



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

GUSTAVO RAMOS SCHIAVETTI

**Avaliação da biocompatibilidade e capacidade de
biomineralização de um agregado de trióxido mineral
experimental em tecido subcutâneo de ratos wistar**

Araçatuba

2023

GUSTAVO RAMOS SCHIAVETTI

**Avaliação da biocompatibilidade e capacidade de
biomineralização de um agregado de trióxido mineral
experimental em tecido subcutâneo de ratos wistar**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP, na área de Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Eloi Dezan Júnior

Araçatuba

2023

Dedico este trabalho

À minha família, em especial ao meu pai, Élcio José Schiavetti, minha mãe, Elaine Zélia Ramos Schiavetti, e meu irmão, Rafael Ramos Schiavetti, por serem meus maiores exemplos de determinação e respeito. Obrigado por estarem sempre me apoiando e por não medirem esforços para que os meus sonhos se realizem. Outrossim, dedico ao meu tio, Márcio Luis Ramos (in memoriam), que lutou com todas as suas forças para estar presente na minha formatura, mas tenho a certeza de que sempre estará entre nós, orgulhoso de toda conquista alcançada. Tudo isso é por vocês. Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus

Que sempre está ao meu lado, me guiando e dando forças para enfrentar os obstáculos;

À minha família

Pai Élcio, mãe Elaine, tios Marcelo, Cida, Edson, Duda, Lili, vó Nívia, que sempre torceram por mim, e ofereceram tudo que puderam para que eu realizasse meu sonho. Sempre me deram muito amor e força para lidar com cada obstáculo. Sem vocês, nada disso seria possível.

Obrigado por tudo e amo vocês;

Agradecimento especial

Ao meu irmão Rafael, por ser minha maior inspiração profissional e pessoal. Nunca mediu esforços para me ajudar a conquistar meus sonhos. Tenho a certeza de que cresceremos juntos;

Ao meu falecido tio

Márcio Luis Ramos, que sempre foi uma pessoa muito divertida e com um coração gigantesco. Muito obrigado por todas as risadas e momentos que passamos juntos. Tenho certeza de que está presenciando essa reta final da graduação e estará junto de nós, na formatura, momento que sempre idealizou em participar. Fique com Deus, Comandante;

À minha namorada

Maria Clara Ribeiro Braz, que me enche de orgulho pela sua determinação e carinho. Mesmo diante da distância que nos separa (por pouco tempo), sempre tivemos um relacionamento incrível, de muito amor e respeito. Só tenho a agradecer por tudo que faz por mim. Te amo;

Ao meu orientador

Eloi Dezan Junior, um exemplo de clínico e professor, que me ensinou muito sobre essa área incrível, a endodontia. Agradeço muito a oportunidade de realizar a iniciação científica com a sua orientação. Foram inúmeros aprendizados e experiências incríveis, que fizeram com que eu conquistasse muitas coisas. Muito obrigado;

Ao meu coorientador

Professor João Eduardo Gomes Filho, por todo apoio e por tanto conhecimento passado. Sua paciência e maestria na função de docente são aspectos que o fazem tão querido;

Ao Professor participante da banca

Professor Leonardo Perez Faverani, um exemplo de pessoa, que sempre está disposto a ajudar e ensinar. Um grande amigo que levarei para toda vida;

À pessoa que mais me ajudou e ensinou na faculdade

Ana Maria Veiga Vasques, uma mulher incrível, que me acolheu no segundo ano da graduação, e me mostrou o quanto a endodontia é incrível, além de me dar a oportunidade de começar a iniciação científica. Foram anos de muito trabalho e muito aprendizado. Sem você,

jamais teria chegado onde cheguei, jamais teria conseguido a bolsa mais almejada do país, obrigado por tudo, você é incrível;

À equipe de trabalho

Ana Claudia Rodrigues e Marina Cury, mulheres incríveis que me ajudaram muito nesses anos de trabalho, e me abriram muitas portas. Só tenho a agradecer pelo aprendizado que tive com vocês;

Aos meus amigos de turma

Ritipael, Cauê, Filipe, Gabriel Zopolatto, Arthur, Morcela, Samyra, Becher, Juliana, Laís, Vitor Hugo, Emanuel, que fizeram parte do meu crescimento e que alegravam sempre meus dias nas salas de aula e clínicas. Obrigado por tudo;

Aos amigos que a faculdade me deu

Rodrigo, Vitor, Faneco, César e Yasmine, que fizeram parte de toda minha trajetória na graduação, sempre me apoiando e estando ao meu lado. Obrigado por todos os momentos incríveis que tivemos;

Aos amigos que estão comigo desde sempre

Alexandre, João Vitor e Matheus Moreira, o quarteto, que sempre estive ao meu lado, deixando tudo mais leve. Momentos com vocês que nunca irei esquecer. Obrigado por tudo meus irmãos;

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Na pessoa dos professores: Prof. Titular Glauco Issamu Miyahara, digníssimo Diretor e Prof. Titular Alberto Botazzo Delbem, digníssimo Vice-Diretor;

Ao apoio da agência de fomento

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Número do Auxílio:
2021/10027-0.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho. Minha eterna gratidão.

“Faça o teu melhor, na condição que você tem,
enquanto você não tem condições melhores,
para fazer melhor ainda.”

Mario Sérgio Cortella

SCHIAVETTI, G. R. **Avaliação da biocompatibilidade e capacidade de biomineralização de um agregado de trióxido mineral experimental em tecido subcutâneo de ratos Wistar**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

O agregado de trióxido mineral (MTA) foi desenvolvido para selar a comunicação iatrogênica ou patológica, com uma natureza hidrofílica que permite seu uso mesmo na presença de umidade. Características como biocompatibilidade e biomineralização são fundamentais para essa classe de cimentos reparadores. O presente estudo avaliou a resposta inflamatória e a indução da mineralização do MTA Indusbelo (Indusbelo, Londrina PR), em comparação com os controles positivos MTA Angelus, MTA Repair HP e BIO-C Repair. Um total de 30 ratos machos receberam implantes de tubos de polietileno subcutâneo contendo os materiais teste e um grupo controle com tubo vazio (n=10 animais/período). Após 7, 30 e 60 dias, os animais foram eutanasiados e os tubos de polietileno removidos com os tecidos adjacentes. O infiltrado inflamatório e a espessura da cápsula fibrosa foram avaliados histologicamente pela coloração de hematoxilina e eosina através da atribuição de escores inflamatórios (escores 1, 2, 3 e 4) de acordo com a intensidade da inflamação, e cápsula fibrosa considerada fina quando $<150\ \mu\text{m}$ e espessa $>150\ \mu\text{m}$. A presença ou ausência de tecido mineralizado foi avaliada pela coloração de Von Kossa e sem coloração para análise sob Luz Polarizada. Os dados foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis e Dunn com nível de significância de $P<0,05$. O MTA Indusbelo apresentou uma reação inflamatória severa nos primeiros 7 dias e uma cápsula espessa, semelhante ao MTA Angelus, e negativo para Von Kossa e Luz Polarizada ($P>0,05$). Nos tempos de 30 e 60 dias, a reação inflamatória do MTA Indusbelo reduziu (score 1) e cápsula tornou-se fina, sem diferença estatística com os demais cimentos avaliados ($P>0,05$). A coloração de Van-Kossa foi positiva e a análise sob luz polarizada detectou a presença de estruturas birrefringentes para todos os grupos os avaliados, nos períodos de 30 e 60 dias, exceto para o controle. Ao final do experimento o MTA Indusbelo mostrou biocompatibilidade e induziu a biomineralização, podendo ser uma alternativa para a prática clínica.

Palavras-chave: Teste de materiais. Biocompatibilidade. Biomineralização. Agregado de trióxido mineral.

SCHIAVETTI, G. R. **Evaluation of the biocompatibility and biomineralization capacity of an experimental mineral trioxide aggregate in the subcutaneous tissue of Wistar rats.** 2023. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

Abstract

Mineral trioxide aggregate (MTA) was developed to seal iatrogenic or pathological communication, with a hydrophilic nature that allows its use even in the presence of moisture. Characteristics such as biocompatibility and biomineralization are fundamental for this class of repairing cements. The present study evaluated the inflammatory response and mineralization induction of MTA Indusbello (Indusbello, Londrina PR) in comparison with the positive controls MTA Angelus, MTA Repair HP and BIO-C Repair. A total of 30 male rats received implants of subcutaneous polyethylene tubes containing the test materials and a control group with an empty tube (n=10 animals/period). After 7, 30 and 60 days, the animals were euthanized and the polyethylene tubes removed with adjacent tissues. The inflammatory infiltrate and the thickness of the fibrous capsule were evaluated histologically by staining hematoxylin and eosin through the attribution of inflammatory scores (scores 1, 2, 3 and 4) according to the intensity of inflammation, and fibrous capsule considered thin when $<150\ \mu\text{m}$ and thick $>150\ \mu\text{m}$. The presence or absence of mineralized tissue was assessed by Von Kossa staining and without staining for analysis under Polarized Light. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis and Dunn test with a significance level of $P<0.05$. MTA Indusbello showed a severe inflammatory reaction in the first 7 days and a thick capsule, similar to MTA Angelus, and negative for Von Kossa and Polarized Light ($P>0.05$). At 30 and 60 days, the inflammatory reaction of MTA Indusbello reduced (score 1) and the capsule became thin, with no statistical difference with the other cements evaluated ($P>0.05$). Van-Kossa staining was positive and the analysis under polarized light detected the presence of birefringent structures for all evaluated groups, in the periods of 30 and 60 days, except for the control. At the end of the experiment, MTA Indusbello showed biocompatibility and induced biomineralization, and may be an alternative for clinical practice.

Keywords: Test of materials. Biocompatibility. Biomineralization. Mineral trioxide aggregate.

Lista de Figuras

Figura 1 - Confeção dos tubos de polietileno. **A:** corte dos tubos com 10mm de comprimento. **B:** tubo confeccionado seguindo as normas ISO. **C:** Tubo preenchido com auxílio de espiral lentulo com cimento a ser testado.

Figura 2 - Cirurgia para implantação dos tubos de polietileno no tecido subcutâneo do animal. **A:** anestesia intramuscular. **B:** tricotomia e antissepsia. **C:** incisão dos tecidos de 2 cm de comprimento. **D:** divulsão dos tecidos para a criação das lojas. **E:** implantação dos tubos no tecido. **F:** sutura dos tecidos.

Figura 3 - Remoção dos tubos de polietileno e do tecido circundante. **A:** Corte do tecido do dorso do animal para ter acesso às lojas. **B:** localização do tubo implantado. **C:** corte do tecido circundante ao tudo. **D:** fixação do espécime em solução formalina 10%

Figura 4 - Imagens representativas do infiltrado inflamatório no tecido subcutâneo dos grupos: Controle (A-K); MTA Indusbello (B-L); MTA Angelus (C-M); Bio-C (D-N); MTA Hp (E-O). Tempos experimentais: 7 dias (A-E, a-e); 30 dias (F-J, f-j); 60 dias (K-O, k-o). Aumento original: (A-O) 100x, (a-o) 400x.

Figura 5 - Imagens representativas da biomineralização nos grupos experimentais em Von Kossa (A-O) e Luz Polarizada (a-p) no aumento de 100x. Grupo Controle: Von Kossa (A,F,K) e Luz Polarizada (a,f,k); Grupo MTA Indusbello: Von Kossa (B,G,L) e Luz Polarizada (b,g,l); Grupo MTA Angelus: Von Kossa (C,H,M) e Luz Polarizada (c,h,m); Grupo Bio-C: Von Kossa (D,I,N) e Luz Polarizada (d,i,n); Grupo MTA Hp: Von Kossa (E,J,O) e Luz Polarizada (e,j,o). Tempos Experimentais: 7 dias (A-E, a-e); 30 dias (F-J, f-j); 60 dias (K-O, k-o).

Lista de tabelas

Tabela 1 - Escores do infiltrado inflamatório, mediana e espessura da cápsula fibrosa dos grupos experimentais.

Tabela 2 - Percentual de amostras em cada grupo categorizado de acordo com Von Kossa positivo para mineralização e presença de cristais birrefringentes sob luz polarizada.

Lista de Abreviaturas e siglas

MTA – Agregado de Trióxido Mineral

AAE – Associação Americana de Endodontistas

Sumário

INTRODUÇÃO	16
MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
Animais.....	18
Confecção dos tubos de polietileno.....	18
Drogas empregadas.....	19
Implante subcutâneo	19
Análise histológica.....	21
Análise estatística.....	22
RESULTADOS	23
Grupo Controle.....	23
Grupo MTA Indusbello	23
Grupo MTA Angelus	23
Grupo Bio-C Repair.....	24
Grupo MTA HP.....	24
Comparações entre grupos.....	24
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32
ANEXO	36

INTRODUÇÃO

A biocompatibilidade e a capacidade para induzir a formação de tecidos mineralizados (biomineralização) são requisitos importantes para cimentos reparadores que estarão em contato com os tecidos vivos (Bueno et al. 2019). O agregado de trióxido mineral (MTA) é um material hidráulico à base de silicato de cálcio derivado do cimento de Portland (Hinata et al. 2017). É amplamente utilizado em vários procedimentos endodônticos que inclui selamento de perfurações, patológicas ou iatrogênica de raízes (Torabinejad et al. 1993, Lee et al. 1993), apicificação, apicigênese, cirurgia parendodôntica e regeneração pulpar devido à sua capacidade de selamento, biocompatibilidade, formação de tecido duro e propriedades antibacterianas (Parirokh & Torabinejad 2010).

Essas propriedades biológicas são atribuídas ao seu pH alcalino e a capacidade de liberação de íons cálcio, mantendo um pH elevado (Sarkar et al. 2005, Camilleri 2008, Zarrabi et al. 2010) e formando hidróxido de cálcio como produto da reação de hidratação do MTA (Marciano et al. 2019). A natureza hidrofílica das partículas de MTA permite seu uso mesmo na presença de umidade, sendo os componentes principais o silicato tricálcico e dicálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico e agentes radiopacificantes (Parirokh & Torabinejad 2010).

O MTA Angelus (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil) é um material à base de silicato de cálcio composto por tungstato de cálcio, óxido de cálcio, aluminato tricálcico, silicato dicálcico e silicato tricálcico. O tungstato de cálcio substitui o óxido de bismuto, uma substância radiopacificadora do MTA tradicional que ocasionava alterações de cor na estrutura dentária.

É muito utilizado na odontologia, e tem sido pesquisado ao longo dos anos, mostrando excelentes propriedades biológicas (Gomes-Filho et al. 2010, Gomes-Filho et al. 2011, Tomas-Catala et al. 2017). Em um trabalho realizado por Bueno et al. (2019) em subcutâneo de ratos *Wistar*, o MTA Angelus induziu uma resposta inflamatória mais branda que outros MTAs após 7 dias e se manteve ao longo de 60 dias, além de induzir a deposição de tecido mineralizado. Quando avaliado como material para o capeamento pulpar direto ou pulpotomia em dentes permanentes

maduros com exposição à cárie, sua taxa de sucesso foi de 96% em acompanhamento de 3 anos (Awawdeh et al. 2018).

O MTA Repair HP (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR, Brasil) foi introduzido no mercado com a proposta de unir a ação biológica do MTA com um veículo à base de água e um agente plastificante, o que confere uma alta plasticidade na espatulação e consistência de trabalho, facilitando a utilização clínica.

Cintra et al. (2017) demonstraram que a biocompatibilidade e biomineralização do MTA HP são similares ao MTA Angelus, porém com alta plasticidade. Além disso, o MTA HP também demonstrou maior adesão em testes *push-out* (Silva et al. 2016) e elevado pH (Tomas-Catala et al. 2017).

A busca constante por um material de prática manipulação levou ao desenvolvimento de cimentos reparadores em seringas pronto para uso, dispensando a espatulação. O Bio-C Repair (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S / A, Londrina, PR, Brasil) é atualmente comercializado em seringa com as mesmas indicações clínicas do MTA. Em 2019, sua biocompatibilidade e biomineralização também foi avaliada, evidenciando todo seu potencial bioativo (Benetti et al. 2019). Recentemente, o Bio-C Repair mostrou resultados positivos em perfurações radiculares laterais com acompanhamento de 1 ano (Toubes et al. 2021).

Um novo agregado de trióxido mineral (MTA Indusbello, Indusbello, Londrina PR) está em desenvolvimento. Na forma de pó/líquido a serem espatulados, o MTA Indusbello tem o pó composto principalmente de silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio e carbonato de cálcio, além de utilizar um veículo de água associado a plastificante, a fim de facilitar a manipulação. Como um novo cimento, não há estudos publicados sobre suas propriedades biológicas ou capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a biocompatibilidade e a capacidade de induzir a mineralização do MTA Indusbello em reação *in vivo* no tecido subcutâneo de ratos. Os cimentos reparadores MTA Angelus, MTA Repair HP e Bio-C Repair foram utilizados para comparação como controle positivo. A hipótese nula testada neste trabalho foi de que o MTA Indusbello não seria biocompatível e não teria capacidade de induzir a biomineralização.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (FOA-UNESP nº 0320-2021), e foi conduzido de acordo com os princípios éticos da experimentação animal.

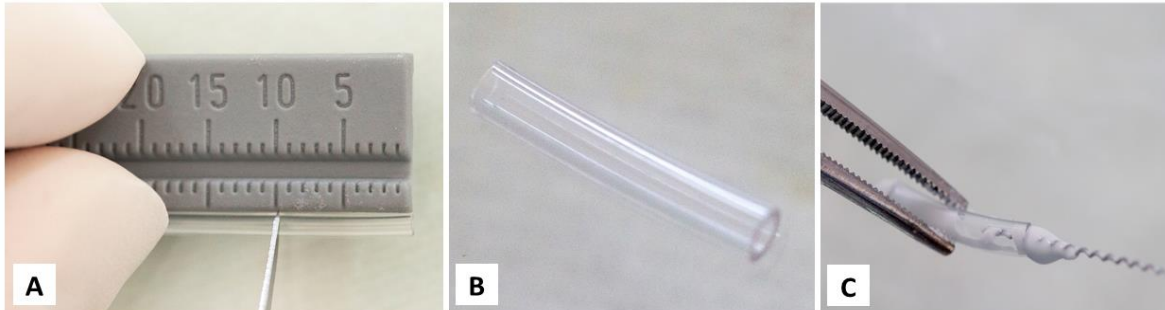
Animais

Foram utilizados 30 ratos machos da linhagem *Wistar*, pesando aproximadamente 250-280g, com 3 meses de idade, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 a 24°C), ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), em gaiolas coletivas, sendo cinco animais por gaiola, e alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água *ad libitum*. O tamanho da amostra animal foi baseado em estudos anteriores que utilizaram a mesma metodologia para avaliar a biocompatibilidade e biomineralização em tecido subcutâneo de ratos (Bueno et al. 2016; Cintra et al. 2017; Bueno et al. 2019).

Confecção dos tubos de polietileno

Um total de 150 tubos de polietileno foram preparados de acordo com estudos prévios (Bueno et al. 2016; Bueno et al. 2019) e preenchidos com os cimentos reparadores avaliados neste estudo sendo eles: MTA Indusbello, MTA Angelus, MTA Repair HP, e Bio-C Repair. Esses cimentos foram espatulados de acordo com as recomendações dos fabricantes. Dos 150 tubos confeccionados, 30 tubos foram deixados vazios e utilizados como controle (figura 1).

Figura 1 - Confeção dos tubos de polietileno. A: corte dos tubos com 10mm de comprimento. B: tubo confeccionado seguindo as normas ISO. C: Tubo preenchido com auxílio de espiral lentulo com cimento a ser testado.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

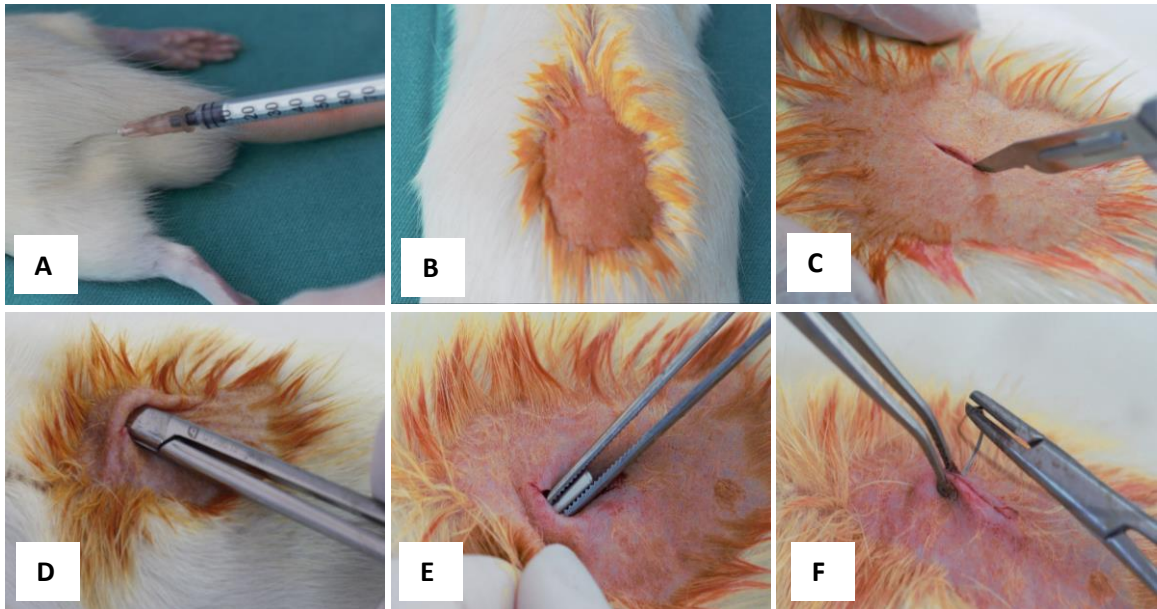
Drogas empregadas

Para anestesia dos animais foi utilizado, via intramuscular, um sedativo a base de xilazina 2% (Xilazin, Syntec, São Paulo, Brasil- 10mg/kg) e um anestésico a base de cloridrato de ketamina 10% (Cetamin, Syntec, São Paulo, Brasil, 25mg/kg).

Implante subcutâneo

O procedimento cirúrgico foi realizado seguindo estudos prévios (Bueno et al. 2016; Cintra et al. 2017; Bueno et al. 2019). Após a anestesia, foi realizada a tricotomia na região dorsal dos animais, e a antissepsia realizada com solução de iodo a 5% (figura 2.b) Na sequência uma incisão de 2 cm foi realizada no sentido cabeça-cauda com o auxílio de uma lâmina número 15 Bard-Parker (BD, Franklin Lakes, NJ) (figura 2.c). Foram criadas lojas no tecido subcutâneo para a implantação dos tubos (figura 2.d.e). Cada animal recebeu 5 tubos de polietileno (4 tubos contendo os cimentos e 1 tubo vazio como controle), em seguida a pele foi reposicionada e suturada com fio de nylon 4-0 (Johnson & Johnson Produtos Profissionais Ltda, São José dos Campos, Brazil) (figura 2.f).

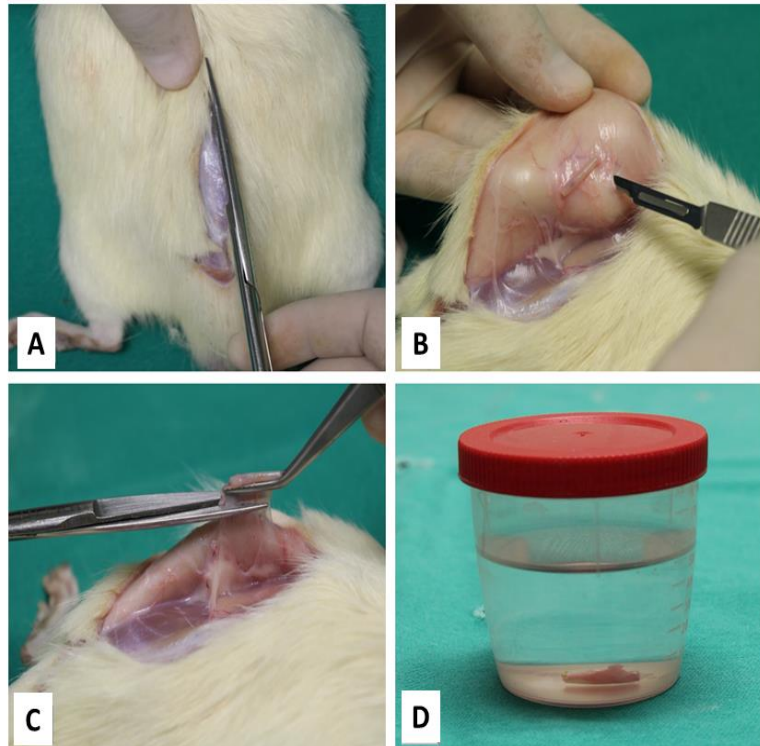
Figura 2 - Cirurgia para implantação dos tubos de polietileno no tecido subcutâneo do animal. A: anestesia intramuscular. B: tricotomia e antissepsia. C: incisão dos tecidos de 2 cm de comprimento. D: divulsão dos tecidos para a criação das lojas. E: implantação dos tubos no tecido. F: sutura dos tecidos.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

Passados os períodos de 7, 30 e 60 dias da implantação dos tubos de polietileno, os animais foram eutanasiados por overdose anestésica. Os tubos de polietileno, com os tecidos circundantes, foram removidos e fixados em solução de formalina à 10% (figura 3).

Figura 3 - Remoção dos tubos de polietileno e do tecido circundante. A: Corte do tecido do dorso do animal para ter acesso às lojas . B: localização do tubo implantado. C: corte do tecido circundante ao tubo. D: fixação do espécime em solução formalina 10%.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

Análise histológica

Os espécimes obtidos foram processados e incluídos em parafina. Foram realizados cortes seriados de 5 μm para coloração com hematoxilina-eosina e cortes de 10 μm para coloração de Von Kossa e sem coloração para luz polarizada. Todas as análises foram realizadas por um único operador calibrado de forma cega sob microscopia de luz (DM 4000 B; Leica, Wetzlar, Alemanha).

A análise histológica através da coloração de hematoxilina-eosina permitiu analisar a intensidade do infiltrado inflamatório no tecido em que estava em contato com a abertura do tubo, sendo atribuídos os seguintes escores: 1- poucas células inflamatórias ou em número desprezível; 2- menos de 25 células inflamatórias (reação leve); 3- entre 25 e 125 células inflamatórias (reação moderada); 4: 125 ou mais

células inflamatórias (reação severa). As cápsulas fibrosas foram consideradas finas quando menor que 150 μm e espessas quando maior que 150 μm (Benetti et al. 2019).

A análise através de Von Kossa e luz polarizada permitiu avaliar a presença de estruturas mineralizadas. A calcificação foi considerada positiva ou negativa para a coloração de Van Kossa, e presente ou ausente sob luz polarizada.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, com um nível de significância de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Grupo Controle

Um infiltrado inflamatório severo (escore mediano 4) foi observado no período experimental de 7 dias (figura 4.A-a) (tabela 1). A reação inflamatória, com a presença de células como linfócitos e macrófagos, estava presente na cápsula fibrosa espessa ($> 150 \mu\text{m}$). Após o período de 30 dias (figura 4.F-f), a cápsula fibrosa tornou-se fina, com uma reação inflamatória leve. No período de 60 dias a cápsula fibrosa se manteve fina com poucas células inflamatórias (escore mediano 1) (figura 4.K-k).

A mineralização foi negativa para Von Kossa e ausente para Luz Polarizada em todos os períodos experimentais, conforme observado na tabela 2 e figura 5 (A-K, a-k).

Grupo MTA Indusbello

Apenas no dia 7, uma infiltração celular inflamatória severa (escore mediano 4), estava presente na cápsula fibrosa espessa (figura 2.B-b; tabela 1). Após 30 e 60 dias, a intensidade da inflamação foi reduzida (escore mediano 2 e 1 respectivamente) e a cápsula fibrosa tornou-se fina, semelhante ao grupo controle (figura 4. G-g; L-l). A presença de granulações birrefringentes sob Luz Polarizada e Von Kossa positiva foi observada nos períodos de 30 e 60 dias (figura 5.G-g; L-l) (tabela 2).

Grupo MTA Angelus

O infiltrado inflamatório foi considerado severo após 7 dias (escore mediano 4) e reduzido para uma inflamação leve (escore mediano 2) após 30 dias (figura 4.H-h) e com 60 dias foi observado um número desprezível de células inflamatórias, conforme observado na figura 4.M-m e na tabela 1. A cápsula fibrosa próxima à abertura do tubo era espessa apenas no dia 7 (figura 4. C-c) e tornou-se fina após 30 dias e continuou até o final do período experimental. Granulações birrefringentes para Luz Polarizada e coloração positiva para Von Kossa foram observadas nos períodos de 30 e 60 dias (figura 5. H-h; M-m) (tabela 2).

Grupo Bio-C Repair

A reação inflamatória no período de 7 dias foi considerada severa (escore mediano 4) devido a quantidade de células inflamatórias presente na abertura do tubo e conseqüentemente uma capsula fibrosa espessa (figura 4.D-d). Nos períodos seguintes de 30 e 60 dias houve uma redução do número de células inflamatórias (escore mediano 2 e 1) assim como a capsula fibrosa tornou-se fina (figura 4. F-f; N-n). Foi possível observar a presença de estruturas birrefringentes sob Luz Polarizada, e estruturas escurecidas características da biomineralização na técnica de Van-Kossa apenas nos períodos de 30 e 60 dias (figura 5. I-i; N-n) (tabela 2).

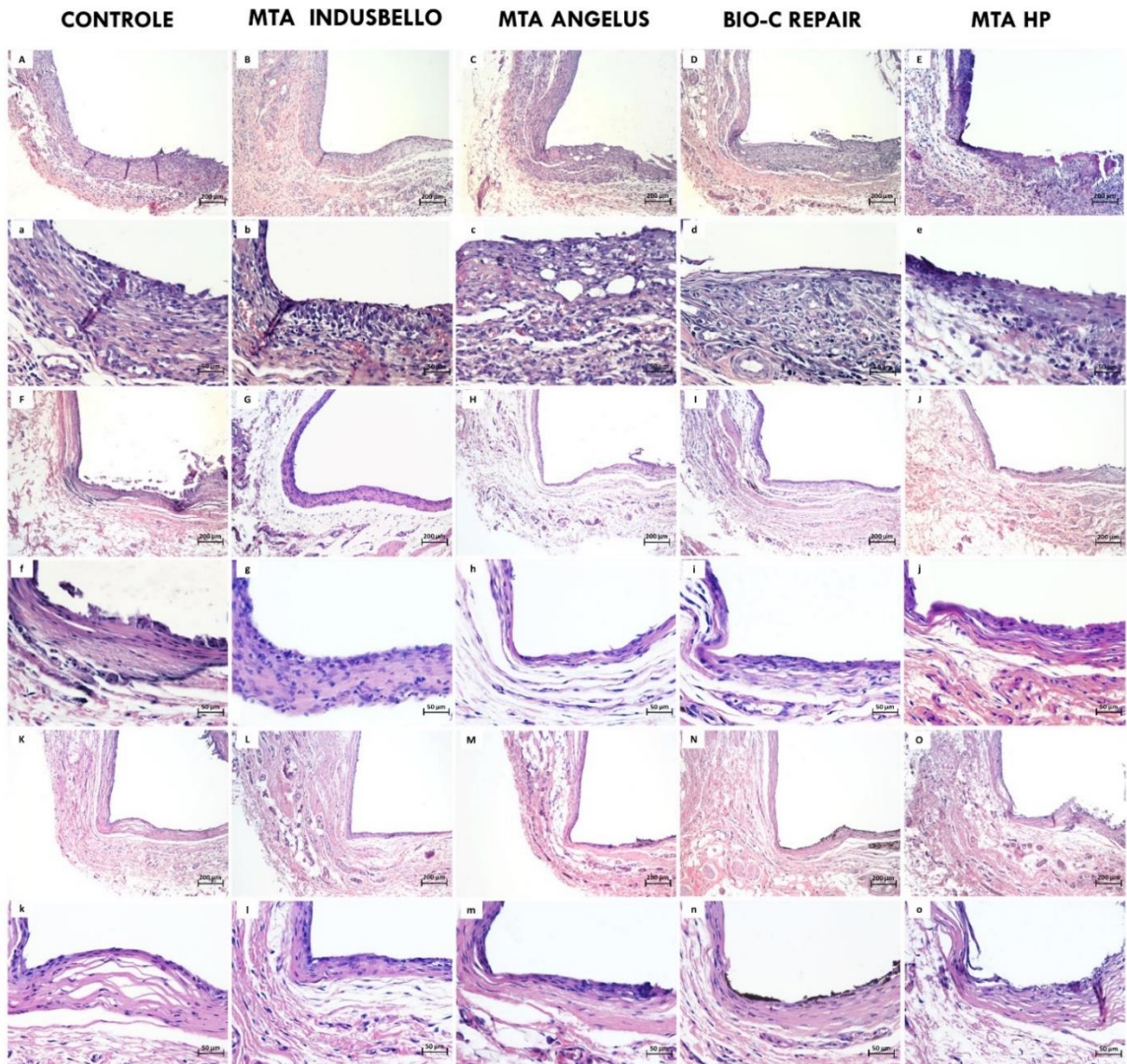
Grupo MTA HP

Embora um infiltrado inflamatório severo (escore mediano 4) e uma cápsula fibrosa espessa tenha sido observado após 7 dias (figura 4.E-e), essa reação inflamatória foi diminuindo nos períodos de 30 e 60 dias, apresentando ao final do experimento pouca quantidade de células inflamatórias (escore mediano 1) e cápsula fibrosa fina (figura 4. O-o) (tabela 1). A capacidade de biomineralização foi observada com 30 e 60 dias, onde estavam presentes as estruturas escurecidas pela técnica de Von Kossa e a presença de estruturas birrefringentes sob Luz Polarizada (figura 5. J-j; O-o) (tabela 2).

Comparações entre grupos

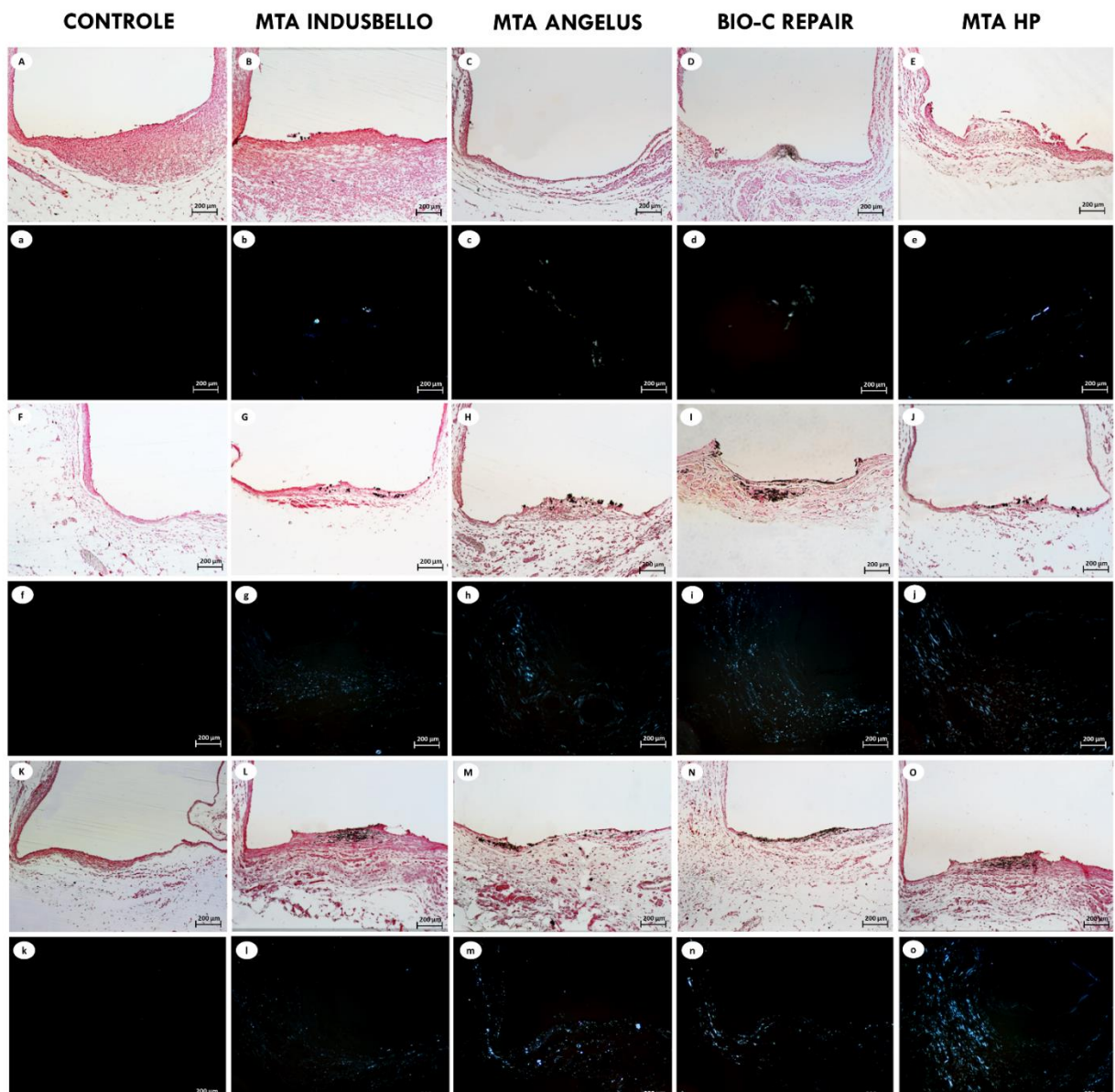
Os dados foram comparados para cada período de tempo (tabelas 1 e 2). Após 7 dias, o grupo controle apresentou escore mediano 4, com cápsula fibrosa espessa. O MTA Indusbello mostrou inflamação severa (escore mediano 4) após 7 dias, com cápsula fibrosa espessa. Após 30 dias, foi possível observar uma redução do infiltrado inflamatório nos grupos experimentais avaliados, com redução da espessura da capsula fibrosa, não apresentando diferenças estatísticas significativas entre os grupos ($P < 0,05$). No período de 60 dias os grupos avaliados apresentavam a maioria dos espécimes no score 1, pois apresentavam poucas células inflamatórias e com isso uma cápsula fibrosa fina ($P < 0,05$). Em relação à biomineralização, com exceção do grupo controle, todos os cimentos induziram a formação de tecido mineralizado a partir do 30º dia, confirmado pela presença de estruturas escurecidas pela técnica de Von Kossa e estruturas birrefringentes observadas sob luz polarizada.

Figura 4 - Imagens representativas do infiltrado inflamatório no tecido subcutâneo dos grupos: Controle (A-K); MTA Indusbello (B-L); MTA Angelus (C-M); Bio-C (D-N); MTA Hp (E-O). Tempos experimentais: 7 dias (A-E, a-e); 30 dias (F-J, f-j); 60 dias (K-O, k-o). Aumento original: (A-O) 100x, (a-o) 400x.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

Figura 5 - Imagens representativas da biomineralização nos grupos experimentais em Von Kossa (A-O) e Luz Polarizada (a-p) no aumento de 100x. Grupo Controle: Von Kossa (A,F,K) e Luz Polarizada (a,f,k); Grupo MTA Indusbello: Von Kossa (B,G,L) e Luz Polarizada (b,g,l); Grupo MTA Angelus: Von Kossa (C,H,M) e Luz Polarizada (c,h,m); Grupo Bio-C: Von Kossa (D,I,N) e Luz Polarizada (d,i,n); Grupo MTA Hp: Von Kossa (E,J,O) e Luz Polarizada (e,j,o). Tempos Experimentais: 7 dias (A-E, a-e); 30 dias (F-J, f-j); 60 dias (K-O, k-o).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

Tabela 1 - Escores do infiltrado inflamatório, mediana e espessura da cápsula fibrosa dos grupos experimentais.

GRUPOS	ESCORES				MEDIANA	CÁPSULA FIBROSA
	1	2	3	4		
7 dias						
Controle	0	0	1	9	4 ^a	Espessa
MTA Indusbello	0	0	4	6	4 ^a	Espessa
MTA ANG	0	1	4	5	4 ^a	Espessa
BIO-C	0	0	2	8	4 ^a	Espessa
MTA-HP	0	0	3	7	4 ^a	Espessa
30 dias						
Controle	3	6	1	0	2 ^a	Fina
MTA Indusbello	2	6	2	0	2 ^a	Fina
MTA ANG	2	6	2	0	2 ^a	Fina
BIO-C	3	5	2	0	2 ^a	Fina
MTA-HP	0	5	4	1	2 ^a	Fina
60 dias						
Controle	6	3	1	0	1 ^a	Fina
MTA Indusbello	6	4	0	0	1 ^a	Fina
MTA ANG	7	3	0	0	1 ^a	Fina
BIO-C	6	4	0	0	1 ^a	Fina
MTA-HP	6	2	2	0	1 ^a	Fina

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

Tabela 2 - Percentual de amostras em cada grupo categorizado de acordo com Von Kossa positivo para mineralização e presença de cristais birrefringentes sob luz polarizada.

GRUPOS	VON KOSSA		LUZ POLARIZADA	
	Positivo	Negativo	Presente	Ausente
7 dias				
Controle	0	10	0	10
MTA Indusbello	0	10	0	10
MTA ANG	0	10	0	10
BIO-C	0	10	0	10
MTA-HP	0	10	0	10
30 dias				
Controle	0	10	0	10
MTA Indusbello	10	0	10	0
MTA ANG	10	0	10	0
BIO-C	10	0	10	0
MTA-HP	10	0	10	0
60 dias				
Controle	0	10	0	10
MTA Indusbello	10	0	10	0
MTA ANG	10	0	10	0
BIO-C	10	0	10	0
MTA-HP	10	0	10	0

Fonte: Elaborado pelo Autor (2023)

DISCUSSÃO

Esta pesquisa mostrou que o MTA Indusbelo foi biocompatível e induziu biomineralização, assim como o MTA Angelus, MTA HP Repair e Bio-C Repair, rejeitando-se a hipótese nula testada neste trabalho. De acordo com a Associação Americana de Endodontistas, um novo material deve ser biologicamente e clinicamente estudado antes do seu uso (AAE, 2013), uma vez que estes materiais estarão em íntimo contato com os tecidos periapicais, e por isso devem apresentar propriedades como biocompatibilidade com os tecidos e capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado (Chhabra et. al 2011).

O modelo animal para implantação subcutânea é muito utilizado para a realização de testes de pesquisa pré-clínica para biocompatibilidade (ISO 1997, ISO 2007, Benetti et. al 2019). No presente estudo, o grupo MTA Indusbelo apresentou uma resposta inflamatória inicial severa com maior número de células inflamatórias e uma cápsula fibrosa espessa, assim como o MTA Angelus, MTA HP e Bio-C Reapir, corroborando com achados anteriores (Cintra et. al 2017; Benetti et. al 2019; Bueno et. al 2019).

A inflamação foi observada também no grupo controle, onde os tubos de polietileno estavam vazios. Os tubos de polietileno são indicados pela ISO (Organização Internacional de Normalização) por serem inertes e não induzirem inflamação (Valentim et. al 2017). Entretanto, o trauma cirúrgico decorrente da implantação dos tubos no tecido subcutâneo do animal gera uma resposta inflamatória inicial (Benetti et. al 2019).

Em um estudo realizado avaliando a biocompatibilidade do MTA Angelus em tecido subcutâneo de ratos, com o mesmo tempo experimental de 7 dias, mostrou uma maior quantidade de células inflamatórias próxima a abertura do tubo e uma cápsula fibrosa espessa (Cintra et. al, 2017), assim como observamos no grupo MTA Indusbelo. Portanto, é normal observar uma reação inflamatória inicial quando usamos cimento do tipo MTA devido ao dano causado nos tecidos por conta de sua alcalinidade.

Para que um cimento seja considerado biocompatível, sua reação inflamatória inicial deve diminuir ao longo do tempo para um nível não significativo (Gomes-Filho et. al 2012; Simsek et. Al 2015). E esse comportamento foi observado no cimento MTA Indusbelo. Nos tempos experimentais de 30 e 60 dias houve uma

redução do número de células inflamatórias, passando para os scores 2 e 1 respectivamente. Com a diminuição da resposta inflamatória, a cápsula fibrosa tornou-se fina.

Resultado semelhante foi observado para os grupos MTA Angelus, MTA HP E Bio-C Repair, que ao final do período experimental apresentaram diminuição das células inflamatórias (score 1) e cápsula fibrosa fina, confirmando com os achados na literatura (Benetti et. al 2019; Benetti et. al 2021).

A biocompatibilidade e a bioatividade do MTA se iniciam com sua reação de fixação, uma vez que é liberado hidróxido de cálcio o que torna o ambiente alcalino e induz a formação de tecido mineralizado (Camilleri 2008). Os íons Ca reage com o dióxido de carbono nos tecidos formando os cristais de calcita, que são birrefringentes à luz polarizada servindo como núcleo para a calcificação (Gomes-Filho et. al 2010). Essas calcificações podem ser observadas pela coloração de Von-Kossa e sob Luz Polarizada.

No tecido subcutâneo de ratos não é observada a formação de tecido duro, mas a formação de cristais de calcita e a mineralização dos núcleos indicam a capacidade de bioatividade dos materiais (Gomes-Filho et al 2010; Cintra et. al 2017). No presente estudo, a capacidade de mineralização do MTA Indusbelo foi detectada pela presença de cristais de calcita na análise sob luz polarizada, e calcificação dos núcleos pela coloração de Van Kossa.

Um estudo anterior (Benetti et. al 2019) mostrou que o MTA angelus, MTA-HP e Bio-C Repair também exibiram a presença de cristais de calcita e calcificação dos núcleos, o que corrobora com os achados desta pesquisa, onde foi possível observar a presença dos cristais birrefringentes sob luz polarizada e a calcificação dos núcleos caracterizado pela cor escurecida na análise de Van Kossa.

As indicações para o uso do MTA Indusbelo incluem tratamento de perfurações radiculares e de furca, selamento de reabsorção radicular, obturações radiculares, capeamento pulpar, pulpotomia, apicificação e tampões apicais.

Como este é o primeiro estudo deste novo material, foi analisado apenas a biocompatibilidade e a biomineralização, devendo ser analisadas outras propriedades em futuras pesquisas como a citotoxicidade e a propriedades físico-químicas.

CONCLUSÃO

Durante este estudo animal, o MTA Indusbello apresentou biocompatibilidade e capacidade de biomineralização em tecido subcutâneo de ratos, podendo ser uma alternativa para a prática clínica.

REFERÊNCIAS

American Association of Endodontists (2013) New materials/ technologies position paper. American Association of Endodontists, Chicago.

Awawdeh L, Al-Qudah A, Hamouri H, Chakra RJ. Outcomes of Vital Pulp Therapy Using Mineral Trioxide Aggregate or Biodentine: A Prospective Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2018 Nov;44(11):1603-9.

Benetti F, Gomes-Filho JE, de Azevedo-Queiroz IO, Carminatti M, Conti LC, Dos Reis-Prado AH, de Oliveira SHP, Ervolino E, Dezan-Júnior E, Cintra LTA. Biological assessment of a new ready-to-use hydraulic sealer. *Restor Dent Endod*. 2021 Mar 24;46(2):e21.

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 Jul 22;30(4):325-332.

Bueno CRE, Valentim D, Marques VA, Gomes-Filho JE, Cintra LT, Jacinto RC, Dezan-Junior E. Biocompatibility and biomineralization assessment of bioceramic-, epoxy-, and calcium hydroxide-based sealers. *Braz Oral Res*. 2016. Jun 14;30(1):S1806-83242016000100267.

Bueno CRE, Vasques AMV, Cury MTS, Sivieri-Araújo G, Jacinto RC, Gomes-Filho JE, Cintra LTA, Dezan-Júnior E. Biocompatibility and biomineralization assessment of mineral trioxide aggregate flow. *Clin Oral Investig*. 2019 Jan;23(1):169-177.

Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent*. 2008 Oct;11(4):141-3.

Chhabra A, Teja TS, Jindal V, Singla MG, Warring K. Fate of extruded sealer: a matter of concern. *J Oral Health Comm Dent* 2011 5(3):168–172.

Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz ÍO, de Araújo Lopes JM, Penha de Oliveira SH, Sivieri Araújo G, Gomes-Filho JE. Cytotoxicity, Biocompatibility, and Biomineralization of the New High-plasticity MTA Material. *J Endod.* 2017 May;43(5):774-778.

Gomes-Filho JE, de Moraes Costa MM, Cintra LT, Duarte PC, Takamiya AS, Lodi CS, Bernabé PF. Evaluation of rat alveolar bone response to Angelus MTA or experimental light-cured mineral trioxide aggregate using fluorochromes. *J Endod.* 2011 Feb;37(2):250-4.

Gomes-Filho JE, de Moraes Costa MT, Cintra LT, Lodi CS, Duarte PC, Okamoto R, Bernabé PF, Nery MJ, Cannon M. Evaluation of alveolar socket response to Angelus MTA and experimental light-cure MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Nov;110(5):e93-7.

Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Nery MJ, Otobon Filho JA et al (2012) Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX. *Dent Traumatol* 28(6):452–456

Hinata G, Yoshida K, Han L, Edanami N, Yoshida N, Okiji T. Bioactivity and biomineralization ability of calcium silicate-based pulp-capping materials after subcutaneous implantation. *Int Endod J.* 2017 Dec;50 Suppl 2:e40-e51.

International Organization for Standardization. Dentistry preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Test methods for dental materials: ISO/TR 7405-1997(E). Switzerland: ISO, 1997,

ISO 10993-6. Biological evaluation of medical devices. Part 6: Tests for local effects after implantation International Standard Norm, Porto, Portugal 2007.

Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod.* 1993 Nov;19(11):541-4.

Marciano MA, Camilleri J, Lucateli RL, Costa RM, Matsumoto MA, Duarte MAH. Physical, chemical, and biological properties of white MTA with additions of AIF₃. *Clin Oral Investig*. 2019 Jan;23(1):33-41. Epub 2018 Apr 13.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):16-27.

Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2005 Feb;31(2):97-100.

Silva EJ, Carvalho NK, Zanon M, Senna PM, DE-Deus G, Zuolo ML, Zaia AA. Push-out bond strength of MTA HP, a new high-plasticity calcium silicate-based cement. *Braz Oral Res*. 2016 Jun 14;30(1):S1806-83242016000100269.

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 Jan-Mar;9(1):31-35.

Tomás-Catalá CJ, Collado-González M, García-Bernal D, Oñate-Sánchez RE, Forner L, Llena C, Lozano A, Castelo-Baz P, Moraleda JM, Rodríguez-Lozano FJ. 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 Dec;50 Suppl 2:e63-e72.

Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*. 2010;36:190–202.)

Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod*. 1993 Dec;19(12):591-5.

Toubes KS, Tonelli SQ, Girelli CFM, Azevedo CGS, Thompson ACT, Nunes E, Silveira FF. Bio-C Repair - A New Bioceramic Material for Root Perforation Management: Two Case Reports. *Braz Dent J.* 2021 Jan-Feb;32(1):104-110.

Valentim D, Bueno CRE, Marques VAS, Vasques AMV, Cury MTS, Cintra LTA, Dezan E Junior. Calcium hydroxide associated with a new vehicle: *Psidium cattleianum* leaf extracts. Tissue response evaluation. *Braz Oral Res.* 2017 Jul 3;31:e43.

Zarrabi MH, Javidi M, Jafarian AH, Joushan B. Histologic assessment of human pulp response to capping with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. *J Endod.* 2010 Nov;36(11):1778-81.

ANEXO A – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da biocompatibilidade e capacidade de biomineralização de um agregado de trióxido mineral experimental**", Processo FOA nº 0320-2021, sob responsabilidade de Eloi Dezan Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Julho de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Agosto de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Setembro de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Evaluation of the biocompatibility and biomineralization capacity of an experimental mineral trioxide aggregate**", Protocol FOA nº 0320-2021, under the supervision of Eloi Dezan Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 30, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 31, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 30, 2022.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br