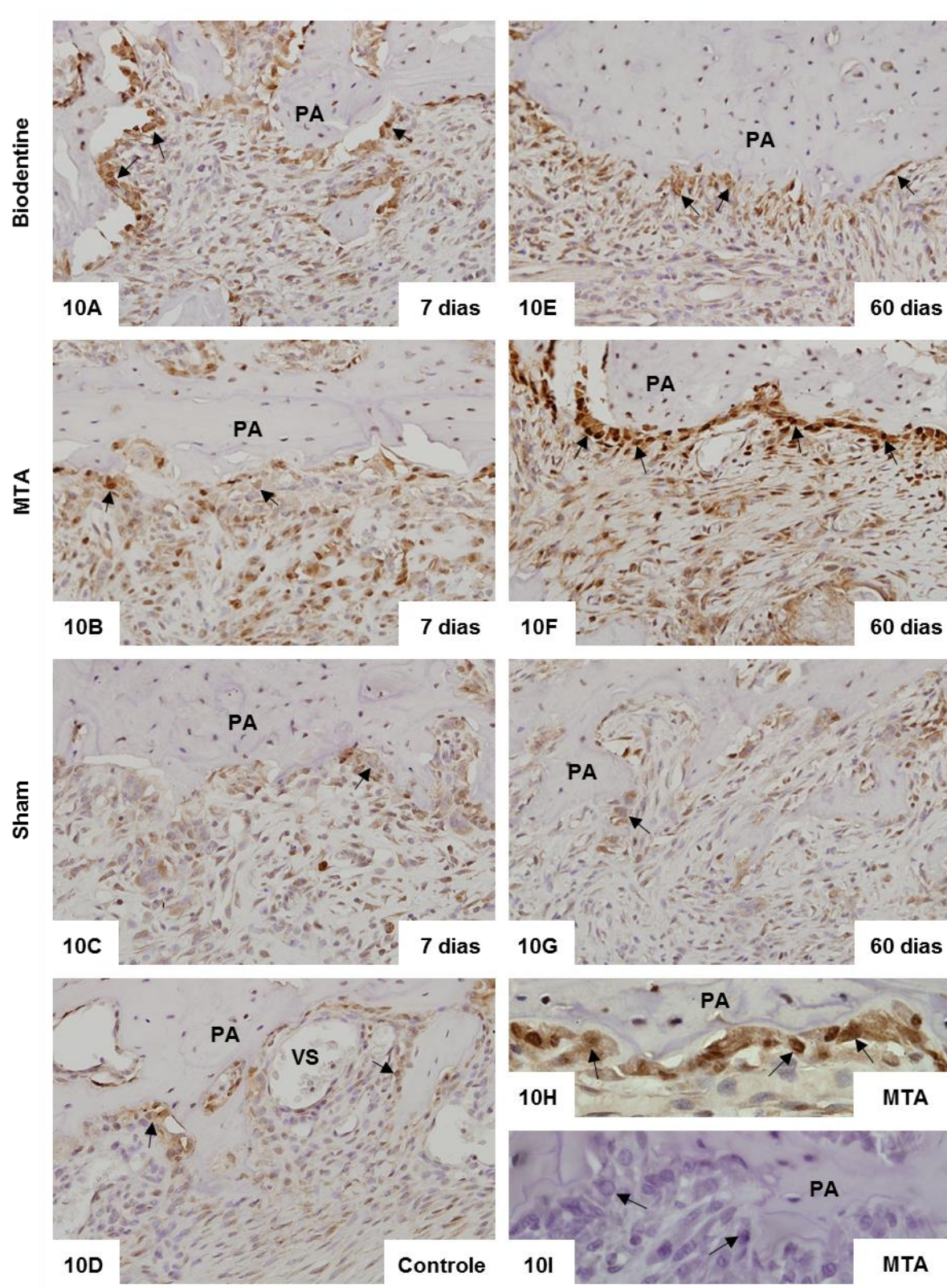
Fonte: Elaboração própria.

5.7 Número de Células Imunopositivas ao Osterix na Superfície Óssea

Os cortes submetidos à reação imuno-histoquímica para detecção de osterix revelaram osteoblastos imunopositivos justapostos à superfície do processo alveolar inter-radicular dos molares de ratos de todos os grupos (Figuras 10A-10H). Nos grupos Biodentine e MTA, uma contínua camada de células exibindo forte

positividade foi observada adjacente a algumas áreas do processo alveolar, tanto aos 7 (Figuras 10A-10B) quanto aos 60 dias (Figuras 10D-10E). No grupo Sham, poucas células imunopositivas estavam presentes na superfície óssea aos 7 dias (Figura 10C) e aos 60 dias (Figura 10F). Osteoblastos imunopositivos ao osterix revestindo a superfície do processo alveolar estavam presentes no periodonto do grupo Controle (Figuras 10G-10H). Os cortes usados como controle negativo da reação imuno-histoquímica não apresentaram células imunopositivas (Figura 10I).

A análise quantitativa (Tabela 7) revelou que no grupo Controle não foram detectadas diferenças significantes ($p \geq 0,9194$) no número de osteoblastos imunopositivos com o decorrer do tempo. Aos 7 dias, o mais alto número de células imunopositivas foi detectado no grupo Biodentine ($p < 0,0001$), enquanto diferenças significantes não foram observadas entre os grupos MTA e Controle ($p = 0,0532$). Aos 15 dias, não houve diferença entre os grupos Biodentine e Controle ($p = 0,8519$), enquanto o grupo MTA mostrou menor número de osteoblastos que ambos ($p \leq 0,0022$). No período de 30 dias, o número de células imunopositivas foi maior significativamente no grupo Biodentine em comparação ao grupo MTA ($p = 0,0024$) e ambos em relação ao grupo Controle ($p < 0,0001$). Diferenças significantes entre os grupos Biodentine e MTA não foram detectadas ($p = 0,3255$) no período de 60 dias; neste período, ambos apresentaram mais osteoblastos que o grupo Controle ($p < 0,0001$).



Fonte: Elaboração própria.

Figuras 10A-10I – Fotomicrografias de porções do periodonto subjacente à região de furca dos primeiros molares de ratos dos grupos Biodentine (Figuras 10A e 10E), MTA (Figuras 10B, 10F, 10H e 10I), Sham (Figuras 10C e 10G) e Controle (Figura 10D). Os cortes foram submetidos à reação imuno-histoquímica para detecção de osterix (em castanho) e contracolorados com hematoxilina. Os grupos Biodentine e MTA apresentam aos 7 (Figuras 10A e 10B, respectivamente) e 60 (Figuras 10E e 10F, respectivamente) dias diversos osteoblastos exibindo forte imunopositividade ao osterix (setas) na superfície do processo alveolar (PA) subjacente às perfurações de furca. Os grupos Sham (Figuras 10C e 10G) e Controle (Figura 10D) apresentam poucos osteoblastos imunopositivos (setas) na superfície do processo alveolar (PA). A Figura 10H mostra, em aumento maior, osteoblastos exibindo forte imunopositividade ao osterix (setas) na superfície do processo alveolar (PA). A Figura 10I mostra uma porção do corte incubado com soro não-imune (controle negativo) com osteoblastos (setas) na superfície óssea (PA). VS, vasos sanguíneos. Figuras 10A-10G: 175x; Figuras 10H e 10I: 350x.

Com relação à análise dos dados de cada grupo entre os períodos, diferenças significantes não foram observadas no grupo Biodentine entre os períodos de 7, 30 e 60 dias ($p \geq 0,1212$). O grupo MTA mostrou um aumento significativo no número de células positivas ao osterix ($p < 0,0001$) aos 30 e 60 dias em comparação aos 7 dias. De 7 para 15 dias, tanto o grupo Biodentine quanto o MTA apresentaram redução estatisticamente significativa ($p < 0,0001$); por outro lado, um aumento significativo foi observado no número de células imunopositivas ($p < 0,0001$) de 15 para 30 dias. De 7 para 60 dias, o grupo Sham apresentou uma redução significativa ($p = 0,0097$) no número de células osterix-positivas na superfície do processo alveolar.

Tabela 7 – Número de osteoblastos por milímetro de superfície óssea nos grupos Biodentine, MTA, Sham e Controle após 7, 15, 30 e 60 dias

	Biodentine	MTA	Sham	Controle
7 dias	34,23 ± 2,58 ^{a,1}	26,99 ± 2,83 ^{b,1}	9,89 ± 1,21 ^{c,1}	23,79 ± 2,30 ^{b,1}
15 dias	24,30 ± 2,27 ^{a,2}	18,75 ± 0,80 ^{b,2}	7,45 ± 1,99 ^{c,1-2}	23,32 ± 2,40 ^{a,1}
30 dias	35,99 ± 1,30 ^{a,1}	31,46 ± 2,01 ^{b,3}	6,91 ± 1,74 ^{c,1-2}	23,21 ± 1,41 ^{d,1}
60 dias	37,14 ± 1,62 ^{a,1}	39,23 ± 2,19 ^{a,4}	5,65 ± 0,78 ^{b,2}	22,97 ± 2,02 ^{c,1}

Valores numéricos representam média ± desvio padrão.

Comparação entre os grupos no mesmo período é indicada por letras sobrescritas nas linhas; mesma letra = sem diferença estatística.

Comparação de cada grupo no decorrer do tempo é indicada por números sobrescritos nas colunas; mesmo número = sem diferença estatística.

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

Fonte: Elaboração própria.

5.8 Conteúdo de Colágeno Birrefringente

No grupo Controle, o ligamento periodontal subjacente à região de furca dos molares continha diversos feixes de colágeno birrefringente (Figuras 11A e 11B). No período de 7 dias, extensas áreas do espaço periodontal subjacente às perfurações nos molares dos grupos experimentais (Biodentine, MTA e Sham) não apresentaram material birrefringente (Figuras 11C-11E). Após 60 dias ao selamento, as áreas não birrefringentes no espaço periodontal subjacentes às perfurações dos grupos Biodentine e MTA apresentaram-se bem delimitadas e aparentemente menores

(Figuras 11F e 11G) em comparação ao período inicial (Figuras 11C e 11D). No grupo Sham, subjacente às perfurações foram observadas extensas áreas com ausência de material birrefringente (Figura 11H).

A análise quantitativa (Tabela 8) revelou que o grupo Controle, em todos os períodos, apresentou o conteúdo de colágeno birrefringente significativamente maior em comparação aos demais grupos ($p \leq 0,0022$). Além disso, diferenças significantes no conteúdo de colágeno no grupo Controle não foram detectadas no decorrer do tempo ($p \geq 0,317$). Nos períodos de 15, 30 e 60 dias, o conteúdo de colágeno no grupo Sham foi significativamente menor ($p \leq 0,0012$) em comparação aos demais grupos.

Aos 7 dias, diferença significativa não foi verificada entre os grupos Biodentine e Sham ($p = 0,8303$). Diferenças significantes não foram observadas aos 7 dias ($p = 0,1205$) e 15 dias ($p = 0,3908$) entre os grupos Biodentine e MTA. No entanto, no grupo MTA aos 30 dias ($p < 0,0001$) e 60 dias ($p = 0,0003$) o conteúdo de colágeno foi significativamente maior em relação ao grupo Biodentine, embora significativamente menor ($p < 0,0001$) em comparação ao grupo Controle.

Tabela 8 – Conteúdo de colágeno birrefringente (em porcentagem) nos grupos Biodentine, MTA, Sham e Controle após 7, 15, 30 e 60 dias

	Biodentine	MTA	Sham	Controle
7 dias	0,78 ± 0,11 ^{a-b,1}	2,24 ± 0,88 ^{a,1}	0,23 ± 0,17 ^{b,1}	27,14 ± 0,98 ^{c,1}
15 dias	4,41 ± 0,52 ^{a,2}	5,44 ± 1,54 ^{a,2}	1,89 ± 0,77 ^{b,1}	27,59 ± 1,64 ^{c,1}
30 dias	16,21 ± 0,68 ^{a,3}	19,57 ± 0,77 ^{b,3}	6,51 ± 1,24 ^{c,2}	27,85 ± 1,23 ^{d,1}
60 dias	23,03 ± 0,65 ^{a,4}	25,84 ± 0,68 ^{b,4}	10,54 ± 1,83 ^{c,3}	28,25 ± 0,80 ^{d,1}

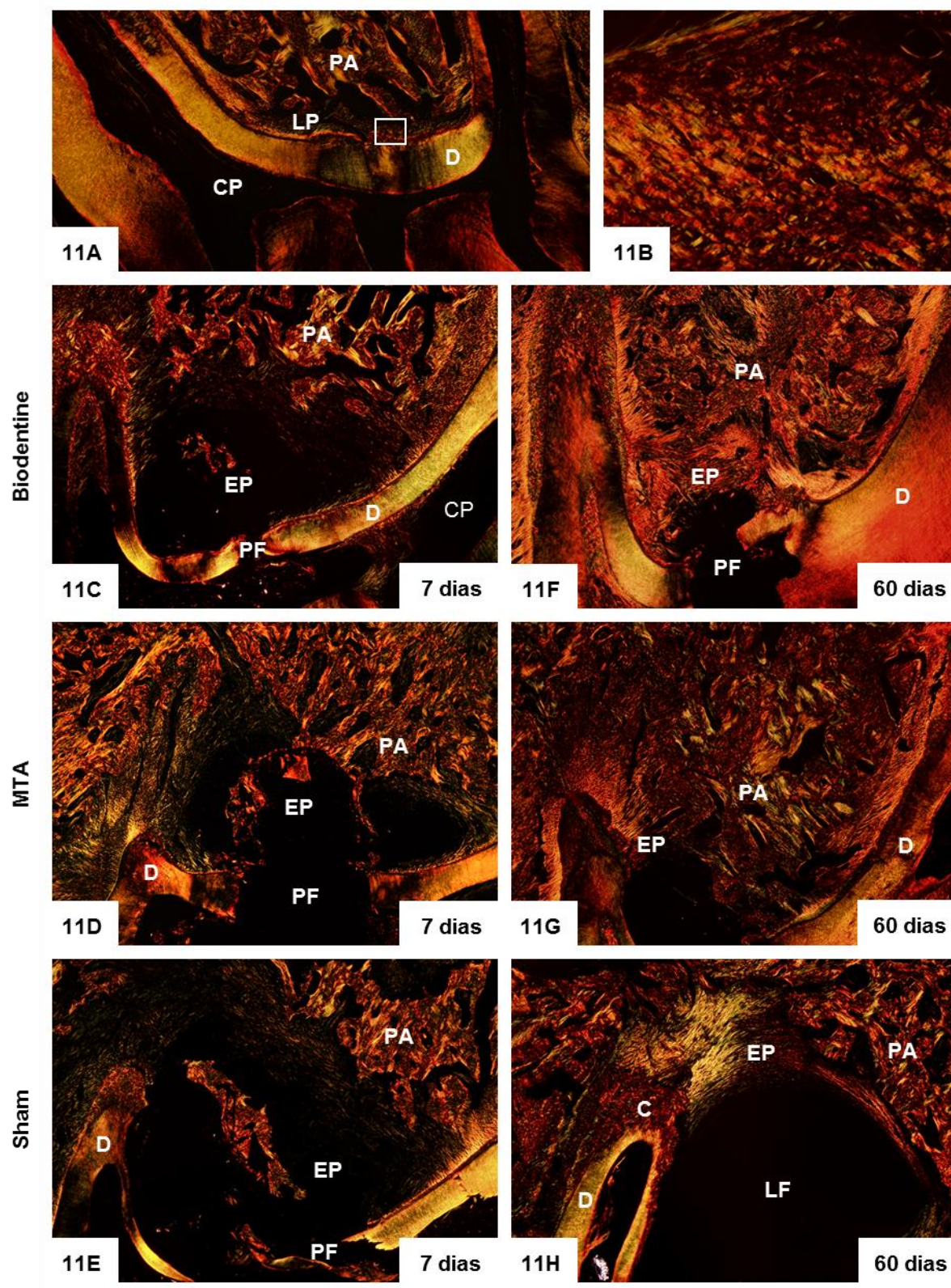
Valores numéricos representam média ± desvio padrão.

Comparação entre os grupos no mesmo período é indicada por letras sobscritas nas linhas; mesma letra = sem diferença estatística.

Comparação de cada grupo no decorrer do tempo é indicada por números sobscritos nas colunas; mesmo número = sem diferença estatística.

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

Fonte: Elaboração própria.



Fonte: Elaboração própria.

Figuras 11A-11H – Fotomicrografias de cortes sagitais de maxilas dos grupos Controle (Figuras 11A e 11B), Biodentine (Figuras 11C e 11F), MTA (Figuras 11D e 11G) e Sham (Figuras 11E e 11H) aos 7 (Figuras 11A-11E) e 60 (Figuras 11F-11H) dias. Os cortes foram corados com picrosirius e analisados com microscópio com luz polarizada. A Figura 11A mostra o ligamento periodontal (LP) preenchendo o espaço entre o processo alveolar (PA) e a superfície externa da raiz na região de furca do molar. Inúmeros feixes de fibras colágenas birrefringentes (em vermelho-alaranjado) estão presentes no ligamento periodontal (LP). O processo alveolar (PA) exibe evidente birrefringência. A Figura 11B, área delimitada em 11A, é uma imagem representativa da área usada para quantificação de colágeno birrefringente. Note a presença de espessos feixes de colágeno birrefringente no ligamento periodontal. Aos 7 dias (Figuras 11C-11E), pouco material birrefringente é observado no espaço periodontal (EP) ampliado, na região subjacente às perfurações de furca (PF). O processo alveolar (PA) reabsorvido apresenta contorno irregular. No período de 60 dias, os grupos Biodentine (Figura 11F) e MTA (Figura 11G) apresentam, subjacentemente à região de furca (áreas em preto), colágeno birrefringente. No grupo Sham (Figura 11H) uma extensa área não birrefringente é observada na região de furca; esta área estende-se até a superfície do cimento celular (C) do terço apical da raiz distal, indicando uma lesão de furca (LF). D, dentina; CP; câmara pulpar. Figuras 11A e 11C-11H: 25x; Figura 11B: 350x.

6 DISCUSSÃO

A perfuração de furca é uma condição prejudicial a qual gera danos aos tecidos periodontais adjacentes devido ao estabelecimento de uma intensa reação inflamatória. Os nossos resultados indicam que a perda do processo alveolar ocorre de maneira rápida e independentemente do selamento realizado ou não da perfuração do soalho da câmara pulpar, uma vez que diferenças significantes não foram detectadas no espessamento do espaço periodontal entre os grupos experimentais nos períodos de 7 e 15 dias. No entanto, com o decorrer do tempo o selamento com Biodentine ou MTA exerce um papel significativo na modulação da resposta inflamatória e da perda óssea do processo alveolar inter-radicular, desde que diferenças significantes no número de células inflamatórias e osteoclastos não foram observadas nos grupos Biodentine e MTA em comparação ao grupo controle aos 30 e 60 dias.

No que se refere aos efeitos sistêmicos, não foram encontrados na literatura relatos quanto ao estudo de alterações hepáticas e/ou renais induzidas por Biodentine ou MTA quando utilizados na simulação clínica do selamento de perfurações de furca em molares de ratos. De modo geral, os materiais em estudo não apresentaram respostas sistêmicas adversas em níveis sorológicos hepáticos, uma vez que não houve diferença significativa quando os subgrupos foram comparados com o padrão de referência. No entanto, o nível de TGO apresentou-se mais elevado no grupo MTA aos 60 dias em comparação aos períodos anteriores deste grupo e também aos demais grupos, semelhantemente ao observado em estudos prévios com implantação deste cimento em subcutâneo de ratos^{101,102}. Porém, ao contrário de um trabalho prévio¹⁰¹, nossos resultados mostraram que não houve alteração nos níveis de TGP no grupo MTA. Ambas as aminotransferases são enzimas indicadoras de possível lesão ou necrose de hepatócitos^{107,111}. Assim, é provável que o MTA em contato com os tecidos periodontais no selamento de perfuração de furca de molares de ratos possa ter levado ao acúmulo de partículas no fígado resultantes da solubilidade destes cimentos. Quanto às funções renais, foi observada maior quantidade de creatinina sérica no grupo Biodentine aos 60 dias. Além disso, nossos resultados mostraram também maior quantidade de ureia nos grupos Biodentine e MTA aos 7 dias em comparação aos valores de referência, semelhantemente ao observado para o MTA previamente^{101,102}.

Uma provável explicação para as alterações séricas hepáticas e renais pode ser a liberação de metais como o arsênio^{71,128-130} e o alumínio^{104,105} pelos cimentos. Quando em contato com os fluidos teciduais, metais liberados pelos cimentos podem se acumular nos órgãos e, possivelmente, induzir alterações estruturais e bioquímicas^{101,102,105,131,132}. Considerando-se que a dose letal de arsênio administrada oralmente é de 2 a 3 mg/kg de peso corporal, a dose tóxica para um adulto de 70 kg seria de 140 a 210 mg¹³³; uma vez que menos de 1 g de cimento é utilizado rotineiramente no selamento de perfurações de furca, a quantidade de arsênio liberada pelo MTA¹²⁸ é muito menor que a dose tóxica. Apesar de os dados encontrados em modelos animais não poderem ser imediatamente extrapolados para a prática clínica, estes resultados preliminares podem conduzir ao futuro estudo da toxicidade dos materiais reparadores em humanos.

No presente estudo, o Biodentine induziu intensa resposta inflamatória no ligamento periodontal subjacente às perfurações, com número de células inflamatórias significativamente maior em comparação ao MTA. Uma reação inflamatória inicial mais acentuada deste cimento em comparação ao MTA foi também reportada em implantes no subcutâneo de ratos^{27,83}. Esta reação tecidual distinta inicialmente tem sido atribuída à composição química e propriedades físico-químicas destes materiais levando a uma resposta imuno-inflamatória diferencial do hospedeiro.

Apesar de ambos os materiais serem compostos principalmente por silicato tricálcico⁷¹, o radiopacificador do Biodentine é o óxido de zircônio⁸⁰, enquanto o do MTA é o óxido de bismuto²². O cimento Portland (CP) associado ao óxido de zircônio induz uma reação inflamatória menor em comparação ao CP associado ao óxido de bismuto indicando, portanto, que o óxido de zircônio proporciona menor agressão aos tecidos⁵². Assim, não é provável que o radiopacificador do Biodentine seja responsável pela maior intensidade inicial da resposta inflamatória. No entanto, o líquido do Biodentine é composto por água destilada, cloreto de cálcio e um polímero hidrossolúvel com efeito redutor de água^{76,88}, enquanto que o líquido do MTA é água destilada^{31,32}. Há evidência de que o cloreto de cálcio, um acelerador da reação de presa⁵⁵, adicionado ao MTA reduz a viabilidade e adesão de células da linhagem MG-63 de osteossarcoma humano¹³⁴. Deste modo, a composição do líquido do Biodentine pode ser responsável, pelo menos em parte, pela reação inflamatória mais intensa no período de 7 dias.

Além disso, o Biodentine apresenta maior solubilidade no período de 7 dias após a reação de presa em comparação ao MTA^{135,136}. Os efeitos biológicos dos cimentos à base de silicato de cálcio são devidos à sua dissolução superficial quando expostos a fluidos biológicos, resultando na liberação de íons por difusão no meio extracelular e afetando diversos tipos celulares com potencial impacto do desenvolvimento de fenótipos específicos¹³⁷. As partículas liberadas e os íons difundidos nos tecidos estimulam a liberação de citocinas e o recrutamento de células inflamatórias para o local agredido^{94,98}. Dentre as diversas citocinas pró-inflamatórias, há evidência de que a IL-6 exerce um papel importante na instalação da reação inflamatória ao estimular a quimiotaxia de neutrófilos¹³⁸. O processamento proteolítico do receptor IL-6R pelos neutrófilos recrutados induz a trans-sinalização de IL-6 em células residentes dos tecidos, consequentemente levando a uma supressão do recrutamento de neutrófilos e aumento do recrutamento de monócitos^{138,139}.

A forte correlação positiva encontrada entre a redução da reação inflamatória e a imunoexpressão para IL-6 nas cápsulas adjacentes aos implantes de Biodentine e MTA no subcutâneo de ratos²⁷ indica que esta citocina constitui um dos parâmetros que refletem a intensidade do processo inflamatório. Além de exercer um papel modulador do processo inflamatório, a IL-6 é uma citocina envolvida no processo de reabsorção óssea^{125,140}. A IL-6 estimula a formação e atividade de osteoclastos na lesão periapical^{141–144}, na doença periodontal^{125,145–149} e na artrite reumatoide^{150–153}. Nossos resultados mostraram que nos períodos iniciais o Biodentine induziu maior imunoexpressão de IL-6 em comparação com o MTA, semelhantemente ao observado em relação ao número de células inflamatórias. No entanto, ambos os grupos apresentaram nítida redução na imunoexpressão para IL-6 paralelamente à redução do número de células inflamatórias no decorrer do tempo. Estes dados são similares ao previamente reportado pelo nosso grupo na análise da biocompatibilidade destes cimentos em subcutâneo de ratos²⁷.

A quantidade pronunciada de osteoclastos explicita a intensa reabsorção óssea na região de furca dos molares com perfuração do soalho da câmara pulpar, levando à perda do processo alveolar e, consequentemente, ao espessamento do espaço periodontal nos períodos iniciais. Embora diferenças significantes não tenham sido detectadas no número de osteoclastos entre os grupos Biodentine e MTA, nossos resultados mostraram que a perda óssea observada no grupo

Biodentine foi inicialmente mais rápida e significativa em comparação ao grupo MTA. De fato, aos 7 dias o espaço periodontal dos molares do grupo Biodentine apresentou-se maior significativamente em comparação ao grupo MTA. Assim, estes resultados sugerem que o MTA deve pelo menos em parte inibir a atividade reabsortiva dos osteoclastos.

Considerando que diferenças significantes não foram detectadas na quantidade de osteoclastos, é possível que a perda óssea mais evidente observada no grupo Biodentine aos 7 dias seja reflexo de uma maior atividade reabsortiva dos osteoclastos deste grupo. Há evidências de que o tamanho dos osteoclastos bem como o número de núcleos por célula e a relação da superfície de contato do osteoclasto/superfície óssea são parâmetros diretamente associados com sua atividade reabsortiva^{154,155}. Portanto, é possível que a perda óssea mais acentuada no grupo Biodentine seja em decorrência de diferenças estruturais e funcionais dos osteoclastos que refletiram em sua atividade reabsortiva.

A IL-6 produzida e liberada pelas células inflamatórias, células endoteliais, fibroblastos e osteoblastos estimula a produção de RANKL^{125,140,156} o qual, quando acoplado ao receptor RANK presente nos precursores de osteoclastos, estimula a fusão e diferenciação destes assumindo, portanto, um papel fundamental na formação e diferenciação de osteoclastos^{125,157,158}. Considerando que a alta imunoexpressão para IL-6 foi acompanhada pelo aumento significativo no número de osteoclastos TRAP-positivos na superfície do processo alveolar nos períodos de 7 e 15 dias, é possível sugerir que a reabsorção do processo alveolar subjacente às perfurações do soalho da câmara pulpar é mediada pela IL-6. Esta ideia é reforçada desde que no grupo Sham, aos 60 dias, o elevado número de células IL-6-imunopositivas foi acompanhado pela marcante presença de osteoclastos, culminando com um aumento significativo do espaço periodontal.

Adicionalmente, nossos resultados indicam que houve diminuição da reabsorção do processo alveolar subjacente aos molares selados com os materiais reparadores, desde que não houve diferença significativa no número de osteoclastos entre os grupos Biodentine, MTA e Controle aos 30 e 60 dias. A regressão do infiltrado inflamatório e da imunoexpressão de IL-6 no decorrer do tempo nos grupos Biodentine e MTA devem ser responsáveis pela redução no número de osteoclastos e, conseqüentemente, pela diminuição na reabsorção óssea. Além disso, a significativa redução na espessura do espaço periodontal nos grupos Biodentine e

MTA detectada aos 60 dias, em comparação aos 15 dias, indica que a diminuição da reabsorção óssea foi acompanhada pela neoformação de matriz óssea no processo alveolar inter-radicular. De fato, um aumento expressivo no número de osteoblastos imunopositivos ao osterix foi observado na superfície óssea do processo alveolar nos grupos Biodentine e MTA, em relação aos grupos Controle e Sham.

O osterix possui papel fundamental na formação óssea¹⁵⁹, uma vez que é um fator de transcrição da diferenciação e atividade de osteoblastos^{160,161}. Dessa maneira, o Biodentine e o MTA induzem a diferenciação e a atividade de osteoblastos exibindo, portanto, um potencial osteogênico. Embora, aos 60 dias, nos grupos Biodentine e MTA o espaço periodontal ainda estivesse ampliado em comparação com o grupo Controle, a persistência da alta expressão de osterix e a baixa quantidade de osteoclastos indicam que os tecidos periodontais estavam em processo de reparo.

Há evidências de que o Biodentine e o MTA induzem a reparação de tecidos mineralizados, estimulando a proliferação vascular e a diferenciação celular^{19,162,163}. Células pulpares de dentes humanos cultivadas com Biodentine e MTA apresentaram um aumento na liberação de fator de crescimento transformante β -1 (TGF- β 1)⁷⁰, o qual estimula a diferenciação de osteoblastos¹⁶⁴. Células Saos-2 exibiram expressão acentuada de proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), fator também envolvido na diferenciação de osteoblastos, quando foram cultivadas com Biodentine e MTA⁸⁹. A proliferação e diferenciação de osteoblastos podem ser induzidas tanto por altos níveis de cálcio extracelular¹⁶⁵⁻¹⁶⁸ quanto pela alcalinidade do meio^{169,170}. Este potencial osteogênico tem sido atribuído à liberação de íons cálcio^{49,171} e ao pH alcalino^{171,172} dos cimentos à base de silicato de cálcio. É possível que a maior quantidade de cálcio liberada pelo Biodentine em comparação ao MTA⁴⁹ possa explicar o número significativamente maior de osteoblastos osterix-imunopositivos na superfície óssea aos 7, 15 e 30 dias neste grupo. Aos 60 dias, o número elevado de osteoblastos concomitante ao número reduzido de osteoclastos sugere que o Biodentine e o MTA usados no selamento de perfurações de furca estimulam a diferenciação de osteoblastos e, conseqüentemente, a formação óssea do processo alveolar, favorecendo, portanto, o reparo dos tecidos periodontais. De fato, a significativa redução da espessura do espaço periodontal nos grupos Biodentine e MTA aos 60 dias em comparação ao período de 15 dias suporta esta ideia.

O aumento significativo na frequência de fibroblastos e do conteúdo de colágeno birrefringente concomitantemente à significativa redução no número de células inflamatórias no espaço periodontal dos grupos Biodentine e MTA apontam para uma reorganização do ligamento periodontal. Estudos usando culturas de fibroblastos em contato com o Biodentine e com o MTA têm demonstrado baixa citotoxicidade, possibilitando a proliferação e adesão celular^{29,173-177}. Fibroblastos do ligamento periodontal humano em contato com MTA apresentaram um aumento da expressão do gene COL 1¹⁷⁸, sugerindo que este cimento deve estimular a formação de colágeno tipo I. O MTA usado no selamento de perfurações de furca em molares de ratos favoreceu a regressão do processo inflamatório inicialmente instalado no espaço periodontal e estimulou a formação de feixes de colágeno¹⁵. Em subcutâneo de ratos, o MTA também induz a proliferação de fibroblastos e, conseqüentemente, a formação de uma cápsula delgada de colágeno²⁸. No presente estudo, o aumento significativo de fibroblastos e de colágeno foi acompanhado pela redução significativa de células inflamatórias, indicando que os materiais à base de silicato de cálcio, no decorrer do tempo, devem inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a IL-6, contribuindo para a regressão do processo inflamatório. Concomitantemente, o Biodentine e o MTA estimulam a expressão de fatores que atuam na proliferação e diferenciação celular, promovendo a neoformação de componentes estruturais dos tecidos, dentre eles o colágeno.

O tratamento mais indicado de perfurações é o selamento imediato com um material biocompatível o qual seja insolúvel frente aos fluidos teciduais e também que permita a regeneração dos tecidos adjacentes¹³. Nossos dados corroboram que o selamento das perfurações com ambos os cimentos à base de silicato tricálcico possibilitou uma modulação da resposta inflamatória no decorrer do tempo. Sem adequado selamento da perfuração, como observado no grupo Sham, esta complicação provoca a destruição contínua dos tecidos de suporte do dente, levando à potencial perda do elemento dentário. Além da reação inflamatória, nos períodos iniciais é nítida a desorganização dos tecidos periodontais e a exacerbada desestruturação do conteúdo de colágeno, evidenciadas pela intensa redução da porcentagem de colágeno birrefringente nos grupos submetidos às perfurações. No decorrer do tempo, a regressão do processo inflamatório e o aumento da quantidade de fibroblastos com conseqüente síntese de colágeno, como observado nos nossos resultados, são indicativos da compatibilidade biológica dos cimentos^{28,179,180}, além

da tendência ao reparo dos tecidos periodontais.

Nos períodos de 30 e 60 dias não houve diferença significativa entre ambos os cimentos de maneira geral, sugerindo que a reação dos materiais antes da presa levou a uma resposta tecidual mais acentuada. Ambos os cimentos apresentam solubilidade semelhante a partir de 30 dias¹³⁵, o que pode justificar a ausência de diferença na resposta biológica a estes materiais nos períodos de 30 e 60 dias. Além disso, com o passar do tempo, os grupos tratados com estes materiais apresentaram significativa redução de osteoclastos, concomitantemente ao elevado número de osteoblastos, indicando que a neoformação óssea na região de furca deve ser mais expressiva que a destruição. Esta ideia é reforçada desde que aos 60 dias uma redução significativa do espaço periodontal foi observada nos grupos Biodentine e MTA em comparação aos períodos iniciais. Estes achados são compatíveis com a condição de reparo tecidual almejado no selamento de perfurações de furca.

7 CONCLUSÃO

- Os dados bioquímicos indicam que Biodentine e MTA não devem induzir alterações hepáticas no decorrer do tempo. Por outro lado, a alteração na concentração de creatinina no grupo Biodentine sugere que este cimento pode promover alterações renais;
- As perfurações do soalho da câmara pulpar causam intensa agressão ao periodonto subjacente, mas os materiais reparadores foram capazes de amenizar os danos aos tecidos periodontais;
- Biodentine e MTA modulam a resposta imunoinflamatória no decorrer do tempo;
- Com o decorrer do tempo, ambos os cimentos reduzem o número de osteoclastos e, conseqüentemente, diminuem a reabsorção óssea na região interradicular;
- Biodentine e MTA estimulam a diferenciação de osteoblastos favorecendo a formação óssea no processo alveolar inicialmente reabsorvido.

REFERÊNCIAS*

1. Carrol L. Alice no País das Maravilhas. São Paulo: Cosac Naify; 2009.
2. Alhadainy HA. Root perforations. A review of literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994; 78(3): 368–74.
3. Tsesis I, Fuss Z. Diagnosis and treatment of accidental root perforations. Endod Top. 2006; 13(1): 95–107.
4. Jew RC, Weine FS, Keene JJ, Smulson MH. A histologic evaluation of periodontal tissues adjacent to root perforations filled with Cavit. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1982; 54(1): 124–35.
5. Martin LR, Gilbert B, Dickerson AW. Management of endodontic perforations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1982; 54(6): 668–77.
6. Petersson K, Hasselgren G, Tronstad L. Endodontic treatment of experimental root perforations in dog teeth. Endod Dent Traumatol. 1985; 1(1): 22–8.
7. Holland R, Bisco Ferreira L, de Souza V, Otoboni Filho JA, Murata SS, Dezan E. Reaction of the lateral periodontium of dogs' teeth to contaminated and noncontaminated perforations filled with mineral trioxide aggregate. J Endod. 2007; 33(10): 1192–7.
8. Meister F, Lommel TJ, Gerstein H, Davies EE. Endodontic perforations which resulted in alveolar bone loss. Report of five cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1979; 47(5): 463–70.
9. Seltzer S, Sinai I, August D. Periodontal effects of root perforations before and during endodontic procedures. J Dent Res. 1970; 49(2): 332–9.
10. Sinai IH. Endodontic perforations: their prognosis and treatment. J Am Dent Assoc. 1977; 95(1): 90–5.

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

11. Bhaskar SN, Rappaport HM. Histologic evaluation of endodontic procedures in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1971; 31(4): 526–35.
12. Samiee M, Eghbal MJ, Parirokh M, Abbas FM, Asgary S. Repair of furcal perforation using a new endodontic cement. *Clin Oral Investig*. 2010; 14(6): 653–8.
13. Mente J, Hage N, Pfefferle T, Koch MJ, Geletneky B, Dreyhaupt J, et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate: repair of root perforations. *J Endod*. 2010; 36(2): 208–13.
14. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod*. 2010; 36(3): 400–13.
15. 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.
16. Katsamakis S, Slot DE, Van der Sluis LWM, Van der Weijden F. Histological responses of the periodontium to MTA: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2013; 40(4): 334–44.
17. About I. Biodentine: from biochemical and bioactive properties to clinical applications. *G Ital Endod*. 2016; 30(2): 81–8.
18. Bakhtiar H, Mirzaei H, Bagheri MR, Fani N, Mashhadiabbas F, Baghaban Eslaminejad M, et al. Histologic tissue response to furcation perforation repair using mineral trioxide aggregate or dental pulp stem cells loaded onto treated dentin matrix or tricalcium phosphate. *Clin Oral Investig*. 2017; 21(5): 1579–88.
19. Silva LAB, Pieroni KAMG, Nelson-Filho P, Silva RAB, Hernández-Gatón P, Lucisano MP, et al. Furcation perforation: periradicular tissue response to Biodentine as a repair material by histopathologic and indirect immunofluorescence analyses. *J Endod*. 2017; 43(7): 1137–42.

20. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod*. 1993; 19(11): 541–4.
21. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis R V, Ford TRP. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater*. 2005; 21(4): 297–303.
22. 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.
23. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2005; 31(2): 97–100.
24. 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.
25. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*. 2010; 36(2): 190–202.
26. 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.
27. da Fonseca TS, da Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. *In vivo* evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J*. 2016; 49(2): 145–53.
28. Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, da Fonseca TS, Bernardi MIB, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, et al. Zirconium oxide and niobium oxide used as radiopacifiers in a calcium silicate-based material stimulate fibroblast proliferation and collagen formation. *Int Endod J*. 2017; 50(S2): e95–108.

29. Zhou H, Shen Y, Wang Z, Li L, Zheng Y, Häkkinen L, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod*. 2013; 39(4): 478–83.
30. Rodrigues EM, Cornélio ALG, Mestieri LB, Fuentes ASC, Salles LP, Rossa-Junior C, et al. Human dental pulp cells response to mineral trioxide aggregate (MTA) and MTA Plus: cytotoxicity and gene expression analysis. *Int Endod J*. 2017; 50(8): 780–9.
31. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 2010; 36(1): 16–27.
32. 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.
33. Tawil PZ, Duggan DJ, Galicia JC. Mineral trioxide aggregate (MTA): its history, composition, and clinical applications. *Compend Contin Educ Dent*. 2015; 36(4): 247-52.
34. Kundzina R, Stangvaltaite L, Eriksen HM, Kerosuo E. Capping carious exposures in adults: a randomized controlled trial investigating mineral trioxide aggregate versus calcium hydroxide. *Int Endod J*. 2017; 50(10): 924–32.
35. De Rossi A, Silva LAB, Gatón-Hernández P, Sousa-Neto MD, Nelson-Filho P, Silva RAB, et al. Comparison of pulpal responses to pulpotomy and pulp capping with biodentine and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod*. 2014; 40(9): 1362–9.
36. Tran X V, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res*. 2012; 91(12): 1166–71.
37. Çalışkan MK, Güneri P. Prognostic factors in direct pulp capping with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide: 2- to 6-year follow-up. *Clin Oral Investig*. 2017; 21(1): 357–67.

38. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2013; 39(6): 743–7.
39. Daltoé MO, Paula-Silva FWG, Faccioli LH, Gatón-Hernández PM, De Rossi A, Bezerra Silva LA. Expression of mineralization markers during pulp response to Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. 2016; 42(4): 596–603.
40. Lee H, Shin Y, Kim S-O, Lee H-S, Choi H-J, Song JS. Comparative study of pulpal responses to pulpotomy with ProRoot MTA, RetroMTA, and TheraCal in dogs' teeth. *J Endod*. 2015; 41(8): 1317–24.
41. Bonte E, Beslot A, Boukpepsi T, Lasfargues J-J. MTA versus Ca(OH)₂ in apexification of non-vital immature permanent teeth: a randomized clinical trial comparison. *Clin Oral Investig*. 2015; 19(6): 1381–8.
42. Chen I, Karabucak B, Wang C, Wang H-G, Koyama E, Kohli MR, et al. Healing after root-end microsurgery by using Mineral Trioxide Aggregate and a new calcium silicate-based bioceramic material as root-end filling materials in dogs. *J Endod*. 2015; 41(3): 389–99.
43. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2007; 40(6): 462–70.
44. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Characterization of un-hydrated and hydrated BioAggregate™ and MTA Angelus™. *Clin Oral Investig*. 2015; 19(3): 689–98.
45. Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Investig*. 2015; 19(8): 2015–25.
46. Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, de Araújo Lopes JM, Penha de Oliveira SH, Sivieri Araújo G, et al. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *J Endod*. 2017; 43(5): 774–8.

47. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*. 1999; 25(3): 161–6.
48. Hashiguchi D, Fukushima H, Nakamura M, Morikawa K, Yasuda H, Udagawa N, et al. Mineral trioxide aggregate solution inhibits osteoclast differentiation through the maintenance of osteoprotegerin expression in osteoblasts. *J Biomed Mater Res Part A*. 2011; 96A(2): 358–64.
49. Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J*. 2013; 46(9): 808–14.
50. Han L, Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int Endod J*. 2011; 44(12): 1081–7.
51. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int Endod J*. 2010; 43(10): 917–29.
52. Silva GF, Bosso R, Ferino R V, Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: Evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102(12): 4336–45.
53. Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Saghiri MA, et al. Influence of white versus gray Mineral Trioxide Aggregate on inflammatory cells. *J Endod*. 2008; 34(6): 715–7.
54. Silva MJB, Vieira LQ, Sobrinho APR. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105(5): e70–6.
55. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod*. 2006; 32(6): 569–72.

56. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FLC, Duarte MAH, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(1): 83–90.
57. Vallés M, Mercadé M, Duran-Sindreu F, Bourdelande JL, Roig M. Influence of light and oxygen on the color stability of five calcium silicate-based materials. *J Endod*. 2013; 39(4): 525–8.
58. Marciano MA, Costa RM, Camilleri J, Mondelli RFL, Guimarães BM, Duarte MAH. Assessment of color stability of white Mineral Trioxide Aggregate Angelus and bismuth oxide in contact with tooth structure. *J Endod*. 2014; 40(8): 1235–40.
59. Coomaraswamy KS, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radioopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) system. *J Endod*. 2007; 33(3): 295–8.
60. Grazziotin-Soares R, Nekoofar MH, Davies TE, Bafail A, Alhaddar E, Hübler R, et al. Effect of bismuth oxide on white mineral trioxide aggregate: chemical characterization and physical properties. *Int Endod J*. 2014; 47(6): 520–33.
61. Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2004; 37(10): 699–704.
62. Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. The effect of curing conditions on the physical properties of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Int Endod J*. 2012; 45(4): 326–36.
63. Húngaro-Duarte MA, de Oliveira El Kadre GD, Vivan RR, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru Filho M, de Moraes IG. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod*. 2009; 35(5): 737–40.
64. Gomes-Cornélio AL, Salles LP, Campos da Paz M, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Cytotoxicity of Portland cement with different radiopacifying agents: a cell death study. *J Endod*. 2011; 37(2): 203–10.

65. Laurent P, Camps J, De Méo M, Déjou J, About I. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. *Dent Mater.* 2008; 24(11): 1486–94.
66. Leiendecker AP, Qi Y-P, Sawyer AN, Niu L-N, Agee KA, Loushine RJ, et al. Effects of calcium silicate-based materials on collagen matrix integrity of mineralized dentin. *J Endod.* 2012; 38(6): 829–33.
67. Sawyer AN, Nikonov SY, Pancio AK, Niu L, Agee KA, Loushine RJ, et al. Effects of calcium silicate-based materials on the flexural properties of dentin. *J Endod.* 2012; 38(5): 680–3.
68. Rajasekharan S, Martens LC, Cauwels RGE, Verbeeck RMH. Biodentine™ material characteristics and clinical applications: a review of the literature. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2014; 15(3): 147–58.
69. Rajasekharan S, Martens LC, Cauwels RGE, Anthonappa RP. Biodentine™ material characteristics and clinical applications: a 3 year literature review and update. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2018; 19(1): 1-22.
70. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-β1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2012; 45(5): 439–48.
71. Camilleri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *Int Endod J.* 2012; 45(8): 737–43.
72. 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.
73. Malkondu Ö, Kazandağ MK, Kazazoğlu E. A Review on Biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 1–10.

74. Koubi G, Colon P, Franquin J-C, Hartmann A, Richard G, Faure M-O, et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth — a prospective study. *Clin Oral Investig*. 2013; 17(1): 243–9.
75. Raskin A, Eschrich G, Dejou J, About I. In vitro microleakage of Biodentine as a dentin substitute compared to Fuji II LC in cervical lining restorations. *J Adhes Dent*. 2012; 14(6): 535–42.
76. Camilleri J. Investigation of Biodentine as dentine replacement material. *J Dent*. 2013; 41(7): 600–10.
77. Cuadros-Fernández C, Lorente Rodríguez AI, Sáez-Martínez S, García-Binimelis J, About I, Mercadé M. Short-term treatment outcome of pulpotomies in primary molars using mineral trioxide aggregate and Biodentine: a randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2016; 20(7): 1639–45.
78. Vidal K, Martin G, Lozano O, Salas M, Trigueros J, Aguilar G. Apical closure in apexification: a review and case report of apexification treatment of an immature permanent tooth with Biodentine. *J Endod*. 2016; 42(5): 730–4.
79. 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.
80. Camilleri J, Grech L, Galea K, Keir D, Fenech M, Formosa L, et al. Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(5): 1437–46.
81. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater*. 2013; 29(2): e20-8.
82. Guneser MB, Akbulut MB, Eldeniz AU. Effect of various endodontic irrigants on the push-out bond strength of biodentine and conventional root perforation repair materials. *J Endod*. 2013; 39(3): 380–4.

83. Mori GG, Teixeira LM, Louzada de Oliveira D, Jacomini LM, Rodrigues da Silva S. Biocompatibility evaluation of Biodentine in subcutaneous tissue of rats. *J Endod*. 2014; 40(9): 1485–8.
84. Gandolfi MG, Iezzi G, Piattelli A, Prati C, Scarano A. Osteoinductive potential and bone-bonding ability of ProRoot MTA, MTA Plus and Biodentine in rabbit intramedullary model: microchemical characterization and histological analysis. *Dent Mater*. 2017; 33(5): e221–38.
85. Shayegan A, Jurysta C, Atash R, Petein M, Abbeele A Vanden. Biodentine used as a pulp-capping agent in primary pig teeth. *Pediatr Dent*. 2012; 34(7): e202-8.
86. Tziafa C, Koliniotou-Koumpia E, Papadimitriou S, Tziafas D. Dentinogenic responses after direct pulp capping of miniature swine teeth with Biodentine. *J Endod*. 2014; 40(12): 1967–71.
87. Katge FA, Patil DP. Comparative analysis of 2 calcium silicate–based cements (Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate) as direct pulp-capping agent in young permanent molars: a split mouth study. *J Endod*. 2017; 43(4): 507–13.
88. Gomes-Cornélio AL, Rodrigues EM, Salles LP, Mestieri LB, Faria G, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. 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.
89. Rodrigues EM, Gomes-Cornélio AL, Soares-Costa A, Salles LP, Velayutham M, Rossa-Junior C, et al. An assessment of the overexpression of BMP-2 in transfected human osteoblast cells stimulated by mineral trioxide aggregate and Biodentine. *Int Endod J*. 2017; 50(S2): e9–18.
90. Attik GN, Villat C, Hallay F, Pradelle-Plasse N, Bonnet H, Moreau K, et al. *In vitro* biocompatibility of a dentine substitute cement on human MG63 osteoblasts cells: Biodentine™ versus MTA®. *Int Endod J*. 2014; 47(12): 1133–41.

91. Escobar-García DM, Aguirre-López E, Méndez-González V, Pozos-Guillén A. Cytotoxicity and initial biocompatibility of endodontic biomaterials (MTA and BiodentineTM) used as root-end filling materials. *Biomed Res Int.* 2016; 2016: 1–7.
92. Corral Nuñez CM, Bosomworth HJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. *J Endod.* 2014; 40(3): 406–11.
93. Nowicka A, Wilk G, Lipski M, Kołlecki J, Buczkowska-Radlińska J. Tomographic evaluation of reparative dentin formation after direct pulp capping with Ca(OH)₂, MTA, Biodentine, and dentin bonding system in human teeth. *J Endod.* 2015; 41(8): 1234–40.
94. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008; 29(20): 2941–53.
95. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dent Mater.* 2011; 28: 23–40.
96. Browne RM. Animal tests for biocompatibility of dental materials--relevance, advantages and limitations. *J Dent.* 1994; 22 Suppl 2: S21-4.
97. Olsson B, Sliwkowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 1981; 7(8): 355–67.
98. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008; 20(2): 86–100.
99. Ha WN, Nicholson T, Kahler B, Walsh LJ. Mineral Trioxide Aggregate – a review of properties and testing methodologies. *Materials (Basel).* 2017; 10(11): 1261.
100. Ledda M, De Bonis A, Bertani FR, Cacciotti I, Teghil R, Lolli MG, et al. Interdisciplinary approach to cell-biomaterial interactions: biocompatibility and cell friendly characteristics of RKKP glass-ceramic coatings on titanium. *Biomed Mater.* 2015; 10(3): 35005.

101. Khalil WA, Eid NF. Biocompatibility of BioAggregate and mineral trioxide aggregate on the liver and kidney. *Int Endod J*. 2013; 46(8): 730–7.
102. Garcia LFR, Huck C, Magalhães FAC, Souza PPC, Souza Costa CA. Systemic effect of mineral aggregate-based cements: histopathological analysis in rats. *J Appl Oral Sci*. 2017; 25(6): 620–30.
103. Gencoglu N, Sener G, Omurtag GZ, Tozan A, Uslu B, Arbak S, et al. Comparison of biocompatibility and cytotoxicity of two new root canal sealers. *Acta Histochem*. 2010; 112(6): 567–75.
104. Demirkaya K, Can Demirdöğen B, Öncel Torun Z, Erdem O, Çetinkaya S, Akay C. In vivo evaluation of the effects of hydraulic calcium silicate dental cements on plasma and liver aluminium levels in rats. *Eur J Oral Sci*. 2016; 124(1): 75–81.
105. Demirkaya K, Demirdöğen BC, Torun ZÖ, Erdem O, Çırak E, Tunca Y. Brain aluminium accumulation and oxidative stress in the presence of calcium silicate dental cements. *Hum Exp Toxicol*. 2017; 36(10): 1071–80.
106. Peter SJ, Basha SK, Giridharan R, Lavinya BU, Sabina EP. Suppressive effect of *Spirulina fusiformis* on diclofenac-induced hepato-renal injury and gastrointestinal ulcer in Wistar albino rats: a biochemical and histological approach. *Biomed Pharmacother*. 2017; 88: 11–8.
107. Liu T, Li L, Fu C, Liu H, Chen D, Tang F. Pathological mechanisms of liver injury caused by continuous intraperitoneal injection of silica nanoparticles. *Biomaterials*. 2012; 33(7): 2399–407.
108. Laskin DL. Sinusoidal lining cells and hepatotoxicity. *Toxicol Pathol*. 1996; 24(1): 112–8.
109. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*. 2013; 3(2): 785–97.
110. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. 2008; 245(3): 194–205.

111. Knight JA. Liver function tests: their role in the diagnosis of hepatobiliary diseases. *J Infus Nurs.* 2005; 28(2): 108–17.
112. Carobene A, Braga F, Roraas T, Sandberg S, Bartlett WA. A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and γ -glutamyl transferase. *Clin Chem Lab Med.* 2013; 51(10): 1997–2007.
113. Li Y, Liu J, Zhong Y, Zhang D, Wang Z, Wang L, et al. Biocompatibility of Fe₃O₄@Au composite magnetic nanoparticles in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine.* 2011; 6: 2805.
114. Sookoian S, Pirola CJ. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: From systems biology to the personalized medicine. *World J Gastroenterol.* 2015; 21(3): 711.
115. Sookoian S, Pirola CJ. Alanine and aspartate aminotransferase and glutamine-cycling pathway: Their roles in pathogenesis of metabolic syndrome. *World J Gastroenterol.* 2012; 18(29): 3775.
116. Ferguson MA, Waikar SS. Established and emerging markers of kidney function. *Clin Chem.* 2012; 58(4): 680–9.
117. Patlolla AK, Randolph J, Kumari SA, Tchounwou PB. Toxicity evaluation of graphene oxide in kidneys of sprague-dawley rats. *Int J Environ Res Public Health.* 2016; 13(4): 380.
118. Champion S, Aubrecht J, Boekelheide K, Brewster DW, Vaidya VS, Anderson L, et al. The current status of biomarkers for predicting toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013; 9(11): 1391–408.
119. Puzantian H V, Townsend RR. Understanding kidney function assessment: the basics and advances. *J Am Assoc Nurse Pract.* 2013; 25(7): 334–41.
120. Xie H-G, Wang S-K, Cao C-C, Harpur E. Qualified kidney biomarkers and their potential significance in drug safety evaluation and prediction. *Pharmacol Ther.* 2013; 137(1): 100–7.

121. Wasung ME, Chawla LS, Madero M. Biomarkers of renal function, which and when? *Clin Chim Acta*. 2015; 438: 350–7.
122. Cardoso M, Catré D, Noites R, Paulo M, Viegas C. Animal models used in furcation perforation studies: A systematic review and comprehensive synthesis of model characteristics. *Aust Endod J*. 2017 Nov 23. doi: 10.1111/aej.12221.
123. 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.
124. Saraiva JA, da Fonseca TS, Silva GF, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, et al. Reduced interleukin-6 immunoexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. *Biomed Mater*. 2018; 13(3): 035002.
125. 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.
126. Cerri PS, Boabaid F, Katchburian E. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. *J Periodontal Res*. 2003; 38(2): 223–6.
127. Faloni APS, Sasso-Cerri E, Katchburian E, Cerri PS. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *J Periodontal Res*. 2007; 42(3): 193–201.
128. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in Mineral Trioxide Aggregate and Portland cement. *J Endod*. 2010; 36(7): 1210–5.
129. Matsunaga T, Tsujimoto M, Kawashima T, Tsujimoto Y, Fujiwara M, Ookubo A, et al. Analysis of arsenic in gray and white Mineral Trioxide Aggregates by using atomic absorption spectrometry. *J Endod*. 2010; 36(12): 1988–90.

130. Bramante CM, Demarchi ACCO, de Moraes IG, Bernadineli N, Garcia RB, Spångberg LSW, et al. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106(6): 909–13.
131. Younes NR Ben, Amara S, Mrad I, Ben-Slama I, Jeljeli M, Omri K, et al. Subacute toxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in male rats: emotional behavior and pathophysiological examination. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2015; 22(11): 8728–37.
132. Simsek N, Alan H, Ahmetoglu F, Taslidere E, Bulut E, Keles A. Assessment of the biocompatibility of mineral trioxide aggregate, bioaggregate, and biodentine in the subcutaneous tissue of rats. *Niger J Clin Pract.* 2015; 18(6): 739.
133. Minotti PG, Ordinola-Zapata R, Midená RZ, Marciano MA, Cavenago BC, Bramante CM, et al. Rat subcutaneous tissue response to calcium silicate containing different arsenic concentrations. *J Appl Oral Sci.* 2015; 23(1): 42–8.
134. Kang J-Y, Lee B-N, Son H-J, Koh J-T, Kang S-S, Son H-H, et al. Biocompatibility of Mineral Trioxide Aggregate mixed with hydration accelerators. *J Endod.* 2013; 39(4): 497–500.
135. Torres FFE, Bosso-Martelo R, Espir CG, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Evaluation of physicochemical properties of root-end filling materials using conventional and Micro-CT tests. *J Appl Oral Sci.* 2017; 25(4): 374–80.
136. Kaup M, Schäfer E, Dammaschke T. An in vitro study of different material properties of Biodentine compared to ProRoot MTA. *Head Face Med.* 2015; 11: 16.
137. Castro-Raucci LMS, Teixeira LN, Oliveira IR, Raucci-Neto W, Jacobovitz M, Rosa AL, et al. Osteogenic cell response to calcium aluminate-based cement. *Int Endod J.* 2017; 50(8): 771–9.

138. 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.
139. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol*. 2003; 24(1): 25–9.
140. Wu Q, Zhou X, Huang D, Ji Y, Kang F. IL-6 enhances osteocyte-mediated osteoclastogenesis by promoting JAK2 and RANKL activity in vitro. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 41(4): 1360–9.
141. Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LTA. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J*. 2014; 47(7): 615–21.
142. Jakovljevic A, Knezevic A, Karalic D, Soldatovic I, Popovic B, Milasin J, et al. Pro-inflammatory cytokine levels in human apical periodontitis: correlation with clinical and histological findings. *Aust Endod J*. 2015; 41(2): 72–7.
143. Gomes MS, Blattner TC, Sant'Ana Filho M, Grecca FS, Hugo FN, Fouad AF, et al. Can apical periodontitis modify systemic levels of inflammatory markers? A systematic review and meta-analysis. *J Endod*. 2013; 39(10): 1205–17.
144. Cintra LTA, Samuel RO, Azuma MM, de Queiróz AOS, Ervolino E, Sumida DH, et al. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. *J Endod*. 2016; 42(5): 747–51.
145. Zhang H-Y, Feng L, Wu H, Xie X-D. The association of IL-6 and IL-6R gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population. *Oral Dis*. 2014; 20(1): 69–75.
146. McCauley LK, Nohutcu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. *J Periodontol*. 2002; 73(11): 1377–91.

147. Noh MK, Jung M, Kim SH, Lee SR, Park KH, Kim DH, et al. Assessment of IL-6, IL-8 and TNF- α levels in the gingival tissue of patients with periodontitis. *Exp Ther Med*. 2013; 6(3): 847–51.
148. Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998; 9(3): 248–66.
149. Navarrete M, García J, Dutzan N, Henríquez L, Puente J, Carvajal P, et al. Interferon- γ , interleukins-6 and -4, and factor XIII-A as indirect markers of the classical and alternative macrophage activation pathways in chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2014; 85(5): 751–60.
150. Baum R, Gravallesse EM. Bone as a target organ in rheumatic disease: impact on osteoclasts and osteoblasts. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016; 51(1): 1–15.
151. Baillet A, Gossec L, Paternotte S, Etcheto A, Combe B, Meyer O, et al. Evaluation of serum interleukin-6 level as a surrogate marker of synovial inflammation and as a factor of structural progression in early rheumatoid arthritis: results from a french national multicenter cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2015; 67(7): 905–12.
152. Kim GW, Lee NR, Pi RH, Lim YS, Lee YM, Lee JM, et al. IL-6 inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis: past, present, and future. *Arch Pharm Res*. 2015; 38(5): 575–84.
153. Yoshida Y, Tanaka T. Interleukin 6 and rheumatoid arthritis. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 1–12.
154. de Souza Faloni AP, Schoenmaker T, Azari A, Katchburian E, Cerri PS, de Vries TJ, et al. Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential. *Calcif Tissue Int*. 2011; 88(1): 63–74.
155. Faloni AP de S, Sasso-Cerri E, Rocha FRG, Katchburian E, Cerri PS. Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen-treated rats. *J Anat*. 2012; 220(1): 77–85.

156. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med*. 2011; 17(10): 1231–4.
157. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 473(2): 139–46.
158. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, 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.
159. Sinha KM, Zhou X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J Cell Biochem*. 2013; 114(5): 975–84.
160. Baek W-Y, de Crombrughe B, Kim J-E. Postnatally induced inactivation of Osterix in osteoblasts results in the reduction of bone formation and maintenance. *Bone*. 2010; 46(4): 920–8.
161. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002; 108(1): 17–29.
162. Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, et al. Mineral Trioxide Aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expression and calcification in human periodontal ligament cells. *J Endod*. 2010; 36(4): 647–52.
163. Costa F, Sousa Gomes P, Fernandes MH. Osteogenic and angiogenic response to calcium silicate-based endodontic sealers. *J Endod*. 2016; 42(1): 113–9.
164. Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*. 2016; 86: 119–30.
165. Hu F, Pan L, Zhang K, Xing F, Wang X, Lee I, et al. Elevation of extracellular Ca²⁺ induces store-operated calcium entry via calcium-sensing receptors: a pathway contributes to the proliferation of osteoblasts. *PLoS One*. 2014; 9(9): e107217.

166. Sun X, Kishore V, Fites K, Akkus O. Osteoblasts detect pericellular calcium concentration increase via neomycin-sensitive voltage gated calcium channels. *Bone*. 2012; 51(5): 860–7.
167. Gabusi E, Manferdini C, Grassi F, Piacentini A, Cattini L, Filardo G, et al. Extracellular calcium chronically induced human osteoblasts effects: Specific modulation of osteocalcin and collagen type XV. *J Cell Physiol*. 2012; 227(8): 3151–61.
168. Ortiz J, Chou LL. Calcium upregulated survivin expression and associated osteogenesis of normal human osteoblasts. *J Biomed Mater Res Part A*. 2012; 100A(7): 1770–6.
169. Galow A-M, Rebl A, Koczan D, Bonk SM, Baumann W, Gimsa J. Increased osteoblast viability at alkaline pH in vitro provides a new perspective on bone regeneration. *Biochem Biophys Reports*. 2017; 10: 17–25.
170. Shen Y, Liu W, Lin K, Pan H, Darvell BW, Peng S, et al. Interfacial pH: a critical factor for osteoporotic bone regeneration. *Langmuir*. 2011; 27(6): 2701–8.
171. Natale LC, Rodrigues MC, Xavier TA, Simões A, de Souza DN, Braga RR. Ion release and mechanical properties of calcium silicate and calcium hydroxide materials used for pulp capping. *Int Endod J*. 2015; 48(1): 89–94.
172. Lucas CPTP, Viapiana R, Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Camilleri J, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties and dentin bond strength of a tricalcium silicate-based retrograde material. *Braz Dent J*. 2017; 28(1): 51–6.
173. Silva EJNL, Senna PM, De-Deus G, Zaia AA. Cytocompatibility of Biodentine using a three-dimensional cell culture model. *Int Endod J*. 2016; 49(6): 574–80.
174. Jung S, Mielert J, Kleinheinz J, Dammaschke T. Human oral cells' response to different endodontic restorative materials: an in vitro study. *Head Face Med*. 2014; 10(1): 55.

175. Küçükkaya S, Görduysus MÖ, Zeybek ND, Müftüoğlu SF. *In vitro* cytotoxicity of calcium silicate-based endodontic cement as root-end filling materials. *Scientifica (Cairo)*. 2016; 2016: 9203932.
176. Akbulut MB, Uyar Arpacı P, Unverdi Eldeniz A. Effects of novel root repair materials on attachment and morphological behaviour of periodontal ligament fibroblasts: scanning electron microscopy observation. *Microsc Res Tech*. 2016; 79(12): 1214–21.
177. Michel A, Erber R, Frese C, Gehrig H, Saure D, Mente J. In vitro evaluation of different dental materials used for the treatment of extensive cervical root defects using human periodontal cells. *Clin Oral Investig*. 2017; 21(3): 753–61.
178. Hakki SS, Bozkurt SB, Ozcopur B, Purali N, Belli S. Periodontal ligament fibroblast response to root perforations restored with different materials: a laboratory study. *Int Endod J*. 2012; 45(3): 240–8.
179. Thevenot PT, Baker DW, Weng H, Sun M-W, Tang L. The pivotal role of fibrocytes and mast cells in mediating fibrotic reactions to biomaterials. *Biomaterials*. 2011; 32(33): 8394–403.
180. 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.

ANEXO A – Submissão do protocolo de pesquisa à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



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



Proc. CEUA nº 15/2012

Araraquara, 2 de abril de 2015.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA desta Faculdade, procedeu a análise do Relatório Parcial do projeto de pesquisa de sua responsabilidade intitulado **"AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA DA REAÇÃO PROVOCADA POR BIODENTINE™ E MTA BRANCO EM SUBCUTÂNEO E NO PERIODONTO SUBJACENTE A PERFURAÇÕES DE FURCA EM MOLARES DE RATOS"** (Proc. CEUA nº 15/2012), e considerou-o APROVADO, bem como sua solicitação de alteração da metodologia e prorrogação do prazo da pesquisa.

Lembramos que o RELATÓRIO FINAL deste projeto deverá ser entregue em **ABRIL/2018**.

Atenciosamente.

Elisa Maria Ap. Giro
Profa. Dra. ELISA MARIA APARECIDA GIRO
1º Coordenador Substituto da CEUA

Ao
Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Morfologia

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 28 de março de 2018.

Tiago Silva da Fonseca