

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 29/03/2024.



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



Marcela Borsatto Queiroz

**Reação tecidual e bioatividade de materiais endodônticos biocerâmicos
reparadores em subcutâneo de ratos**

Araraquara

2022



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



Marcela Borsatto Queiroz

**Reação tecidual e bioatividade de materiais endodônticos biocerâmicos
reparadores em subcutâneo de ratos**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri
Coorientador: Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho

Araraquara

2022

Q3r

Queiroz, Marcela Borsatto

Reação tecidual e bioatividade de materiais endodônticos
biocerâmicos reparadores em subcutâneo de ratos / Marcela Borsatto
Queiroz. -- Araraquara, 2022
139 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientador: Paulo Sérgio Cerri
Coorientador: Mário Tanomaru-Filho

1. Endodontia. 2. Teste de biocompatibilidade. 3.
Imuno-histoquímica. 4. Interleucina-6. 5. Osteocalcina. 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.

Marcela Borsatto Queiroz

**Reação tecidual e bioatividade de materiais endodônticos biocerâmicos
reparadores em subcutâneo de ratos**

Comissão julgadora

Para obtenção do grau de Doutora em Endodontia

1° Presidente e orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

2° Examinador: Profa. Dra. Gisele Faria

3° Examinador: Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato

4° Examinador: Prof. Dr. Guilherme Ferreira da Silva

Araraquara, 29 de Março de 2022.

DADOS CURRICULARES

Marcela Borsatto Queiroz

NASCIMENTO: 31/07/1990 – Araraquara – São Paulo

FILIAÇÃO: Elaine Maria Borsatto Queiroz
Rudney da Conceição Queiroz

2010-2013: Graduação em Odontologia pela Universidade Sagrado Coração (USC, UniSagrado), Bauru-SP.

2014-2016: Especialização em Endodontia pelo Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais (HRAC), Centrinho, USP, Bauru-SP.

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

Dedico esse trabalho aos meus pais (Rudney e Elaine), por todo amor, carinho, apoio e esforço para que eu pudesse estar aqui hoje. Ao meu noivo (Vinicius) por todo amor, incentivo e compreensão nesses 17 anos juntos. E por fim, dedico também aos meus avós: Aurora, José (*in memoriam*), Hilda (*in memoriam*) e Fernando (*in memoriam*), uma parte muito importante da minha história.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, onde eu tive a oportunidade de realizar meu mestrado e doutorado.

Agradeço principalmente e especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri, por ter me acolhido tão bem, pela paciência e por todos os ensinamentos.

Agradeço meu coorientador Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho pelos ensinamentos em Endodontia e pela oportunidade da pós-graduação.

Agradeço a Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru, por toda paciência, ensinamentos e contribuição.

Agradeço a Profa. Dra. Estela Sasso Cerri, pela convivência e colaboração.

Agradeço a todos os professores do departamento de Endodontia da FOAr-UNESP.

Agradeço imensamente todos os pós-graduandos da Endodontia e da Histologia pela convivência, ajuda e experiências compartilhadas.

Agradeço especialmente as minhas colegas do doutorado Rafaela e Camila, por toda ajuda e convivência nesses anos de pós-graduação.

Agradeço ao técnico do laboratório de Histologia (Pedro Sérgio Simões), pela paciência e auxílio na minha pesquisa.

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.

Agradeço por fim, aos meus pais (Rudney e Elaine) por todo esforço e incentivo para que eu estivesse aqui hoje. E também ao meu noivo (Vinicius) por todo amor, carinho e compreensão comigo.

“Os sonhos são como uma bússola, indicando os caminhos que seguiremos e as metas que queremos alcançar. São eles que nos impulsionam, nos fortalecem e nos permitem crescer.”
Augusto Cury*

* Cury A. Nunca desista de seus sonhos. Rio de Janeiro: Sextante; 2004.

Queiroz MB. Reação tecidual e bioatividade de materiais endodônticos biocerâmicos reparadores em subcutâneo de ratos [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

O objetivo foi avaliar a reação tecidual e o potencial bioativo causado por materiais biocerâmicos implantados no tecido conjuntivo do subcutâneo de ratos adultos. Para isso, tubos de polietileno preenchidos com um dos materiais ou vazios (grupo controle, GC) foram implantados no subcutâneo de ratos (n=8/grupo por período). Após 7, 15, 30 e 60 dias, os implantes e os tecidos circundantes foram removidos e processados para inclusão em parafina para análise dos seguintes parâmetros: número de células inflamatórias (CI) e de fibroblastos (Fb), espessura das cápsulas (EC), quantidade de colágeno birrefringente, imuno-histoquímica para detecção de interleucina-6 (IL-6) e osteocalcina (OCN), a reação de von Kossa e análise de cortes não corados sob luz polarizada. Os dados foram submetidos ao ANOVA two-way seguido pelo teste de Tukey ($p<0,05$). **Publicação 1:** Avaliar a biocompatibilidade e o potencial bioativo de um material reparador experimental à base de silicato tricálcico com 30% de tungstato de cálcio (TCS + CaWO_4) em comparação ao MTA Repair HP (MTA HP; Angelus, Brasil) e ao Bio-C Repair (Bio-C; Angelus, Brasil). Em todos os períodos, não houve diferenças significantes no número de CI, número de células IL-6-imunopositivas e no conteúdo de colágeno entre os materiais biocerâmicos ($p>0,05$). De 7 para 60 dias, ocorreu uma redução significativa no número de CI, na imunoexpressão de IL-6 e na EC, acompanhada por um aumento significativo no número de Fb e na quantidade de colágeno. Estruturas positivas ao von Kossa e birrefringentes, além de células imunopositivas à OCN foram observadas nas cápsulas ao redor de todos os materiais, exceto no GC. O TCS + CaWO_4 é biocompatível e apresentou potencial bioativo. **Publicação 2:** Comparar a resposta tecidual dos materiais à base de silicato tricálcico Bio-C Pulpo (Angelus, Brasil), Biodentine (Septodont, França) e MTA branco (WMTA; Angelus, Brasil). Aos 7 e 15 dias a EC dos materiais Bio-C Pulpo e Biodentine foram iguais e não houve diferença significativa ($p>0,05$), sendo maiores em comparação ao WMTA ($p<0,05$); as cápsulas ao redor de todos os materiais foram significativamente mais espessas em comparação ao GC ($p<0,05$). Aos 30 e 60 dias, a EC ao redor dos materiais não apresentou diferenças significantes em comparação à do GC. Apesar do maior número de CI observado aos 7 dias nas cápsulas do Biodentine em comparação ao Bio-C Pulpo e WMTA espécimes ($p<0,05$), diferenças significantes não foram observadas entre os grupos contendo os materiais ($p>0,05$), nos períodos de 15 e 30 e 60 dias. De 7 para 60 dias, ocorreu uma redução significativa na EC, no número de CI e de células IL-6-imunopositivas que foi acompanhada por um aumento significativo no número de Fb e na quantidade de colágeno nas cápsulas de todos os grupos. As cápsulas ao redor de todos os materiais apresentaram estruturas von Kossa-positivas e birrefringentes, e células OCN-imunopositivas, enquanto que estas estruturas bem como células imunopositivas à OCN não foram encontradas no GC. O Bio-C Pulpo, semelhantemente ao Biodentine e WMTA, é biocompatível e permite a reparação do tecido conjuntivo, além de induzir a imunoexpressão de osteocalcina e a deposição de calcita sugerindo que este material deve apresentar um potencial bioativo. Assim, o Bio-C Pulpo pode ser uma alternativa de material reparador em diferentes procedimentos clínicos de pulpotomia, capeamento pulpar direto e indireto, em dentes decidúos e dentes permanentes jovens.

Palavras chave: Endodontia. Teste de biocompatibilidade. Imuno-histoquímica. Interleucina-6. Osteocalcina.

Queiroz MB. Tissue reaction and bioactivity of bioceramic endodontic repair materials in subcutaneous tissue of rats [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

The aim was to evaluate the tissue reaction and the bioactive potencial caused by bioceramic materials implanted in the subcutaneous connective tissue of adult rats. For this, polyethylene tubes filled with one of the materials or empty (control group, CG) were implanted into the subcutaneous tissue of rats (n=8/group per period). After 7, 15, 30 and 60 days, the implants and surrounding tissues were removed and processed for embedding in paraffin to evaluate the following parameters: number of inflammatory cells (IC) and fibroblasts (Fb), capsule thickness (CT), amount of birefringent collagen, immunohistochemistry detection of interleukin-6 (IL-6) and osteocalcin (OCN), von Kossa reaction and analysis of unstained sections under polarized light. Data were submitted to two-way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$).

Publication 1: To evaluate the biocompatibility and bioactive potential of an experimental repair material containing 70% tricalcium silicate and 30% calcium tungstate (TCS + CaWO_4) compared to MTA Repair HP (MTA HP; Angelus, Brazil) and Bio- C Repair (Bio-C; Angelus, Brazil). In all periods, there were no significant differences in the number of IC, number of IL-6-immunolabelled cells and in the collagen content among the bioceramic materials ($p > 0.05$). From 7 to 60 days, there was a significant reduction in the number of IC, in the immunoexpression of IL-6 and in CT accompanied by a significant increase in the number of Fb and the amount of collagen. von Kossa-positive and birefringent structures, besides to OCN-immunolabelled cells were observed in the capsules around all materials, except in the CG. TCS + CaWO_4 is biocompatible and showed bioactive potencial.

Publication 2: To compare the tissue response of Bio-C Pulpo (Angelus, Brazil) with Biodentine (Septodont, France) and White MTA (WMTA; Angelus, Brazil) tricalcium silicate-based materials. At 7 and 15 days, significant difference was not found in the CT around Bio-C Pulpo and Biodentine specimens, but the CT of these groups was greater than in WMTA ($p < 0.05$); the CT around materials was significantly higher than in CG specimens ($p < 0.05$). At 30 and 60 days, significant difference in the CT was not detected among the groups, including the CG. Despite the higher number of IC observed at 7 days in Biodentine capsules than in Bio-C Pulpo and WMTA specimens ($p < 0.05$), no significant differences were observed among bioceramic materials ($p > 0.05$) at 15 and 30 and 60 days. From 7 to 60 days, there was a significant reduction in the number of IC, number of IL-6-immunopositive cells and CT, which was accompanied by a significant increase in the number of Fb and the amount of collagen in the capsules of all groups. The capsules around all materials showed von Kossa-positive and birefringent structures, and OCN-immunopositive cells, while these structures as well as OCN-immunopositive cells were not found in the CG. The Bio-C Pulpo, similarly to Biodentine and WMTA, is biocompatible and allows the connective tissue repair. Moreover, Bio-C Pulpo induces the immunoexpression of osteocalcin and the deposition of calcite suggesting that this material may have a bioactive potential. Thus, the Bio-C Pulpo can be an alternative repair material in different clinical procedures of pulpotomy, direct and indirect pulp capping, in deciduous teeth and young permanent teeth.

Keywords: Endodontics. Biocompatibility test. Immunohistochemistry. Interleukin-6. Osteocalcin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3 PUBLICAÇÕES	20
3.1 Publicação 1	20
3.2 Publicação 2	59
4 DISCUSSÃO	92
5 CONCLUSÃO.....	97
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICE A	110
ANEXO A	135
ANEXO B	136

1 INTRODUÇÃO

Um material reparador endodôntico ideal deve ter a capacidade de selar as vias de comunicação entre o sistema de canais radiculares e seus tecidos circundantes, deve ser não tóxico, não carcinogênico, não genotóxico, biocompatível, insolúvel em fluidos teciduais e dimensionalmente estável. Os materiais reparadores são amplamente utilizados em pulpotomias, proteções pulpares, processos de regeneração pulpar, barreiras apicais, perfurações radiculares e obturação retrógrada^{1,2}. Esses materiais apresentam silicato de cálcio em sua composição sendo considerados como bioativos³.

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) foi desenvolvido por Torabinejad, em 1993, e recomendado como material reparador, o primeiro a ser desenvolvido foi o MTA cinza³. Em 1998, o ProRoot MTA cinza (ProRoot MTA cinza; Denstply, Tulsa, OK, USA) foi introduzido no mercado. Este material continha na sua composição 53,1% de silicato tricálcico, 22,5% de silicato dicálcico, 21,6% de óxido de bismuto (Bi_2O_3) e vestígios de sulfato de cálcio⁴⁻⁶. Inicialmente a razão para a introdução do MTA branco como substituto do MTA cinza foi fornecer uma tonalidade mais próxima da cor dos dentes, em oposição à cor cinza contrastante⁷. Os elementos de transição tardia como por exemplo Cr, Mn, Fe, Cu têm elétrons d-livres (elétrons não envolvidos na ligação) por isso, exibem cores fortes quando em suas formas de óxido, já os óxidos de elementos que não possuem elétrons facilmente excitados como Mg, Al, Si, P, S, K, Ca e Ti tendem a ser incolores ou brancos, em contrapartida o elemento mais pesado Bi tem um óxido amarelo⁸. O MTA branco da Angelus (WMTA; Angelus, Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil), começou a ser comercializado em Março de 2002, é considerado um material biocompatível e possui capacidade de selamento e bioatividade⁹. A principal diferença na composição química entre o MTA cinza (ProRoot; Denstply, Tulsa, OK, USA) e o MTA branco (MTA; Denstply, Tulsa, OK, USA), é uma diminuição significativa na quantidade de ferro e outros elementos metálicos quando comparado ao cinza¹⁰.

O MTA (Angelus, Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil) foi denominado como material “hidráulico” à base de silicato de cálcio¹¹. A denominação de cimento “hidráulico” ocorreu em 2005^{12,11}, pois esse cimento necessita de água para a sua reação de presa (por meio de uma reação de hidratação). Assim, este material pode ser empregado em ambientes úmidos

contendo sangue, fluido tecidual, soluções irrigadoras e materiais restauradores¹². Há formação de carbonato de cálcio quando esses materiais estão em contato com o sangue¹³, em obturações retrógradas¹⁴, na utilização como material de barreira em procedimentos reparadores¹⁵, e formação de apatita quando o material é utilizado como cimento endodôntico em contato com a dentina¹⁶ e em terapias de polpa vital¹⁷.

O MTA é fabricado a partir do Cimento Portland (CP), utilizado na fabricação de concreto para a construção civil, tanto o ProRoot MTA^{4,5,12,18} quanto o MTA Angelus^{18,19}. Portanto, o MTA apresenta CP como componente principal¹⁸. Atualmente a empresa afirma que o MTA é produzido apenas a partir de produtos sintetizados. Pois, uma desvantagem seria que no estudo realizado com cimento Portland branco, cimento Portland cinza, GMTA e MTA, mostrou que esses materiais apresentavam contaminação por metais pesados como arsênio, cromo, cádmio, cobre, ferro, manganês, níquel, bismuto, zinco e chumbo²⁰. Em um estudo com duas marcas comerciais de MTA (MTA branco; Denstply, Tulsa, OK, USA e MTA branco; Angelus, Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil) mostrou que estes materiais contendo silicato de cálcio apresentaram nível de contaminação semelhante ao CP, onde levando em consideração que o MTA é constituído por 80% em peso do cimento, o nível de contaminação por íons metálicos é considerado alto em comparação ao CP²¹.

Com o intuito de eliminar esta desvantagem do MTA, devido aos efeitos adversos que esses metais pesados podem causar no organismo²², biomateriais contendo silicato tricálcico sintetizado puro têm sido pesquisados²³⁻²⁸. Sendo assim, a Angelus substituiu o CP industrial por misturas sintéticas de silicato de cálcio, por causa da preocupação com a lixiviação de íons de alumínio, detectados em vários órgãos periféricos e que também estão associados ao estresse oxidativo no cérebro²⁹⁻³¹. Além disso, metais pesados tóxicos como cromo, arsênico e chumbo são encontrados nos CP comerciais, resultantes do uso de matérias-primas e resíduos naturais impuros²¹. Com isso, atualmente os cimentos à base de silicatos de cálcio sintéticos são produzidos em laboratórios com a utilização de matérias-primas mais puras e com processos de fabricação apropriado a fim de evitar essas contaminações¹⁸.

Além da possibilidade de contaminação pelos metais pesados, a presença do óxido de bismuto (Bi_2O_3) como radiopacificador no MTA provocava aumento na porosidade³² e na solubilidade³³, diminuição na sua resistência à compressão^{5,32}, além

da possível redução na liberação de hidróxido de cálcio, prejudicando a estabilidade dimensional do material³³. Além disso, diversos estudos demonstraram a citotoxicidade^{34,35} e a reação inflamatória mais intensa provocada pelo óxido de bismuto em comparação à outros radiopacificadores, dentre eles o óxido de zircônio³⁶⁻³⁹, óxido de nióbio^{38,40} e tungstato de cálcio^{41,42}.

A presença do óxido de bismuto no MTA da Angelus também foi associada com a alteração de cor das estruturas dentais⁴³. A alteração de cor é atribuída a interação entre o óxido de bismuto com estruturas dentárias duras⁴³ e o hipoclorito de sódio utilizado como solução irrigadora durante o tratamento^{44,45}. O radiopacificador óxido de bismuto interage com a dentina e outros componentes, resultando na migração de íons para a dentina, causando assim uma alteração da coloração do dente^{43,44,46}. O óxido de bismuto é um bom agente radiopacificante devido ao seu alto peso molecular (465,96 g/mol), pois requer pequenas quantidades para um nível ideal de radiopacidade (ou seja, 3 mm de Al – norma ISO 6876/2012) em comparação com radiopacificadores alternativos, como o tungstato de cálcio com 287,92 g/mol e o óxido de zircônio com 123,21 g/mol de peso molecular⁴⁷.

Os cimentos à base de silicato tricálcico têm sido amplamente utilizados para terapia endodôntica desde a década de 90, quando o MTA foi introduzido⁴⁸. Há evidências de que o uso de silicato tricálcico fornece propriedades adequadas de manipulação, tempo de presa, solubilidade, pH alcalino ao microambiente e liberação de íons cálcio, escoamento e porosidade, além de boas propriedades biológicas^{23-29,49,50}.

Os cimentos à base de silicato tricálcico apresentam biocompatibilidade e estes materiais tem demonstrado também potencial bioativo^{27,51,52}. A hidratação do silicato tricálcico após reação com água forma silicato de cálcio hidráulico hidratado e hidróxido de cálcio⁵³. Viola et al.⁵⁴ (2012) avaliaram a resposta tecidual por meio de tubos de polietileno implantados no subcutâneo de ratos e preenchidos com os materiais MTAS (material experimental MTA Sealer), MTA Angelus e CP. Os autores encontraram que ocorreu um processo inflamatório moderado nas cápsulas que foi observado em todos os grupos nos períodos de 7 e 14 dias. Após 60 dias, verificaram a redução significativa do número de células inflamatórias em relação aos períodos iniciais, porém não houve diferenças significantes entre os grupos. A imunomarcagem de osteopontina (OPN) foi observada no citoplasma dos fibroblastos das cápsulas próximas aos implantes. Estruturas positivas para o de von Kossa foram também

observadas nas cápsulas adjacentes a todos os materiais implantados. Os resultados indicaram fortemente que o MTAS, MTA e o CP apresentaram biocompatibilidade e podem ser empregados como materiais reparadores endodônticos.

A Angelus, em virtude dos diversos estudos que apontavam a citotoxicidade do óxido de bismuto^{34,35}, em 2018, alterou sua formulação substituindo este radiopacificador pelo tungstato de cálcio (CaWO_4). O CaWO_4 associado ao CP, promoveu maiores valores de pH e de liberação de íons cálcio quando comparado ao MTA da Angelus⁵⁵, aumento da resistência à compressão e diminuição da solubilidade do CP^{55,56}. Além disso, não alterou as propriedades mecânicas e o tempo de presa final do cimento CP puro⁵⁶. Quando o CaWO_4 foi associado ao CP, o material manteve a sua propriedade antimicrobiana⁵⁷, além de não ser citotóxico⁵⁸.

A associação ao CP na proporção de 20% de CaWO_4 , proporcionou ao material a radiopacidade equivalente a 3,11 mm Al⁴⁷. A associação de 20% de CaWO_4 ao cimento de silicato de cálcio apresenta potencial bioativo semelhante ao do WMTA Angelus, contendo ainda o óxido de bismuto como agente radiopacificador⁵⁹, além de baixa solubilidade e fornecer um pH alcalino ao meio²⁶. A associação de 30% de CaWO_4 ao cimento de silicato de cálcio também resultou num cimento com adequadas propriedade físico-químicas tais como radiopacidade, tempo de presa, solubilidade, além de manter a liberação de hidroxila (OH^-), proporcionando uma alcalinização do meio e também apresentou viabilidade celular nos ensaios em cultura de células SAOS-2 de MTT (Metiltetrazólio), NR (vermelho neutro) e potencial bioativo devido à indução de formação de nódulos de mineralização e aumento da expressão de fosfatase alcalina^{28,60}.

O MTA Repair HP (MTA HP; MTA Repair High Plasticity; Angelus, Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil) é um material à base de silicato tricálcico que apresenta as mesmas indicações e o mesmo radiopacificador quando comparado ao WMTA Angelus (com o tungstato de cálcio), de acordo com o fabricante. Porém, uma diferença encontrada, é a sua consistência na manipulação. Uma das principais desvantagens do MTA Angelus e do ProRoot MTA (Dentsply, Tulsa Dental, Tulsa) é a sua consistência de manipulação e sua dificuldade de inserção e condensação clínica^{2,61}. Com isso o MTA HP foi desenvolvido a fim de melhorar essa característica. MTA HP é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio e tungstato de cálcio (CaWO_4) em seu

pó enquanto o líquido contém água e plastificantes, de acordo com o fabricante (Angelus, MTA Repair HP). A presença de plastificantes em seu líquido melhorou a capacidade de manipulação desse material, já que o WMTA Angelus apresenta uma consistência arenosa e de difícil inserção^{3,62}. Há evidência de que a cultura de células de fibroblastos L929 na presença de MTA Angelus contendo óxido de bismuto mostrou-se mais citotóxica em comparação ao MTA HP⁶². Além disso, o MTA HP implantado no tecido conjuntivo do subcutâneo de ratos apresentou biocompatibilidade, além de resultados que apontam para uma possível bioatividade deste material^{52,62}.

Outro radiopacificador utilizado em materiais reparadores à base de silicato de cálcio é o óxido de zircônio (ZrO_2) que mostrou ser “inerte”³³, desde que não alterou as propriedades do material à base de silicato de cálcio^{36,63,64}. A associação de ZrO_2 ao material à base de silicato de cálcio não interferiu na liberação do íons cálcio^{24,36}, e na capacidade de alcalinizar o meio, além de manter o potencial bioativo do material^{22,36}. Além disso, este radiopacificante não sofre lixiviação quando imerso em água ou HBSS²⁴. Quando o silicato de cálcio hidráulico está associado ao radiopacificador ZrO_2 , apresenta um tempo de presa semelhante ao do MTA Angelus (contendo o óxido de bismuto), baixa solubilidade, radiopacidade superior a 3 mm Al, além de proporcionar um pH alcalino ao meio^{26,36}. O ZrO_2 microparticulado ou nanoparticulado associado aos cimentos à base de silicato de cálcio, proporcionou adequadas propriedades físico-químicas de radiopacidade, tempo de presa, pH alcalino ao meio e resistência a compressão, além de promover uma menor reação inflamatória em comparação ao óxido de bismuto³⁶.

Um material que apresenta ZrO_2 em sua composição é o Biodentine (Septodont, Saint Maur des Fossés, França), que é um biomaterial à base de silicato de cálcio com indicações como material reparador semelhantes às do MTA⁶⁶⁻⁷⁰, porém este material apresenta melhor consistência em comparação ao WMTA⁷¹. Biodentine consiste em um pó que contém silicato tricálcico e dicálcico, carbonato de cálcio, além do ZrO_2 como agente radiopacificante. O líquido é composto por cloreto de cálcio e redutor de água em solução aquosa com mistura de um superplastificante à base de policarboxilato^{67,69}. A hidratação do MTA é mais lenta que a do Biodentine e do silicato tricálcico associado a 20% de ZrO_2 , devido à menor quantidade de silicato tricálcico presente no material²³. O Biodentine possui um tempo de presa inicial de aproximadamente 16,2 minutos e final de aproximadamente 35,4 minutos, menor que

o do MTA Angelus que possui tempo de presa inicial de aproximadamente 24 minutos e final de aproximadamente 209 minutos. O Biodentine possui radiopacidade de aproximadamente 2,79 mm de Al, sendo considerada abaixo do valor da norma ISO 6876/2002⁷². Células Saos-2 cultivadas com extratos de Biodentine e de MTA apresentaram índices de viabilidade celular dentro de padrões que permitiram sugerir que estes materiais são citocompatíveis. Biodentine e de MTA adicionados a cultura de células Saos-2 transfectadas com o gene que codifica a proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2) mostraram resultados sugestivos de que estes materiais devem apresentar bioatividade⁷³. Perfurações de furca em molares de ratos selados com Biodentine ou MTA (com óxido de bismuto) promoveram uma redução significativa no infiltrado inflamatório, na imunoexpressão de interleucina-6 (IL-6) e de osteoclastos, além de favorecerem o aumento significativo de fibroblastos, osteoblastos e colágeno no ligamento periodontal, indicando que os materiais favoreceram a reparação dos tecidos periodontais⁷⁴. O Biodentine também induziu a formação de tecido mineralizado pelas células do periodonto em dentes de cães com perfuração de furca³⁸. Implantes de Biodentine no tecido conjuntivo do subcutâneo também apresentou cápsulas com estruturas positivas ao von Kossa nos períodos de 1, 4 e 8 semanas, além da detecção de precipitados superficiais nos implantes contendo cálcio e fósforo após a realização de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de raios X por dispersão de energia (SEM/EDX), sugerindo o potencial bioativo deste material⁷⁵. A presença de calcificação distrófica foi observada após 15 dias em cápsulas formadas em resposta ao MTA e ao Biodentine, bem como impregnação de prata pelo método de von Kossa nas estruturas, indicando o início do processo de mineralização. Na análise de luz polarizada, as cápsulas ao redor do WMTA e Biodentine, após 30 e 60 dias, apresentaram estruturas birrefringentes próximas à abertura dos tubos, indicando a formação de estruturas mineralizadas⁷⁶.

O Bio-C Repair (Angelus, Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil) é composto por silicatos de cálcio, aluminato de cálcio, óxido de cálcio, óxido de zircônio, óxido de ferro, dióxido de silício e agente de dispersão, que se apresenta pronto para uso e com indicações semelhantes ao MTA. Benetti et al.⁷⁷ (2019) avaliaram a citotoxicidade, a biocompatibilidade e a biomineralização dos materiais MTA, MTA HP e Bio-C Repair, por meio da exposição de células de fibroblastos L929 aos extratos dos materiais, bem como por meio de implantes em subcutâneo de ratos por 7 e 30 dias. A análise das culturas das células L929 revelaram

que todos os materiais apresentaram citocompatibilidade após 48 horas de exposição aos extratos em todas as diluições. Após 7 e 30 dias aos implantes no subcutâneo, os materiais causaram uma resposta inflamatória moderada e leve, respectivamente, e todos apresentaram cápsulas contendo estruturas positivas ao von Kossa e birrefringentes, sugerindo potencial para induzir biomineralização.

Lopés-Garcia et al.⁷⁸ (2019) demonstraram as propriedades biológicas do cimento Bio-C Repair, onde apresentou valor de pH alcalino e maior viabilidade celular, adesão celular e maiores taxas de migração celular em células da polpa dentária humana (hDPCS), quando comparado ao Bio-C Sealer. Ghilotti et al.⁷⁹ (2020) avaliaram a citotoxicidade do Bio-C Repair e o Biodentine em hDPCS, por meio da análise da viabilidade celular (ensaio MTT), morfologia celular (ensaio de imunofluorescência) e fixação celular (ensaio de citometria de fluxo), e a caracterização dos elementos químicos dos materiais foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e análise de energia dispersiva de raios X (SEM-EDX); os autores observaram que o Biodentine era composto principalmente por cálcio, carbono e oxigênio (entre outros elementos), enquanto que o Bio-C Repair evidenciou uma baixa concentração de cálcio e a maior concentração de zircônio, na análise de MEV houve uma adesão adequada das células da polpa aos materiais sem alterações no citoesqueleto nos eluatos dos materiais; o Bio-C Repair apresentou excelente citocompatibilidade semelhante ao Biodentine. Oliveira et al.⁸⁰ (2020) analisaram a descoloração, radiopacidade, pH e liberação de íons cálcio de Biodentine, Bio-C Repair e Bio-C temp e seus efeitos biológicos nas células da polpa dental humana (hDPCs); os autores concluíram que o Bio-C Repair apresentou maior radiopacidade e menor alteração de cor do que os demais materiais avaliados e viabilidade celular maior que 80%, porém todos os materiais proporcionaram valores de pH alcalino ao meio de imersão.

O Bio-C Pulpo (Angelus, Brasil) é um material biocerâmico que contém o radiopacificador ZrO_2 em sua composição. Ele é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, cálcio aluminato, hidróxido de cálcio, óxido de zircônio, fluoreto de cálcio, dióxido de silicone e óxido de ferro e seu líquido apresenta água destilada, plastificante, cloreto de cálcio e metilparabeno. Este material possui propriedades físico-químicas adequadas no que se refere a radiopacidade, tempo de presa, escoamento, alteração dimensional, além de proporcionar uma alcalinização ao meio⁸¹. O Bio-C Pulpo é um material biocompatível e induz a imunoexpressão de osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN) e sialoproteína óssea (BSP) no tecido

conjuntivo do subcutâneo de ratos, semelhantemente ao MTA (Angelus) com o óxido de bismuto como radiopacificador⁸². Bio-C Pulpo, MTA HP e MTA (com tungstato de cálcio) quando implantados no subcutâneo de ratos induziram inicialmente uma reação inflamatória moderada que reduziu gradativamente com o decorrer do tempo. Além disso, o Bio-C Pulpo, semelhantemente ao MTA HP e ao WMTA, promoveu a deposição de estruturas positivas ao von Kossa, além de estruturas birrefringentes sugerindo que estes materiais biocerâmicos possam ter um papel indutor na biomineralização. Esta hipótese foi reforçada pela presença da fosfatase alcalina em células adjacentes às estruturas von Kossa-positivas. Além disso, a análise histológica de cortes do fígado e análises bioquímicas das enzimas hepáticas glutâmico-oxaloacético transaminase (GOT) e glutâmico-pirúvico transaminase (GPT) também indicaram que estes materiais não induzem alterações no fígado⁵².

Estudos prévios avaliando as propriedades físico-químicas, biológicas e antimicrobianas de materiais à base de silicato tricálcico puro (Mineral Research Processing, Meyzieu, França) associado aos radiopacificadores ZrO_2 , $CaWO_4$ e o MTA HP demonstraram que esses materiais apresentaram adequadas propriedades físico-químicas no que se refere ao tempo de presa, solubilidade, pH e radiopacidade. Os materiais apresentaram citocompatibilidade quando expostos às células Saos-2, além de estimular a expressão gênica para fosfatase alcalina e deposição de estruturas positivas ao vermelho de alizarina, sugerindo um potencial bioativo destes materiais. Os cimentos de TCS associados ao ZrO_2 ou $CaWO_4$ bem como o MTA HP apresentaram efetividade contra as bactérias *E. faecalis*. Esses dados sugerem que o cimento de TCS puro associado aos radiopacificadores ZrO_2 , $CaWO_4$ são semelhantes ao MTA HP e apresentam boas propriedades para serem utilizados como biomateriais reparadores na Endodontia^{28,50}. O TCS + $CaWO_4$ apresentou os maiores valores de radiopacidade (4.61 mm Al), a menor solubilidade (0,81%) e pH alcalino em todos os períodos avaliados (3 horas, 12 horas, 24 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias). Os resultados obtidos com células Saos-2 cultivadas com extrato do TCS + $CaWO_4$ sugeriram que este material é citocompatível; no ensaio de qPCR (PCR real time) ocorreu a estimulação da maior expressão gênica para fosfatase alcalina (ALP), além disso houve a deposição de estruturas positivas ao vermelho de alizarina (ARS), sugerindo um potencial bioativo deste material. No teste de contato direto com células planctônicas do *E. faecalis* não foram detectadas unidades formadoras de colônias (CFU), sugerindo o potencial anti-microbiano deste material. Diante desses resultados

promissores do material TCS associado à 30% de CaWO_4 obtidos no estudo *in vitro*²⁸ e diante da norma ISO 10993-6/2006 que preconiza que os materiais sejam avaliados *in vivo*, particularmente a sua biocompatibilidade, foi idealizado o modelo experimental do presente estudo. As avaliações de biocompatibilidade e bioatividade são importantes, desde que os materiais reparadores endodônticos entram em íntimo contato com os tecidos periapicais^{38,83}. Dentre os diferentes métodos para avaliar a biocompatibilidade de materiais, a análise da reação inflamatória associada a espessura da cápsula são parâmetros indicativos da intensidade bem como da extensão do processo inflamatório induzido pelos materiais endodônticos^{52,84-86}. A detecção imuno-histoquímica de interleucinas (IL) pró-inflamatórias, dentre elas a IL-1 e IL-6, constitui-se em parâmetros que fornecem maior suporte aos resultados quantitativos da reação inflamatória^{52,84-87}. A IL-6 é produzida por uma variedade de células que incluem macrófagos, linfócitos, plasmócitos, células endoteliais, fibroblastos e mastócitos^{83,88}. Há indícios de que essa citocina seja responsável pela manutenção da reação inflamatória, maturação dos plasmócitos e ativação e diferenciação das células T^{88,89}. A redução significativa na imunoexpressão da IL-6 que ocorre concomitante à regressão do processo inflamatório, aponta para uma importante participação desta interleucina na cascata de eventos induzidos pelos materiais dentários implantados no tecido conjuntivo do subcutâneo de ratos, constituindo-se numa metodologia indicada para a avaliação do processo inflamatório^{52,83,86,87,90}.

O potencial bioativo dos materiais endodônticos implantados no tecido conjuntivo do subcutâneo tem sido avaliado por diferentes metodologias, dentre elas a detecção de osteocalcina (OCN)^{51,52,77}, osteopontina^{54,91,92} e sialoproteína óssea^{92,82}, proteínas da matriz óssea que são secretadas pelos osteoblastos. A detecção de fosfatase alcalina, enzima envolvida com o processo de mineralização dos tecidos, também tem sido utilizada como uma das ferramentas sugestivas do potencial bioativo dos materiais endodônticos^{52,85}. O método de von Kossa para detectar a deposição de cálcio/fosfato⁹³ nas cápsulas ao redor dos implantes tem sido amplamente utilizado como um método sugestivo do potencial bioativo dos materiais. Frequentemente, à este método associa-se a análise sob luz polarizada de cortes sem coloração para avaliar a presença de estruturas birrefringentes, que são indicativas de calcita amorfa^{52,62,77,86,94,95}.

Diante dos resultados *in vitro* favoráveis obtidos com o cimento experimental à base de silicato tricálcico (TCS) contendo 30% de CaWO_4 ²⁸, no presente estudo foi avaliado *in vivo* a reação tecidual e a bioatividade deste material experimental (70% de TCS + 30% do CaWO_4) em comparação ao Bio-C Repair e MTA HP. No segundo artigo, nosso propósito foi comparar a resposta tecidual dos materiais biocerâmicos reparadores que também podem ser indicados para pulpotomia, Bio-C Pulpo em comparação ao Biodentine e WMTA.

5 CONCLUSÃO

O TCS + 30% CaWO_4 constitui uma alternativa como material de reparo, pois este material biocerâmico permite a proliferação de fibroblastos e a formação de colágeno ao longo do tempo. Além disso, este material biocerâmico experimental permite a precipitação de cristais de calcita e estimula a produção de osteocalcina, sugerindo que este material possui potencial bioativo.

As alterações feitas no Bio-C Pulpo e Biodentine para melhorar o manuseio de materiais biocerâmicos possivelmente devem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela acentuada imunoexpressão da citocina pró-inflamatória IL-6 inicialmente detectada no tecido conjuntivo. No entanto, a redução significativa da imunoexpressão de IL-6 e da reação inflamatória ao redor de Bio-C Pulpo e Biodentine paralelamente ao aumento do número de fibroblastos e da quantidade nas fibras de colágeno, indicam que esses materiais biocerâmicos são biocompatíveis e também podem permitir o reparo do tecido conjuntivo. A presença de depósitos positivos ao von Kossa, estruturas de calcita birrefringentes e células imunomarcadas à osteocalcina sugerem que Bio-C Pulpo e Biodentine apresentam potencial bioativo.

REFERÊNCIAS*

1. Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J*. 2006; 39(10):747–54.
2. 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.
3. 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.
4. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2007; 40(6):462-70.
5. Camilleri J. The physical properties of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J*. 2008; 41(2):151-7.
6. Gandolfi MG, Ciapetti G, Taddei P, Perut F, Tinti A, Cardoso MV, et al. Apatite formation on bioactive calcium-silicate cements for dentistry affects surface topography and human marrow stromal cells proliferation. *Dent Mater*. 2010; 26(10):974-92.
7. Glickman GN, Koch KA. 21st-century. *Endod J Am Dent Assoc* 1939. 2000; 131:39S–46S.
8. Sienko MJ, Plane RA. *Chemistry*. McGraw-Hill, New York. 1961.
9. Parirokh M, Torabinejad M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. *Int Endod J*. 2018; 51(2): 177-205.
10. Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2005; 31(2): 101–103.
11. Darvell BW, Wu RC. "MTA"- a hydraulic silicate cement: review update and setting reaction. *Dent Mater*. 2011; 27(5): 407-22.

* 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>

12. Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, Pitt Ford TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J*. 2005; 38(11): 834–42.
13. Schembri Wismayer P, Lung CY, Rappa F, Cappello F, Camilleri J. Assessment of the interaction of Portland cement-based materials with blood and tissue fluids using an animal model. *Sci Rep*. 2016; 6: 34547.
14. Moinzadeh AT, Farack L, Wilde F, Shemesh H, Zaslansky P. Synchrotron-based phase contrast-enhanced micro-computed tomography reveals delaminations and material tearing in water-expandable root fillings ex vivo. *J Endod*. 2016; 42(5): 776–81.
15. Meschi N, Li X, Van Gorp G, Camilleri J, Van Meerbeek B, Lambrechts P. Bioactivity potential of Portland cement in regenerative endodontic procedures: from clinic to lab. *Dent Mater*. 2019; 35(9):1342–50.
16. Xuereb M, Vella P, Damidot D, Sammut CV, Camilleri J. In situ assessment of the setting of tricalcium silicate-based sealers using a dentin pressure model. *J Endod*. 2015; 41(1):111–24.
17. Li Z, Cao L, Fan M, Xu Q. Direct pulp capping with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate: a meta-analysis. *J Endod*. 2015; 41(9):1412–17.
18. Camiller J. Classification of hydraulic cements used in dentistry. *Front in Dent Med*. 2020; 1:9.
19. Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and Portland cements. *Braz Dent J*. 2007; 18(1):3–7.
20. Chang SW, Shon WJ, Lee W, Kum KY, Baek SH, Bae KS. Analysis of heavy metal contents in gray and white MTA and 2 kinds of Portland cement: a preliminary study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010; 109(4):642-6.
21. Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of heavy metals in mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod*. 2010; 36(7):1210–15.
22. Camilleri J. Evaluation of the effect of intrinsic material properties and ambient conditions on the dimensional stability of white mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod*. 2011; 37(2):239-45.

23. 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.
24. Camilleri J, Laurent P, About I. Hydration of Biodentine, Theracal LC, and a proto- type tricalcium silicate-based dentin replacement material after pulp capping in entire tooth cultures. *J Endod* 2014; 40:1846–54.
25. Taha NA, Safadi RA, Alwedaie MS. Biocompatibility evaluation of endosequence root repair paste in the connective tissue of rats. *J Endod.* 2016; 42(10):1523-8.
26. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Duarte MA, Tanomaru-Filho M. Physicochemical properties of calcium silicate cements associated with microparticulate and nanoparticulate radiopacifiers. *Clin Oral Investig.* 2016; 20(1): 83-90.
27. Barbosa DD, Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Silva GF, et al. Histomorphometric and immunohistochemical study shows that tricalcium silicate cement associated with zirconium oxide or niobium oxide is a promising material in the periodontal tissue repair of rat molars with perforated pulp chamber floors. *Int Endod J.* 2021; 54(5):736-52.
28. Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, Viola KS, Bosso-Martelo R, Chavez-Andrade GM, et al. Physicochemical, biological, and antibacterial evaluation of tricalcium silicate-based reparative cements with different radiopacifiers. *Dent Mater.* 2021; 37(2):311-20.
29. Demirkaya K, Demirdöğen BC, Torun ZÖ, Erdem O, Çırak E, Tunca YM. Brain aluminium accumulation and oxidative stress in the presence of calcium silicate dental cements. *Hum Exp Toxicol.* 2017; 36(10):1071–80.
30. Simsek N, Bulut ET, Ahmetoğlu F, Alan H. Determination of trace elements in rat organs implanted with endodontic repair materials by ICP-MS. *J Mater Sci. Mater Med.* 2016; 27(3):46.
31. Demirkaya K, Demirdöğen BC, Torun ZÖ, Erdem O, Çırak E, Tunca YM. Brain aluminium accumulation and oxidative stress in the presence of calcium silicate dental cements. *Hum Exp Toxicol.* 2017; 36(10):1071–80.

32. Coomaraswamy K, Lumley PJ, Hofmann MP. Effect of bismuth oxide radiopacifier content on the material properties of an endodontic Portland cement-based (MTA-like) System. *J Endod*. 2007; 33(3):295-8.
33. Camilleri J, Mallia B. Evaluation of the dimensional changes of mineral trioxide aggregate sealer. *Int Endod J*. 2011; 44(5):416-24.
34. Coutinho-Filho T, De-Deus G, Klein L, Manera G, Peixoto C, Gurgel-Filho ED. Radiopacity and histological assessment of Portland cement plus bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 106(6):e69-77.
35. Hwang YC, Lee SH, Hwang IN, Kang IC, Kim MS, Kim SH, et al. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 107(3):e96-102.
36. 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.
37. Slompo C, Peres-Buzalaf C, Gasque KC, Damante CA, Ordinola-Zapata R, Duarte MA, et al. Experimental calcium silicate-based cement with and without zirconium oxide modulates fibroblasts viability. *Braz Dent J*. 2015; 26(6):587–91.
38. Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, da Fonseca TS, Bernardi MIB, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, et al. Zirconium oxide and niobium oxide used as radiopacifiers in a calcium silicate-based material stimulate fibroblast proliferation and collagen formation. *Int Endod J*. 2017; 50 Suppl 2:e95-e108.
39. Andrade GM, Bonetti-Filho I, Guerreiro-Tanomaru JM. A novel model for evaluating the flow of endodontic materials using micro-computed tomography. *J Endod*. 2017; 43(5):796–800.
40. Silva GF, Tanomaru-Filho M, Bernardi MI, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. Niobium pentoxide as radiopacifying agent of calcium silicate-based material: evaluation of physicochemical and biological properties. *Clin Oral Investig*. 2015; 19(8):2015-25.

41. Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llana 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.
42. Galarça AD, Da Rosa WLO, Da Silva TM, da Silveira Lima G, Carreño NLV, Pereira TM, et al. Physical and biological properties of a high-plasticity tricalcium silicate cement. *Biomed Res Int.* 2018; 27:2018:8063262.
43. Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J. Calcium silicate-based sealers: assessment of physicochemical properties, porosity and hydration. *Dent Mater.* 2016; 32(2): 30-40.
44. Camilleri J. Tricalcium silicate cements with resins and alternative radiopacifiers. *J Endod.* 2014; 40(12):2030–5.
45. Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. *Clin Oral Investi.* 2015; 19(9):2201–9.
46. Felman D, Parashos P. Coronal tooth discoloration and white mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013; 39(4):484–7.
47. Húngaro Duarte MA, de Oliveira EI, Kadre GD, Vivan RR, Guerreiro Tanomaru JM, Tanomaru Filho M. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod.* 2009; 35(5):737-40.
48. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995; 21(7):349–53.
49. Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J. Calcium silicate-based sealers: assessment of physicochemical properties, porosity and hydration. *Dent Mater.* 2016; 32(2): 30-40.
50. Queiroz MB, Torres FFE, Rodrigues EM, Viola KS, Bosso-Martelo R, Chavez-Andrade GM, et al. Development and evaluation of reparative tricalcium silicate-ZrO₂ - Biosilicate composites. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2021; 109(4):468-76.
51. 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(10):1470-77.

52. Delfino MM, de Abreu Jampani JL, Lopes CS, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Cerri PS. Comparison of Bio-C Pulpo and MTA Repair HP with White MTA: effect on liver parameters and evaluation of biocompatibility and bioactivity in rats. *Int Endod J.* 2021; 54(9):1597-613.
53. Camilleri J, Gandolfi MG, Siboni F, Prati C. Dynamic sealing ability of MTA root canal sealer. *Int Endod J.* 2011; 44(1):9-20.
54. 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.
55. 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.
56. Tanomaru-Filho M, Torres F, Bosso-Martelo R, Chávez-Andrade GM, Bonetti-Filho I, Guerreiro-Tanomaru JM. A novel model for evaluating the flow of endodontic materials using micro-computed tomography. *J Endod.* 2017; 43(5):796–800.
57. Guerreiro-Tanomaru JM, Vázquez-García FA, Bosso-Martelo R, Bernardi MI, Faria G, Tanomaru-Filho M. Effect of addition of nano-hydroxyapatite on physico-chemical and antibiofilm properties of calcium silicate cements. *J Appl Oral Sci.* 2016; 24(3):204-10.
58. 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.
59. Bosso-Martelo R, Guerreiro-Tanomaru JM, Viapiana R, Berbert FL, Basso Bernardi MI, Tanomaru-Filho M. Calcium silicate-based cements associated with micro- and nanoparticle radiopacifiers: physicochemical properties and bioactivity. *Int Sch Res Notices.* 2015; 23; 2015:874283.
60. 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; 13;9(1):19019.

61. Torabinejad M, Parirokh M, Dummer PMH. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part II: other clinical applications and complications. *Int Endod J*. 2018; 51(3):284-317.
62. Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, de Araújo Lopes JM, Penha de Oliveira SH, et al. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. *J Endod*. 2017; 43(5): 774-8.
63. Cutajar A, Mallia B, Abela S, Camilleri J. Replacement of radiopacifier in mineral trioxide aggregate; characterization and determination of physical properties. *Dent Mater*. 2011; 27(9): 879–91.
64. Antonijevic D, Medigovic I, Zrilc M, Jokic B, Vukovic Z, Todorovic L. The influence of different radiopacifying agents on the radiopacity, compressive strength, setting time, and porosity of Portland cement. *Clin Oral Investig*. 2014; 18 (6):1597-604.
65. Camilleri J, Grech L, Galea K, Keir D, Fenech M, Formosa L, Damidot D, Mallia B. Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(5):1437-46.
66. Laurent P, Camps J, De Meo M, Dejou 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.
67. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine (TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J*. 2012; 45(5):439-48.
68. Koubi S, Elmerini H, Koubi G, Tassery H, Camps J. Quantitative evaluation by glucose diffusion of microleakage in aged calcium silicate-based open-sandwich restorations. *Int J Dent*. 2012; 2012:105863.
69. Tran XV, 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.
70. Koubi G, Colon P, Franquin JC, Hartmann A, Richard G, Faure MO, *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.

71. Butt N, Talwar S, Chaudhry S, Nawal RR, Yadav S, Bali A. Comparison of physical and mechanical properties of mineral trioxide aggregate and Biodentine. *Indian J Dent Res.* 2014; 25(6):692-7.
72. Lucas CP, 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.
73. 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.
74. 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 Invest.* 2019; 23(3):1237–52.
75. Talabani RM, Garib BT, Masaeli R, Zandsalimi K, Ketabat F. Biomineralization of three calcium silicate-based cements after implantation in rat subcutaneous tissue. *Restor Dent Endod.* 2020; 46(1):e1.
76. Souza TA, Bezerra MM, Silva P, Costa J, Carneiro R, Barcelos J, et al. Bone morphogenetic proteins in biomineralization of two endodontic restorative cements. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2021; 109(3):348–57.
77. Benetti F, Queiroz ÍOA, Cosme-Silva L, Conti LC, Oliveira SHP, Cintra LTA. Cytotoxicity, biocompatibility and biomineralization of a new ready-for-use bioceramic repair material. *Braz Dent J.* 2019; 30(4):325-32.
78. López-García S, Lozano A, García-Bernal D, Forner L, Llena C, Guerrero-Gironés J, et al. Biological effects of new hydraulic materials on human periodontal ligament stem cells. *J Clin Med.* 2019; 8(8):1216.
79. Ghilotti J, Sanz JL, López-García S, Guerrero-Gironés J, Pecci-Lloret MP, Lozano A, et al. Comparative surface morphology, chemical composition, and cytocompatibility of bio-c repair, biodentine, and proroot mta on hDPCs. *Materials (Basel).* 2020; 13(9):2189.

80. Oliveira LV, de Souza GL, da Silva GR, Magalhães TEA, Freitas GAN, Turrioni AP, de Rezende Barbosa GL, Moura CCG. Biological parameters, discolouration and radiopacity of calcium silicate-based materials in a simulated model of partial pulpotomy. *Int Endod J*. 2021; 54(11):2133-44.
81. Pelepenko LE, Saavedra F, Antunes TBM, Bombarda GF, Gomes BPFA, Zaia AA, Marciano MA. Investigation of a modified hydraulic calcium silicate-based material - Bio-C Pulpo. *Braz Oral Res*. 2021; 16;35:e077.
82. Cosme-Silva L, Gomes-Filho JE, Benetti F, Dal-Fabbro R, Sakai VT, Cintra L, et al. Biocompatibility and immunohistochemical evaluation of a new calcium silicate-based cement, Bio-C Pulpo. *Int Endod J*. 2019; 52(5):689–700.
83. 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.
84. Saraiva JA, da Fonseca TS, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, et al. Reduced interleukin-6 immunoexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. *Biomed Mater*. 2018; 20;13(3):035002.
85. Hoshino RA, Delfino MM, da Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, et al. Biocompatibility and bioactive potential of the NeoMTA Plus endodontic bioceramic-based sealer. *Restorative dentistry & endodontics*. 2020; 46(1):e4.
86. Delfino MM, Guerreiro-Tanomaru JM, 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(1):7173.
87. Hoshino RA, Silva G, 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.
88. 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.

89. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014; 4,6(10):a016295.
90. Silva ECA, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Lopes CS, Cerri PS, Guerreiro Tanomaru JM. Evaluation of the biological properties of two experimental calcium silicate sealers: an in vivo study in rats. *Int Endod J.* 2021; 54(1):100-11.
91. Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sørensen ES, Boskey AL. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int.* 2005; 77(1):45–54.
92. Wei F, Wang C, Zhou G, Liu D, Zhang X, Zhao Y, et al. The effect of centrifugal force on the mRNA and protein levels of ATF4 in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(1):35–43.
93. Puchtler H, Meloan SN. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. *Histochemistry.* 1985; 82(3):201-4.
94. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod.* 1999; 25(3): 161-6.
95. Bueno CRE, Vasques AMV, Cury MTS, Sivieri-Araújo G, Jacinto RC, Gomes-Filho JE, et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of mineral trioxide aggregate flow. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(1):169-77.
96. Beyer-Olsen EM, Orstavik D. Radiopacity of root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981; 51(3):320–28.
97. Laghios CD, Benson BW, Gutmann JL, Cutler CW. Comparative radiopacity of tetracalcium phosphate and other root-end filling materials. *Int Endod J.* 2000; 33(4):311–15.
98. Ferreira C, Sassone LM, Gonçalves AS, de Carvalho JJ, Tomás-Catalá C. J, 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.
99. 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:e102.

100. Oliveira LV, de Souza GL, da Silva GR, Magalhães T, Freitas G, Turrioni AP, et al. Biological parameters, discolouration and radiopacity of calcium silicate-based materials in a simulated model of partial pulpotomy. *Int Endod J*. 2021; 54(11): 2133–44.
101. Cosme-Silva L, Santos A, Lopes CS, Dal-Fabbro R, Benetti F, Gomes-Filho JE, et al. Cytotoxicity, inflammation, biomineralization, and immunoexpression of IL-1 β and TNF- α promoted by a new bioceramic cement. *Journal of applied oral science*. 2020; 28: e20200033.
102. 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): 1081–87.
103. 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.
104. Kang JY, Lee BN, Son HJ, Koh JT, Kang SS, Son HH, et al. Biocompatibility of mineral trioxide aggregate mixed with hydration accelerators. *J Endod*. 2013; 39(4):497–500.
105. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008; 29(20):2941-53.
106. Liu S, Wang S, Dong Y. Evaluation of a bioceramic as a pulp capping agent in vitro and in vivo. *J Endod*. 2015; 41(5):652-7.
107. Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C. Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate. *J Endod*. 2014; 40(10):1632–37.
108. Niu LN, Jiao K, Wang TD, Zhang W, Camilleri J, Bergeron BE, et al. A review of the bioactivity of hydraulic calcium silicate cements. *J Dent*. 2014; 42(5):517–33.
109. Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of calcium hydroxide cement. *Arch Oral Biol*. 1991; 36:117–28.
110. Camilleri J, Grech L, Galea K, Keir D, Fenech M, Formosa L, Damidot D, Mallia B. Porosity and root dentine to material interface assessment of calcium silicate-based root-end filling materials. *Clin Oral Investig*. 2014; 18(5):1437-46.

111. Peters OA. Research that matters - biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int Endod J*. 2013; 46(3): 195–97.
112. Collado-González M, López-García S, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Tomás-Catalá 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.