

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 25/11/2023.



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



Mateus Machado Delfino

**Parâmetros hepáticos, biocompatibilidade e bioatividade do Bio-C Pulpo e
MTA Repair HP**

Araraquara

2021



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



Mateus Machado Delfino

**Parâmetros hepáticos, biocompatibilidade e bioatividade do Bio-C Pulpo e
MTA Repair HP**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Araraquara

2021

D349p Delfino, Mateus Machado
Parâmetros hepáticos, biocompatibilidade e bioatividade do Bio-C
Pulpo e MTA Repair HP / Mateus Machado Delfino. -- Araraquara,
2021
126 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Paulo Sérgio Cerri

1. Teste de materiais. 2. Imuno-histoquímica. 3. Fígado. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Mateus Machado Delfino

**Parâmetros hepáticos, biocompatibilidade e bioatividade do Bio-C Pulpo e
MTA Repair HP**

Comissão julgadora

Tese como requisito para obtenção do grau de doutor em Odontologia

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

2º Examinador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

3º Examinador: Prof. Dra. Naiana Viana Viola Nícoli

4º Examinador: Prof^a Dr^a Raquel Assed Bezerra Segato

Araraquara, 25 de novembro de 2021.

DADOS CURRICULARES

Mateus Machado Delfino

NASCIMENTO: 06 de dezembro de 1993 – São José do Rio Preto – São Paulo

FILIAÇÃO: José Antônio Delfino e Silvana Cláudio Machado Delfino

2012-2015: Graduação em Odontologia pelo Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB, Barretos-SP.

2016-2017: Especialização em Endodontia pela Faculdade do Centro Oeste Paulista - FACOP, Bauru-SP.

2016-2018: Mestre em Odontologia, área de concentração em Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, Araraquara-SP.

2018-2021: Doutor em Odontologia, área de concentração em Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP, Araraquara-SP.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo carinho, amor, compreensão e investimento na minha formação, por todo esforço e toda luta para me proporcionar sempre o melhor, sem dúvidas, sem eles nada disso seria possível.

A minha esposa Ariane por todo apoio durante essa trajetória, conselhos e por confiar e acreditar em nossos projetos.

A todos os professores, funcionários, amigos, colegas da FOAr/UNESP.

Ao meu orientador professor Dr. Paulo Sérgio Cerri, por me ensinar tanto, como cresci com o sr, profissionalmente e como pessoa. O nosso querido “Boss”, um ser humano incrível, honesto, honrado e sobre tudo uma pessoa que ama ensinar. Obrigado por tudo professor, sempre me lembrarei do sr.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/17739-5) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Delfino MM. Parâmetros hepáticos, biocompatibilidade e bioatividade do Bio-C Pulpo e MTA Repair HP. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

Objetivo: avaliar a resposta do tecido conjuntivo promovida pelo Bio-C Pulpo, MTA Repair HP (MTA-HP) em comparação ao MTA Branco (MTA-B), usado como padrão ouro. Além disso, foi avaliado se esses materiais causam alterações hepáticas. **Metodologia:** tubos de polietileno preenchidos com Bio-C Pulpo, MTA-HP e MTA-B e tubos vazios (grupo controle, GC) foram implantados no tecido conjuntivo do subcutâneo de 80 ratos por 7, 15, 30 e 60 dias. O escore de reação inflamatória (ERI), espessura da cápsula, a quantidade de colágeno, o número de células inflamatórias (CI) e fibroblastos (FB), reações imuno-histoquímicas para detecção de interleucina-6 (IL-6), fosfatase alcalina (ALP), fator de crescimento de fibroblastos-1 (FGF-1), Ki-67 e IL-10 foram avaliados. A reação de von Kossa seguida da detecção de ALP, também foi realizada. Aos 60 dias, os níveis séricos de transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) foram medidos e fragmentos do fígado foram coletados para análises histológicas e morfométricas; os dados foram avaliados pelo ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Sidak. Os dados de biocompatibilidade e bioatividade foram submetidos à análise ANOVA two-way seguida do teste post-hoc de Tukey, exceto os dados referentes ao ERI. Os dados do ERI foram submetidos ao teste não paramétrico ANOVA de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn ($p \leq 0,05$). **Resultados:** nenhuma diferença significativa foi detectada nas concentrações séricas de TGO e TGP e no número de hepatócitos entre as amostras experimentais e GC. Embora Bio-C Pulpo tenha apresentado o maior número de CI e células imunomarcadas à IL-6 ($p < 0,0001$) em todos os períodos, não foi observada diferença significativa no ERI entre os materiais biocerâmicos, exceto aos 60 dias. Nesse período, o MTA-B apresentou ERI menor. Todos os grupos mostraram uma redução significativa na espessura da cápsula e no número de CI e de células IL-6-imunopositivas com o decorrer do tempo. Os espécimes de Bio-C Pulpo, MTA-HP e MTA-B mostraram maior imunoexpressão de ALP do que o GC ($p < 0,0001$), em todos os períodos. Estruturas von Kossa-positivas e birrefringentes foram observadas nas cápsulas ao redor dos materiais. Células imunomarcadas à ALP foram observadas adjacente às estruturas von Kossa-positivas. Em relação ao número de FB, não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos Bio-C Pulpo, MTA-HP e MTA-B ($p > 0,05$), aos 7 dias. As cápsulas de todos os grupos exibiram um aumento significativo no número de FB e na quantidade de colágeno ao longo do tempo. De 7 a 60 dias, uma redução significativa na imunoexpressão do FGF-1 e do Ki-67 foi observada em todas as amostras. Aos 7 e 15 dias, a maior imunoexpressão para Ki-67 foi encontrada nas amostras Bio-C Pulpo, enquanto, após 30 e 60 dias, nenhuma diferença significativa foi observada entre os materiais biocerâmicos. De 7 para 60 dias, um aumento significativo na imunomarcagem de IL-10 foi encontrado em todos os grupos. Aos 60 dias, as cápsulas ao redor dos materiais apresentaram um maior número de células marcadas com IL-10 do que nas amostras do GC ($p < 0,0001$). **Conclusões:** os materiais Bio-C Pulpo, MTA-HP e MTA-B não causaram alterações morfológicas no fígado e nos níveis séricos de TGO e TGP. O Bio-C Pulpo e o MTA-HP são biocompatíveis e apresentam potencial bioativo semelhante ao MTA-B. Os materiais biocerâmicos estimulam a secreção de IL-10, que deve exercer uma atividade anti-inflamatória nas cápsulas ao redor dos implantes permitindo a formação de cápsulas ricas em colágeno.

Palavras chave: Teste de materiais. Imuno-histoquímica. Fígado.

Delfino MM. Liver parameters, biocompatibility and bioactivity of Bio-C Pulpo and MTA Repair HP. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

Aim To evaluate the connective tissue response promoted by Bio-C Pulpo, MTA Repair HP (MTA-HP) compared to White MTA (WMTA), used as the gold standard. In addition, it was evaluated whether these materials cause liver changes. **Methodology** Inflammatory reaction score (IRS), capsule thickness, amount of collagen, number of inflammatory cells (IC) and fibroblasts (FB), immunohistochemical reactions for detection of interleukin-6 (IL-6), alkaline phosphatase (ALP), fibroblast growth factor-1 (FGF-1), Ki-67 and IL-10 were evaluated. The von Kossa reaction followed by the detection of ALP was also performed. At 60 days, serum levels of glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT) were measured and liver fragments were collected for histological and morphometric analyses; data were evaluated by one-way ANOVA followed by Sidak post-test. The biocompatibility and bioactivity data were submitted to two-way ANOVA analysis followed by Tukey's post-hoc test, except for the data referring to the ERI. ERI data were submitted to the non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA test followed by the Dunn's test ($p \leq 0.05$). **Results** No significant difference was detected in serum GOT and GPT concentrations and in the number of hepatocytes among the experimental and CG samples. Although Bio-C Pulpo had the highest IC and IL-6-immunolabelled cells ($p < 0.0001$) in all periods, no significant difference was observed in the IRS among the bioceramic materials, except at 60 days. In this period, the WMTA showed lower IRS. All groups showed a significant reduction in the capsule thickness and in the number of IC and IL-6-immunolabelled cells over time. Bio-C Pulpo, MTA-HP and WMTA specimens showed greater immunoexpression of ALP than CG ($p < 0.0001$). In all periods, von Kossa-positive and birefringent structures were observed in the capsules around the materials. ALP-immunolabelled cells were also seen near to von Kossa-positive structures. Regarding the number of FB, significant differences were not detected among Bio-C Pulpo, MTA-HP and WMTA groups ($p > 0.05$), at 7 days. The capsules of all groups exhibited a significant increase in the number of FB and in the amount of collagen over time. From 7 to 60 days, a significant reduction in FGF-1 and Ki-67 immunoexpression was observed in all samples. At 7 and 15 days, the highest immunoexpression for Ki-67 was found in the Bio-C samples, while after 30 and 60 days, no significant difference was observed between the bioceramic materials. From 7 to 60 days, a significant increase in IL-10 immunostaining was found in all groups. At 60 days, the capsules around the materials had a higher number of IL-10-immunolabelled cells than in CG samples ($p < 0.0001$). **Conclusions** Bio-C Pulpo, MTA-HP and WMTA materials did not cause morphological changes in the liver as well as no significant alteration in the serum GOT and GPT levels. Despite changes made in Bio-C Pulpo and MTA-HP to improve their physicochemical properties, these bioceramic materials are biocompatible and exhibit bioactive potential similar to the WMTA. The bioceramic materials stimulate the IL-10 secretion, which may exert an anti-inflammatory activity in the capsules around the implants allowing the formation of collagen-rich capsules.

Keywords: Material testing. Immunohistochemistry. Liver.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Alterações Sistêmicas.....	14
2 PROPOSIÇÃO	16
3 PUBLICAÇÕES	17
3.1 Publicação 1	18
3.2 Publicação 2	57
4 CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICE A.....	98
APÊNDICE B.....	115
ANEXO A	125
ANEXO B	126

1 INTRODUÇÃO

O Mineral Trióxido Agregado (MTA), material à base de silicato tricálcico foi introduzido na Universidade de Loma Linda, em 1993¹⁻³. Este material foi desenvolvido para selar comunicações entre o sistema de canais radiculares e o periodonto⁴ e também em cirurgia parodontônica com obturação retrógrada³⁻¹¹. O MTA tem uma história de sucesso, com uma ampla variedade de aplicações clínicas¹², utilizado também em capeamento pulpar direto e em *plugs* apicais de dentes com rizogênese incompleta⁵⁻¹³.

O MTA é composto de cimento Portland (80%) e óxido de bismuto (20%). Como consequência, a principal fase constituinte e mais reativa do MTA é o silicato tricálcico compreendendo cerca de 68% do cimento Portland¹⁴, aluminato tricálcico, óxido tricálcico e óxido de silicato¹. Partículas de outros óxidos minerais em menores quantidades também estão presentes, o que contribui para as propriedades físico-químicas ideais. O tamanho das partículas, relação líquido-pó e a presença de bolhas de ar incorporadas durante a espatulação também interferem nas propriedades físicas do material⁴. Este material apresenta pH em torno de 12,5, excelentes propriedades de vedação e adaptação marginal² e devido sua natureza hidrofílica, não requer sua utilização em campo seco^{4,15}.

Materiais biocompatíveis, capazes de induzir a formação de tecido mineralizado, apresentam diversas aplicações clínicas^{5,7,8,16}, sendo essenciais para a recuperação e o prognóstico da periodontite apical, especialmente em casos de perda óssea¹⁷. Cimentos reparadores devem apresentar propriedades físico-químicas e biológicas ideais, além de apresentarem potencial de osteoindução^{16,17}. O MTA tem sido considerado o material mais eficaz no reparo tecidual, devido à sua boa capacidade de selamento, biocompatibilidade e bioatividade⁵⁻⁸.

O MTA apresenta excelente biocompatibilidade¹⁴ e capacidade para induzir a formação de tecido mineralizado^{14,18,19}. O silicato tricálcico apresenta bioatividade¹⁷, reage na presença de fluídos fisiológicos, produzindo hidroxiapatita. A capacidade de formação de apatita é reforçada com a adição do fluoreto de cálcio¹⁴. As excelentes propriedades biológicas do MTA são atribuídas ao seu pH alcalino e a sua biointeratividade, capacidade de liberar íons cálcio e manter o pH elevado, induzindo a formação de tecido mineralizado^{17,18}.

No entanto, as composições tradicionais do MTA apresentam algumas desvantagens^{8,20}, por isso, as propriedades físico-químicas do MTA têm sido amplamente investigadas, devido seu tempo de presa prolongado, descoloração do dente e da gengiva marginal, consistência arenosa e dificuldades no manuseio¹⁷⁻²³. Uma dessas desvantagens é o difícil manuseio, pois, o pó é fornecido para aglutinação em água destilada, resultando em um material de consistência arenosa⁸, o que dificulta a inserção do MTA⁸, acentuada em procedimentos cirúrgicos, como obturação retrógrada e no preenchimento de perfurações^{5,20}. Modificações na formulação original do MTA tem sido sugerida para melhorar suas características^{18,19,24,25}. Alterações químicas pequenas ou até mesmo a substituição do agente radiopacificador pode modificar o comportamento físico-químico e biológico desses materiais^{16,22,24,25}. A busca por novos materiais baseados no cimento Portland, que possam superar as características indesejáveis do MTA, visa desenvolver um cimento biocompatível com propriedades físico-químicas ideais²¹. O grande interesse neste material é a biocompatibilidade, biointeratividade e bioatividade^{5,17}.

A Associação Americana de Endodontia (AAE) recomenda que o uso de um novo material seja baseado em estudos biológicos e clínicos²⁶. Os materiais endodônticos, antes do seu uso clínico, devem ter suas propriedades físico-químicas e biológicas avaliadas por estudos *in vitro* e *in vivo*, evitando assim, efeitos adversos²⁷. Os materiais que permanecerão em íntimo contato com tecidos pulpare ou periapicais, devem apresentar baixa citotoxicidade, biocompatibilidade²⁷, e potencial para induzir a formação de uma barreira mineralizada^{5,28}.

MTA com modificações na sua formulação têm sido introduzidos no mercado^{5,16}. O MTA Branco (Angelus Indústria de produtos Odontológicos S/A, Londrina – PR – Brasil) surgiu como uma nova formulação em relação ao MTA Angelus (pó cinza), foi lançado no mercado com a proposta de evitar a descoloração coronária causada pelo MTA cinza²⁹. O MTA Branco apresenta em sua composição silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, óxido de bismuto, sendo que o líquido é constituído de água destilada³⁰. O MTA Branco proporciona pH em torno de 7.8²¹ a 9¹⁶, liberação de cálcio em 0,24 mg/L, solubilidade entre 2,2%²² e 2,4%²¹ e tempo de presa de 48 minutos¹⁸. Este MTA é indicado para o tratamento de perfurações radiculares e de furca, reabsorção radicular, capeamento pulpar, pulpotomia, apicificação e *plugs* apicais³⁰. A formulação tradicional do MTA apresenta algumas desvantagens, como dificuldades de manuseio, consistência

granular e longo tempo de presa. Além disso, o uso de óxido de bismuto como agente radiopacificador promove a descoloração do dente e da gengiva marginal e afeta as propriedades físico-químicas desse material^{10,11,22,29}. Diante das desvantagens do óxido de bismuto e de acordo com o fabricante, o radiopacificador óxido de bismuto foi substituído por tungstato de cálcio na nova formulação do MTA Branco.

Na busca pela melhoria do MTA, uma nova formulação - o MTA Repair HP (Angelus Indústria de produtos Odontológicos S/A, Londrina – PR – Brasil) - foi lançado na forma de um material biocerâmico de alta plasticidade^{8,31}, visando manter as propriedades biológicas do MTA, aprimorando as propriedades físico-químicas²², proporcionando um melhor manuseio e inserção do material^{8,31}. De acordo com o fabricante, este novo material possui alta plasticidade e melhores propriedades físico-químicas em comparação com o MTA Branco^{5,9,16,20,22,32}. A principal diferença em relação ao seu antecessor é adição de um plastificante orgânico à água destilada²². O MTA Repair HP é constituído por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, tungstato de cálcio e o líquido contém água destilada, além de um agente plastificante^{5,8,16,20,31,32}; assim, o seu líquido proporciona maior plasticidade, melhorando o manuseio e inserção do material no local de reparo. Após o manuseio, a consistência obtida deste cimento é semelhante a uma massa de modelar, não arenosa⁵. O MTA Repair HP apresenta radiopacidade de 4.50 mm/Al, solubilidade de 8%, pH em torno de 9, liberação de cálcio de 14 mg/L e tempo de presa final de aproximadamente 85 minutos¹⁶. As indicações são as mesmas do MTA Branco⁵. O extrato de MTA Repair HP apresentou baixa citotoxicidade quando adicionado a cultura primária de osteoblastos, culminando com baixo índice de células em apoptose ou necrose. Em subcutâneo de ratos, este cimento induziu uma moderada reação inflamatória após 30 dias^{5,8,22,31}.

Bio-C Pulpo (Angelus Indústria de produtos Odontológicos S/A, Londrina – PR – Brasil) é novo material da Angelus, que ainda não está sendo comercializado no mercado. O material foi enviado pela empresa ao departamento de Odontologia Restauradora para que fossem feitas as análises físico-químicas e de biocompatibilidade do produto. Este material é constituído de silicato de cálcio (50-65%), aluminato de cálcio (1-4%), hidróxido de cálcio (0,5-2%), óxido de zircônio (20-30%), fluoreto de cálcio (1-4%), dióxido de silício (2-6%), óxido de ferro (0,05-1%)³³, enquanto que o líquido é à base de água destilada, adicionado agente plastificante,

cloreto de cálcio e metilparabeno³³⁻³⁶. O Bio-C Pulpo é indicado para pulpotomia de dentes decíduos e permanentes, forramento de preparo cavitário/base restauração e para tratamento restaurador atraumático, técnica A.R.T. O Bio-C Pulpo apresenta tempo de trabalho entre 4 a 6 minutos, presa final de 12 minutos, pH em torno de 12,5 e radiopacidade de 9 mm/Al, de acordo com a norma ISO 9917^{33,34,36,37}.

A resposta biológica pode ser investigada por meio da avaliação histopatológica da cápsula que se forma em resposta aos materiais, por meio de análises morfológica e quantitativa do tecido circundante ao implante³⁸⁻⁴⁰. O implante no subcutâneo é um método recomendado pela ISO 10993⁴¹ para avaliar a biocompatibilidade de materiais dentários e, portanto, é amplamente utilizado^{19,25,38,39,40,42-46}. O uso do tubo de polietileno previne a difusão do material, além de simular a situação de preenchimento de canal radicular^{42,43}. Considerando que a resposta tecidual aos materiais compreende uma cascata de eventos celulares e moleculares, a detecção imuno-histoquímica de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento têm sido utilizada para melhor caracterizar a resposta tecidual^{24,25,38,45-47}. Dentre os diversos fatores e citocinas envolvidas neste processo, podemos citar a interleucina-6 (IL6)^{25,40,45,48}, uma citocina multifuncional que desempenha um papel importante na regulação da resposta imunitária, hematopoese, oncogênese e no processo inflamatório⁴⁹⁻⁵¹.

A IL-6 tem sido associada com a instalação do processo inflamatório em resposta ao implante de materiais endodônticos no tecido subcutâneo^{24,25,38,40,45,47,52} bem como na lesão periodontal⁵³. Frente a uma lesão tecidual, a IL-6 é uma das interleucinas que participa da resposta mediada pelo hospedeiro, participando na patogênese de várias doenças inflamatórias⁵³⁻⁵⁵. Esta citocina é produzida por neutrófilos, monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a micro-organismos⁵³, às substâncias liberadas por materiais odontológicos^{24,25,38,45,56} e também à estimulação por outras citocinas, como a interleucina-1 (IL-1) e fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α)^{57,58}. A IL-6 possui várias propriedades pró-inflamatórias, tais como a produção de quimosinas e moléculas de adesão aos linfócitos, indução de proteínas de fase aguda em células de fígado e aumento de neutrófilos no sangue^{57,58}.

A síntese de citocinas é complexa, sua expressão e efeitos são coordenados por muitos fatores, incluindo outras células e mediadores químicos⁵⁹. A reação tecidual observada é consequência da resposta do hospedeiro às substâncias liberadas pelos materiais. Portanto, as células hospedeiras (inflamatórias e

residentes) produzem e liberam várias citocinas e fatores de crescimento que desempenham um papel específico na complexa cascata de eventos celulares envolvidos na resposta tecidual⁴⁵.

A acentuada imunoexpressão de IL-6 nas cápsulas, em períodos iniciais, é concomitante a incidência de linfócitos, macrófagos e plasmócitos, indicando que esta interleucina participa na instalação e progresso da resposta imuno-inflamatória promovida pelos implantes no subcutâneo^{24,25,38,40,45}. A redução da reação inflamatória ocorre concomitantemente à redução da imunoexpressão de IL-6 nas cápsulas adjacentes aos materiais^{38,45,56} e presença marcante de fibroblastos e fibras colágenas^{38,40,45}. Assim, a presença desta citocina em cápsulas formadas em resposta aos materiais odontológicos implantados no tecido conjuntivo do subcutâneo parece estar associada à instalação da reação inflamatória. No entanto, com o decorrer do tempo os materiais biocompatíveis mostram uma redução na positividade desta citocina, a qual tem sido associada à remodelação das cápsulas, ou seja, a proliferação de fibroblastos e, subsequentemente, a formação de colágeno em substituição ao processo inflamatório inicialmente presente^{38,45,46}.

Em contraposição à função pró-inflamatória da IL-6 exercida nas cápsulas formadas em resposta aos biomateriais, a IL-10 apresenta uma marcante função anti-inflamatória. Está bem estabelecido que a IL-10 inibe a síntese e liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a IL-1, IL-6 e IL-8^{60,61}. Há evidência de que o MTA induz as células ósseas a expressarem IL-4 e IL-10⁶². Considerando que a IL-10 é uma citocina que inibe a IL-6 e participa no processo de reparação dos tecidos^{63,64}, a detecção da IL-10 deve fornecer resultados que reforçam à regressão da reação inflamatória e a formação de uma cápsula fibrosa, ou seja, suportam a ideia que estes materiais possam ser biocompatíveis. Portanto, a detecção da IL-10 possibilitará uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na instalação e regressão da reação inflamatória induzida pelos biomateriais.

No momento, há um claro entendimento de que a resposta do hospedeiro ao material escolhido tem papel importante no resultado da terapia endodôntica, pois as células produzem e liberam fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, que controlam o processo de cicatrização do tecido. Dentre vários fatores, o fator de crescimento de fibroblastos-1 (FGF-1) participa da remodelação tecidual, promovendo a proliferação e migração de fibroblastos⁴⁶. Esse fator tem papel fundamental no repara tecidual devido às suas ações mitogênicas e angiogênicas⁴⁷. Assim, a

reparação dos tecidos depende da vascularização e proliferação celular, particularmente, das células responsáveis pela produção dos componentes estruturais da matriz extracelular do tecido. Um marcador amplamente utilizado para identificar células em proliferação é o Ki-67⁴⁷. O Ki-67 é uma proteína do córtex nuclear não histona expressa durante as fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, mas não em células em estado quiescente⁴⁷.

Além dos biomateriais serem biocompatíveis, devem exibir potencial bioativo. Os cimentos de silicato de cálcio possuem comportamento bioativo, sendo biointerativos, capazes de liberarem íons para nucleação dos depósitos de apatita na superfície em um curto período de indução, sendo fundamentais para induzir a remineralização^{65,66}. Estes cimentos são capazes de liberar íons biologicamente relevantes (Ca^{+2} e OH^-), atuando em diversas células envolvidas no processo de mineralização, dentre elas os osteoblastos e os cementoblastos, sendo considerados, portanto osteoindutores. Os cimentos que contêm silicato de cálcio apresentam pH alcalino em contato com os fluidos tissulares, com capacidade de nuclear depósitos de cálcio^{9,22,66}. Os íons de cálcio podem então reagir com o dióxido de carbono nos tecidos para formar granulações de carbonato de cálcio, observadas como cristais de calcita birrefringentes à luz polarizada^{5,8,40,67} e estruturas positivas (marcadas em preto) ao método de von Kossa^{19,25,40}. Estes cristais podem servir como locais de nucleação, estimulando a deposição de tecidos mineralizados⁶⁷. O processo de biomineralização é complexo e depende de diversos eventos celulares e enzimáticos. Dentre as enzimas envolvidas neste processo, a fosfatase alcalina (ALP) desempenha papel fundamental desde que o seu pH alcalino favorece à precipitação de fosfato de cálcio sobre a matriz orgânica óssea⁶⁸. Assim sendo, a presença de ALP tem sido associada à formação dos tecidos, particularmente, os tecidos mineralizados⁶⁹. A ALP é considerada um marcador bioquímico de formação óssea que pode ser usado para avaliar a atividade osteoblástica^{7,13}. Além de osteoblastos, os cementoblastos e os fibroblastos do ligamento periodontal expressam positividade à ALP^{7,13}. Dessa maneira, a ALP é usada, principalmente em estudos in vitro, para avaliar a bioatividade de materiais endodônticos^{7,13}.

1.1 Alterações Sistêmicas

Considerando que os materiais odontológicos apresentam solubilidade e, portanto, liberam substâncias, estas por meio da corrente sanguínea podem atingir órgãos intimamente associados a manutenção do metabolismo do organismo, dentre eles o fígado, um órgão vital interposto à corrente sanguínea. O fígado está envolvido em diversas funções do corpo, sendo o principal local para biotransformação e remoção de macromoléculas da corrente sanguínea⁷¹, com a participação dos hepatócitos e das células de Kupffer⁷². As células de Kupffer liberam citocinas como interleucina 1 (IL-1) e (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF- α), fator de crescimento transformante β (TGF- β) e interferon γ (INF- γ) e sua principal função é remover partículas advindas pelo sistema porta hepático⁷³. A resposta destas células frente a patógenos pode contribuir para lesões hepáticas, lesionando os hepatócitos^{71,72,74}.

A ISO 10993-1 recomenda avaliar a toxicidade sistêmica de materiais que entram em contato com sangue⁷⁵. Estudos anteriores mostram o efeito sistêmico causado por vários materiais Odontológicos, evidenciando o efeito adverso em diferentes órgãos do corpo⁷⁶⁻⁷⁸. Há relatos de que alguns materiais induziram no fígado o acúmulo de infiltrado inflamatório, congestão vascular⁷⁹, presença de linfócitos interlobulares, aumento nas células de Kupffer ao redor do espaço porta^{80,81}, apoptose e vacuolização de hepatócitos⁸⁰. Outro efeito sistêmico adverso é a produção de citocinas, como IL-1 e IL-6, no tecido subcutâneo⁸², que podem por meio da circulação sanguínea alcançar o fígado causando reação inflamatória⁸¹. Estas alterações patológicas são indicativos de uma lesão hepatocelular no fígado⁸⁰ e, portanto, a análise morfológica e bioquímica do fígado é um indicativo de toxicidade.

Ensaio pré-clínicos de toxicidade hepática devem incluir biomarcadores mensuráveis a partir de amostras obtidas em procedimentos não invasivos, como a coleta de sangue⁸³. Os testes bioquímicos para assegurar a função hepática incluem a mensuração dos níveis séricos das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP)^{71,81,83-85}.

Considerando que os cimentos MTA Branco e MTA Repair HP são relativamente recentes no mercado e, conseqüentemente, ainda pouco se sabe sobre a sua biocompatibilidade e o Bio-C Pulpo sendo um novo produto, no qual há escassos relatos na literatura a respeito de sua biocompatibilidade, o nosso propósito foi avaliar os parâmetros morfológicos e bioquímicos hepáticos e a reação tecidual promovida

no subcutâneo por estes cimentos. O MTA Branco foi usado como parâmetro (controle positivo) desde que já está bem estabelecido na literatura que este material apresenta biocompatibilidade e bioatividade^{21,25,29}.

4 CONCLUSÃO

- Bio-C Pulpo, MTA Repair HP e MTA Branco não apresentaram efeito prejudicial na integridade estrutural do fígado e nos níveis séricos de TGO e TGP, sugerindo que esses materiais não promovem alterações sistêmicas.
- A redução significativa do processo inflamatório acompanhada pela formação de fibras colágenas nas cápsulas do Bio-C Pulpo, MTA-HP e MTA-B indica que esses cimentos são biocompatíveis.
- A redução do número de células imunopositivas à IL-6 e o aumento do número de células imunopositivas à IL-10 indica que estes cimentos permitem a formação de delgadas cápsulas fibrosas. Assim, estes cimentos devem possibilitar a regeneração e/ou reparação dos tecidos conjuntivos.
- A presença de células imunopositivas à fosfatase alcalina e a presença de cristais de calcita, indicam que os materiais apresentam potencial bioativo.

REFERÊNCIAS*¹

1. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TRP. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater*. 2005; 21(4): 297-303.
2. Monteiro Bramante C, Demarchi AC, de Moraes IG, Bernadineli N, Garcia RB, Spångberg LS 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.
3. Margunato S, Taşlı PN, Aydın S, Karapınar Kazandağ M, Şahin F. In vitro evaluation of ProRoot MTA, Biodentine, and MM-MTA on human alveolar bone marrow stem cells in terms of biocompatibility and mineralization. *J Endod*. 2015;41(10):1646-52.
4. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Felipe WT, Tanomaru Filho M, Esberard RM. The influence of calcium chloride on the setting time, solubility, disintegration, and pH of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with a radiopacifier. *J Endod*. 2009;35(4):550-4.
5. 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.
6. Lee BS, Lin HP, Chan JC, Wang WC, Hung PH, Tsai YH et al. A novel sol-gel-derived calcium silicate cement with short setting time for application in endodontic repair of perforations. *Int J Nanomedicine*. 2018;8(13):261-71.
7. Tanomaru-Filho M, Andrade AS, Rodrigues EM, Viola KS, Faria G, Camilleri J et al. Biocompatibility and mineralized nodule formation of Neo MTA Plus and an experimental tricalcium silicate cement containing tantalum oxide. *Int Endod J*. 2017; 50(2):31-9.
8. Benetti F, Queiroz IOA, Cosme-Silva L, Conti LC, de Oliveira SHP, Cintra LTA. Cytotoxicity, biocompatibility of a new ready-for-use bioceramic repair material. *Braz Dent J*. 2019; 30(4): 325-32.

¹ * De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

9. Collado-González M, López-García S, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Tomás-Calatá CJ, Moraleda JM et al. Biological effects of acid-eroded MTA Repair HP and ProRoot MTA on human periodontal ligament stem cells. *Clin Oral Investig*. 2019 ;23(10):3915-24.
10. ElReash A, Hamama H, Abdo W, Wu Q, Zaen El-Din A, Xiaoli X. Biocompatibility of new bioactive resin composite versus calcium silicate cements: an animal study. *BMC Oral Health*. 2019;19(1):194.
11. Marciano MA, Camilleri J, Lucateli RL, Costa RM, Matsumoto MA, Duarte MAH. Physical, chemical, and biological properties of white MTA with additions of AlF_3 . *Clin Oral Investig*. 2019; 23, 33-41.
12. De Deus G, de Souza MCB, Fidel RAS, Fidel SR, de Campos RC, Luna AS. Negligible expression of arsenic in some commercially available brands of Portland cement and mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2009; 35(6): 887-90.
13. 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):780-89.
14. 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: 580-93.
15. Bortoluzzi EA, Niu LN, Palani CD, El-Awady AR, Hammond BD, Pei DD et al. Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. *Dent Mater*. 2015;31(12):1510-22.
16. Guimarães BM, Prati C, Duarte MAH, Bramante CM, Gandolfi MG. Physicochemical properties of calcium silicate-based formulations MTA repair HP and MTA Vitalcem. *J App Oral Sci*. 2018; 26: e2017115.
17. Gandolfi MG, Spagnuolo G, Siboni F, Procino A, Riveccio V, Pelliccioni GA et al. Calcium silicate/calcium phosphate biphasic cements for vital pulp therapy: chemical-physical properties and human pulp cells response. *Clin Oral Investig*. 2015;19(8):2075-89.
18. Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MA, Grizzo LT, Buzalaf MA et al. pH, calcium ion release, and setting time of an experimental mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. *J Endod*. 2011;37(6):844-6.
19. 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.
20. Silva EJNL, Carvalho NK, Senna PM et al. Push-out bond strength of MTA HP, a new high-plasticity calcium silicate-based cement. *Braz. Oral Res.* 2016; 30(1): e84.
 21. Hungaro Duarte MA, Minotti PG, Rodrigues CT, Zapata RO, Bramante CM, Tanomaru Filho M et al. Effect of different radiopacifying agents on the physicochemical properties of white Portland cement and white mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2012;38(3):394-7.
 22. Ferreira CMA, Sassone LM, Gonçalves AS, de Carvalho JJ, Tomás-Catalá CJ, García-Bernal D et al. Physicochemical, cytotoxicity and in vivo biocompatibility of a high-plasticity calcium-silicate based material. *Sci Rep.* 2019;9(1):3933.
 23. Jjiménez-Sánchez MDC, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A. MTA HP Repair stimulates in vitro and homogeneous calcium phosphate phase coating deposition. *J Clin Exp Dent.* 2019; 11(4): e322-6.
 24. Silva GF, Bosso R, Ferino RV, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: Evaluation of physicochemical and biological properties. *J Biomed Mater Res A.* 2014;102(12):4336-45.
 25. Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MIB, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agente of calcium silicated-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Investig.* 2015; 19(8): 2015-25.
 26. American Association of Endodontists. New technologies / materials. Chicago: American Association of Endodontists; 2013. [acesso em: 15 de fev de 2020. Disponível em: www.aae.org.
 27. Willershausen I, Wolf T, Kasaj A, Weyer V, Willershausen B, Marroquin BB. Influence of a bioceramic root end material and mineral trioxide aggregates on fibroblasts and osteoblasts. *Arch Oral Biol.* 2013;58(9):1232-7.
 28. Leonardo MR, Almeida WA, Silva LAB, Utrilla LS. Histological evaluation of the response of apical tissues to glass ionomer and zinc oxide-eugenol based sealers in dog teeth after root canal treatment. *Endod Dent Traumatol.* 1998; 14: 257-61.
 29. De Souza LC, Yadlapati M, Lopes HP, Silva R, Letra A, Elias CN. Physical-chemical and biological properties. *Eur J Endod.* 2018; 3: 38-47.
 30. MTA Branco [bula]. Londrina: Angelus; 2018.

31. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, et al. Biocompatibility of new pulp-capping materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on human dental pulp stem cells. *J Endod*. 2018;44(1):126-32.
32. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C et al. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2017; 50(2): e63-e72.
33. Lima SPR, Santos GLD, Ferelle A, Ramos SP, Pessan JP, Dezan-Garbelini CC. Clinical and radiographic evaluation of a new stain-free tricalcium silicate cement in pulpotomies. *Braz Oral Res*. 2020; 34: 102.
34. Cosme-Silva L, Gomes-Filho JE, Benetti F, Dal-Fabbro R, Sakai VT, Cintra LTA, Ervolino E, Viola NV. Biocompatibility and immunohistochemical evaluation of a new calcium silicate-based cement, Bio-C Pulpo. *Int Endod J*. 2019;52(5):689-700.
35. Koutroulis A, Kuehne SA, Cooper PR, Camilleri J. The role of calcium ion release on biocompatibility and antimicrobial properties of hydraulic cements. *Sci Rep*. 2019; 9: 19019.
36. Cosme-Silva L, Santos AFD, Lopes CS, Dal-Fabbro R, Benetti F, Gomes-Filho JE, Queiroz IOA et al. Cytotoxicity, inflammation, biomineralization, and immunoexpression of IL-1 β and TNF- α promoted by a new bioceramic cement. *J Appl Oral Sci*. 2020; 28: 20200033.
37. Bio-C Pulpo [bula]. Londrina: Angelus; 2018.
38. 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): 1-12.
39. Alves-Silva EC, Tanomaru-Filho M, da Silva GF, Delfino MM, Cerri PS, Guerreiro-Tanomaru JM. Biocompatibility and bioactive potential of new calcium silicate-based endodontic sealers: Bio-C Sealer and Sealer Plus BC. *J Endod*. 2020; 46: 1470-7.
40. Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru J, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Immunoinflammatory response and bioactive potential of GuttaFlow bioseal and MTA Fillapex in the rat subcutaneous tissue. *Sci Rep*. 2020; 10: 7173.
41. International Organization for Standardization. Biological evaluation of medical devices. Part 6: tests for local effects after implantation. Geneve: ISO; 2016.

42. Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 1981; 7 (8): 355-67.
43. Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari H, Gaderian A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. *J Endod.* 2006; 32 (8): 776-80.
44. Zmener O, Martinez-Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod* 2012; 38(9): 1233-8.
45. da Fonseca TS, da Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. In vivo evaluation of the inflammatory response IL-6 immunoexpression promoted Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J.* 2016; 49(2): 145-53.
46. 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.
47. da Fonseca TS, Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Mast cells and immunoexpression of FGF-1 and Ki-67 in rat subcutaneous tissue following the implantation of Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J* 2019; 52(1):54-67.
48. Simsek N, Akinci L, Gecor O, Alan H, Ahmetoglu F, Taslidere E. Biocompatibility of a new epoxy resin-based root canal sealer in subcutaneous tissue of rat. *Eur J Dent.* 2015; 9(1): 31-5.
49. Lee SK, Lorenzo JA. Regulation of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin mRNA expression by parathyroid hormone is predominantly mediated by the protein kinase a pathway in murine bone marrow cultures. *Bone.* 2002; 31(1): 252-9.
50. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol.* 2010; 22(5): 347-52.
51. 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.
52. Hoshino RA, Silva GFD, Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E et al. Physical properties, antimicrobial activity and in vivo tissue response to Apexit Plus. *Materials (Basel).* 2020;13(5):1171.

53. 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.
54. da Fonseca TS, Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Delfino MM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M et al. Biodentine and MTA modulate immunoinflammatory response favoring bone formation in sealing of furcation perforations in rat molars. *Clin Oral Investig*. 2019; 23: 1237-52.
55. Barkhordar RA, Hayashi C, Hussain MZ. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*. 1999; 15(1): 26-7.
56. Andrade AS, Silva GF, Camilleri J, Cerri ES, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS et al. Tissue response and immunoexpression of interleukin-6 promoted by tricalcium silicate-based repair materials after subcutaneous implantation in rats. *J Endod*. 2018; 44(3): 458-63.
57. Souza JRM, Oliveira RT, Blotta MHSL, Coelho OR. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnívelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. *Arq Bras Cardiol*. 2008; 90(2): 94-9.
58. Hashizume M, Mihara M. The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis*. 2011; 2011:765624.
59. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Oliveira SHP. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod*. 2009; 35(11): 1577-9.
60. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukine-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*. 1994; 153: 811–6.
61. Huang TH, Ding SJ, Hsu TC, Kao CT. Effects of mineral trioxide aggregate (MTA) extracts on mitogen-activated protein kinase activity in human osteosarcoma cell line (U2OS). *Biomaterials*. 2003;24(22):3909-13.
62. Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY. Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;73(1):123-8.

63. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 71-109.
64. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol.* 2012; 32(1): 23-63.
65. Gandolfi MG, Taddei P, Siboni F, Modena E, Stefano ED, Prati C. Biometric remineralization of human dentin using promising innovative calcium-silicate hybrid “smart” materials. *Dent Mater.* 2011; 27: 1055-69.
66. Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Properties of a novel polysiloxane-guttapercha calcium silicate-bioglass-containing root canal sealer. *Dent Mater.* 2016;32(5):e113-26.
67. Cintra LT, Ribeiro TA, Gomes-Filho JE, Bernabé PF, Watanabe S, Facundo AC et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of a new root canal sealer and root-end filling material. *Dent Traumatol.* 2013; 29(2): 145-50.
68. Register TC, McLean FM, Low MG, Wuthier RE. Roles of alkaline phosphatase and labile internal mineral in matrix vesicle-mediated calcification. Effect of selective release of membrane-bound alkaline phosphatase and treatment with isosmotic pH 6 buffer. *J Biol Chem* 1986; 261(20):9354-60.
69. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21(2):115-37.
70. 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(2): e9-e18.
71. Peter S J, Basha S K, Giridharan R, Lavinya B U, 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.

72. 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.
73. Laskin DL. Sinusoidal lining cells and hepatotoxicity. *Toxicol Pathol*. 1996; 24(1): 112-8.
74. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*. 2013; 3(2): 785-97.
75. International Organization for standardization. Biological evaluation of medical devices. Part 11: tests for acute systemic toxicity. Geneve: ISO; 2006.
76. Fakhouri J, Sarkis R, Chababi-Atallah M, Aftimos G. Toxic effects of methyl methacrylate monomer on male genital tissues. In vitro study in rats. *J Med Liban*. 2008; 56(1): 22-6.
77. Bakopolou A, Papadopoulos T, Garefis P. Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *Int J Mol Sci*. 2009; 10(9): 3861-99.
78. Nederberg F, Zhang Y, Tan JP, Xu K, Wang H, Yang C et al. Biodegradable nanostructures with selective lysis of microbial membranes. *Nat Chem* 2011; 3, 409-14.
79. Follmann CS. Análise local e sistêmica das reações tissulares a diferentes materiais utilizados em pulpotomias: estudo em ratos. [tese de doutorado]. Porto Alegre: Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2011.
80. Ramachandran R, Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease. *J Clin Pathol*. 2009; 62(6): 481-92.
81. 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.
82. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod*. 1998; 24(8): 543-7.
83. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. 2008; 245(3): 194-205.

84. Knight JA. Liver function tests: their role in the diagnosis of hepatobiliary diseases. *J Infus Nurs.* 2005; 28(2): 108-17.
85. 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.