

RAFAELA CARDOSO DE SÁ

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO TECIDUAL EM SUBCUTÂNEO DE
CAMUNDONGOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES PRÓ- E
ANTI-INFLAMATÓRIOS APÓS IMPLANTE DE BIODENTINE™ E MTA**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Manoel Damião De Sousa Neto

Co-orientadora: Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

de Sá, Rafaela Cardoso

Avaliação da reação tecidual em subcutâneo de camundongos e expressão gênica de marcadores pró- e anti-inflamatórios após implante de Biodentine™ e MTA. Ribeirão Preto, 2020.

88p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Orientador: Sousa-Neto, Manoel Damião

1.Pulpotomia 2.MTA 3.Biodentine 4.Subcutâneo 5. Interleucina

FOLHA DE APROVAÇÃO

De Sá, RC. Avaliação da reação tecidual em subcutâneo de camundongos e expressão gênica de marcadores pró- e anti-inflamatórios após implante de Biodentine™ e MTA.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Aprovado em: ____/____/ 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.(a) Dr.(a) _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Manoel Damião De Sousa Neto – Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

RAFAELA CARDOSO DE SÁ

Nascimento	21 de janeiro de 1983 – Manaus-AM
Filiação	Anelore Cardoso de Sá José Maria Ramos de Sá.
2005-2010	<i>Curso de Graduação</i> Centro Universitário Nilton Lins – Manaus-Am TCC: Manifestações bucais em crianças portadoras de leucemia linfoide aguda submetidas a tratamento quimioterápico na fundação de hematologia e hemoterapia do Amazonas. Orientadora: Simone Assayag Hanan.
2010-2015	<i>Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível Mestrado</i> Dissertação: Manifestações locais e sistêmicas da irrupção dentária em bebês e fatores relacionados – Revisão sistemática. Orientadora: Gabriela Cunha Bonini. São Leopoldo Mandic – Slmandic
2016-Atual	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível Doutorado Tese: Avaliação da reação tecidual em subcutâneo de camundongos e expressão gênica de marcadores pró- e anti-inflamatórios após implante de Biodentine™ e MTA. Orientador: Prof. Dr. Manoel Damião De Sousa Neto Co-orientadora: Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato. FORP/USP
2018-2019	<i>Curso de Pós-Graduação em medicina dentária, nível Mestrado</i> Universidade Católica Portuguesa – UCP Viseu - Portugal



Trabalho desenvolvido nos Laboratórios de Histologia, Biologia Molecular e Cultura de Células do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, sob a orientação do Prof. Dr. Manoel Damiano De Sousa Neto e Co-orientação da Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato. Apoio financeiro da FAPESP (Processos FAPESP nº 2014/25692-5 – Auxílio Regular).

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, José Maria Ramos de Sá (in memorian) e Anelore Cardoso de Sá. Por todo amor, carinho, dedicação a mim proporcionado, e por serem meus exemplos, amo vocês.

Ao meu esposo Jorge Magno Pires, pelo amor, incentivo, confiança, e demonstrar todo orgulho que sente de mim.

Meu querido irmão Rafael Cardoso de Sá, por toda força, amor e apoio.

José Otávio, meu amorzinho, como diz seu pai, você veio para nos ensinar a ser pessoas melhores, me esforço para enxergar seu “mundo azul” com seus olhos, para que possamos superar todas as dificuldades.

Tia Jô, te amo.

Aos meus amigos que sempre torceram por mim.

Amigas Kátia Felizardo e Sidnéa Feitoza, por estarem sempre dispostas e apoiando na conclusão deste trabalho.

A Carolina Maschietto Pucinelli, Lana kei Yamamoto e Lisa Danielly Curcino Araújo não sei o que seria de mim sem vocês, obrigada por tudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manoel Damião De Sousa Neto, por toda a ajuda no decorrer dessa jornada, pela contribuição na elaboração deste trabalho, pelas experiências adquiridas.

À minha co-orientadora, Profa. Raquel Assed Bezerra Segato, por toda dedicação e confiança depositada em mim, por sua generosidade em compartilhar conhecimento e por não permitir que eu desistisse. Minha eterna gratidão.

À, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, por sua excelência na Odontopediatria, exemplo como pessoa e professora, uma honra ter sido sua aluna, sempre disposta a nos ajudar, foi um privilégio conhecê-la. Obrigada pelos incentivos que recebemos e por nos proporcionar o a realizar o doutorado através do DINTER.

Ao Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, por me fazer amar ainda mais a docência e a Odontopediatria, agradeço pelos ensinamentos, pelas aulas de excelência realizadas com tanta dedicação. Receba minha eterna gratidão!

À Profa. Dra. Érika Calvano Küchler, pela competência profissional e por contribuir conosco, durante essa jornada, pela ajuda e disponibilidade. Obrigada por tudo!

À Faculdade de Odontologia IAES, na pessoa da atual Diretora, Dra. Zobelía Maria de Souza Lopes, ao Coordenador do curso Prof. Dr. Alberto Tadeu do Nascimento Borges, por me permitir o exercício da docência, pela confiança no meu trabalho, pelo incentivo, apoio e oportunidade proporcionada para a realização deste doutorado, os senhores são pessoas de bom coração, meu muito obrigada.

Dra. Marília Pacífico Lucisano, por ser uma pessoa meiga e gentil, que não mediu esforços para me ajudar. Agradeço imensamente você, por tudo!

Nilza Letícia Magalhães, pelas alegrias que transmites com seu sorriso contagiante, pela companhia agradável e pessoa admirável que és, simpática e dedicada em seu trabalho.

À Universidade de São Paulo, nas pessoas do atual Reitor **Prof. Dr. Vahan Agopyan**, e do Vice-Reitor **Prof. Dr. Antônio Carlos Hernandes**.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Diretora, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, e da Vice-Coordenadora, **Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva**.

Aos professores do Departamento de Clínica Infantil da FORP-USP, **Prof. Dr. Alberto Consolaro**, **Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas**, **Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Profa. Dra. Andiará De Rossi Daldegan**, **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, **Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano**, **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, **Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani**, **Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto**, **Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva**, **Profa. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto**, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra da Silva**.

Aos **Funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP-USP)**, Filomena Leli Placciti, Matheus Morelli Zanela, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Nilza Letícia Magalhães, Dra. Carolina Tores Montavani, Carmo Eurípedes Terra Barreto (*in Memoriam*), Marco Antônio dos Santos, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Fátima Aparecida Rizoli e Rosemary Alves, por todo apoio oferecido no dia-a-dia e por sempre nos receberem com tanto carinho e enorme paciência.

Aos **Funcionários da FORP/USP**, José Aparecido Neves do Nascimento, Vera do Nascimento Scandelai, Karina Dadalt Quaglio, Gleedson Antunes da Silva, Kleber Augusto Loureiro, Adriana de Mattos Gonçalves da Silva e Hermano Teixeira Machado, por todo o suporte e carinho dedicado, no decorrer de todos estes anos. Muito obrigada.

Aos **Alunos do Mestrado e Doutorado** do Programa de Pós-graduação em Odontopediatria FORP/USP, pelo apoio e incentivo durante essa caminhada.

Aos meus caros **colegas e alunos** do Dinter/Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, por estarmos juntos durante essa jornada, pelas alegrias no decorrer das aulas, por aprendermos o que de melhor nos foi proporcionado, pelo companheirismo, apoio e pelas palavras de incentivo, de que juntos conseguiríamos chegar em nosso objetivo! Obrigada a todos!

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio à pesquisa concedido (Processo FAPESP nº 2014/25692-5).

RESUMO

De Sá, RC. **Avaliação da reação tecidual em subcutâneo de camundongos e expressão gênica de marcadores pró- e anti-inflamatórios após implante de Biodentine™ e MTA.** Ribeirão Preto, 2020. 91p. Tese [Doutorado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Pulpotomia consiste na remoção da porção coronal de uma polpa vital como forma de preservar a vitalidade da porção radicular restante. Após esse procedimento, diversos materiais têm sido utilizados para o recobrimento da polpa radicular. Desses materiais, destacam-se o agregado trióxido mineral (MTA) e a Biodentine™. Estudos têm avaliado e comparado a resposta inflamatória de ambos os materiais, a fim de identificarem um material capaz de promover um adequado processo de reparo, sem ação citotóxica ou irritante ao organismo. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual, resposta imune e participação de citocinas pró- e anti-inflamatórias induzidas pelos materiais Biodentine™ e MTA em tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos isogênicos. Para isso, foram utilizados 120 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c divididos em 4 grupos, sendo 2 experimentais (Biodentine™ e MTA nos períodos de 7, 21 e 63 dias) e 2 controles (Óxido de Zinco e Eugenol e *sham*, nos mesmos períodos). Decorridos os períodos experimentais, os blocos de tecido conjuntivo contendo o corpo de prova com o material foram removidos. A parte superior do tecido foi removido, fixado em formol e enviado para o processamento histotécnico de rotina para posterior análise microscópica com H&E. Já a parte inferior do bloco foi mergulhada em solução de RNAlater® para posterior análise da expressão gênica pela técnica de qRT-PCR. Foi realizada a descrição da reação tecidual em contato com cada material, análise semi-quantitativa do fibrosamento e do infiltrado inflamatório e análise quantitativa da espessura do tecido reacional granulomatoso em contato com o material testado ou o tecido conjuntivo do grupo *sham*. Foi realizado, também, o qRT-PCR para análise de expressão gênica de *Il10*, *Infg*, *Il6*, *Tnf* e receptor *Il1r1*. Os resultados foram comparados por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do Pós-teste de Dunn ou pela análise de variância (ANOVA) de duas vias

seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($\alpha=5$). Inicialmente os materiais Biodentine™, MTA induziram um discreto fibrosamento do tecido conjuntivo, mas aos 21 dias ele tornou-se maior ao redor do MTA. Finalmente, no período final, todos os grupos apresentaram um fibrosamento discreto. Em relação ao infiltrado inflamatório, aos 7 dias, Biodentine™ e MTA induziram o recrutamento de células inflamatórias de intensidade moderada a intensa, e nos tempos seguintes a maioria dos espécimes mantiveram-se com infiltrado discreto. A espessura da cápsula fibrosa apresentou-se aumentada ao redor dos espécimes de Biodentine™ aos 7 dias, mas aos 21 e 63 dias, o tecido ao redor dos materiais não apresentou aumento de espessura. Ainda, observou-se que a Biodentine™ e o MTA foram capazes de inibir, ao longo dos períodos experimentais, a expressão dos marcadores pró-inflamatórios *Tnf e Infg*. Tanto a Biodentine™ quanto o MTA estimularam a expressão de *Il6* nos períodos iniciais, mas aos 63 dias, o MTA inibiu a expressão dessa citocina, o que não aconteceu com a Biodentine. Para a *Il1r1*, a Biodentine™ e MTA não apresentaram efeito aos 7 dias. Aos 21 dias nenhum material modulou a expressão gênica, diferentemente do período de 63 dias quando Biodentine™, MTA e ZOE induziram *Il1r1*. Observou-se ainda que a *Il-10* teve sua expressão diminuída após estímulo com MTA e ZOE no período de 7 dias. Já aos 21 dias, a Biodentine foi capaz de estimular a expressão de *Il-10* e no período final de avaliação apenas o ZOE foi capaz de modular a inibição dessa interleucina. Após análise dos dados, conclui-se que de maneira geral os materiais avaliados, MTA e Biodentine™, mediaram a inflamação, com aumento do fibrosamento e produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias.

Palavras-chave: Pulpotomia; MTA; Biodentine™; Subcutâneo; Interleucina.

ABSTRACT

De Sá, RC. **Tissue reaction evaluation in mice subcutaneous tissue and gene expression of pro- and anti-inflammatory markers after Biodentine™ and MTA implantation.** Ribeirão Preto, 2019. 91p. Thesis [Doctorate]. Ribeirão Preto Dental school, São Paulo University.

Pulpotomy consists of the vital pulp from coronal portion removing so as to preserve the vitality of the remaining root portion. After this procedure, several materials have been used to cover the root pulp. Of these materials, the mineral trioxide aggregate (MTA) and Biodentine™ stand out. Studies have evaluated and compared the inflammatory response induced by both materials, in order to identify a material capable of promoting an adequate repair process, without cytotoxic or irritating action to the body. Thus, the aim of this study was to evaluate the tissue response, immune response and participation of pro- and anti-inflammatory cytokines induced by Biodentine™ and MTA materials in subcutaneous connective tissue of isogenic mice. For this purpose, 120 isogenic mice of the BALB/c were divided into 4 groups, being 2 experimental (Biodentine™ and MTA in the experimental periods of 7, 21 and 63 days) and 2 controls (Zinc Oxide and Eugenol and sham, using the same periods). After the experimental periods, the blocks containing connective tissue and the used material were removed. The upper part of the tissue was removed, fixed in formaldehyde and sent for routine histotechnical processing for further microscopic analysis with H&E. The lower part of the block was immersed in RNAlater® solution for further analysis of gene expression using the qRT-PCR technique. Were carried out the description of the tissue reaction in contact with each material; semi-quantitative analysis of the collagen fiber formation and inflammatory infiltrate; and quantitative analysis of the connective tissue in contact with the tested material or the sham group. QRT-PCR was also performed for analysis of gene expression of *Il10*, *Infg*, *Il6*, *Tnf* and *Il1r1* receptor. The results were compared using the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn post-test or by the two-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test ($\alpha=5\%$).

Initially, Biodentine™ and MTA induced a slight collagen fiber formation, but at 21 days it became larger around the MTA. Finally, in the final period, all groups had a slight collagen fiber formation. Regarding the inflammatory infiltrate, at 7 days, Biodentine™ and MTA induced the inflammatory cells recruitment from moderate to intense, and in the following times most specimens remained with discrete inflammatory infiltration. The fibrous capsule thickness was increased around the Biodentine™ specimens at 7 days, but at 21 and 63 days, the tissue around the materials did not increase. Furthermore, it was observed that Biodentine™ and MTA were able to inhibit, over the experimental periods, the pro-

inflammatory markers, *Tnf* and *Infg*, expression. Both, Biodentine™ and MTA, stimulated *Il6* expression in the initial periods, but at 63 days, MTA inhibited the expression of this cytokine, which did not happen with Biodentine. For *Il1r1*, Biodentine™ and MTA had no effect at 7 days. At 21 days, no material modulated gene expression, unlike the 63-day period when Biodentine™, MTA and ZOE induced *Il1r1*. It was also observed that *IL-10* had its expression decreased after stimulation with MTA and ZOE in the period of 7 days. At 21 days, Biodentine™ was able to stimulate the expression of *IL-10* and in the final evaluation period only ZOE was able to modulate the inhibition of this interleukin. After analyzing the data, it was concluded that, in general, the evaluated materials, MTA and Biodentine™, mediated inflammation, with increased fibrous tissue and production of pro- and anti-inflammatory cytokines.

Keywords: Pulpotomy; MTA; Biodentine™; Subcutaneous; Interleukin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. PROPOSIÇÃO	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
4. RESULTADOS	43
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	81
ANEXO	91

1. Introdução

INTRODUÇÃO

Segundo o Glossário de Termos Endodônticos da Associação Americana de Endodontistas (Glossary of Endodontic Terms), pulpotomia consiste na remoção da porção coronal de uma polpa vital como forma de preservar a vitalidade da porção radicular restante. Sua indicação está vinculada à dentes que possuem cárie extensa, mas sem evidência de infecção na polpa radicular, exposição traumática da polpa, além da ausência de dor espontânea e persistente, abscesso e fístula (AAPD, 2014). A taxa de sucesso deste tipo de tratamento endodôntico conservador, quando indicado corretamente, varia entre 90 a 100% em estudos clínicos, radiográficos e histopatológicos (Holland et al., 2001; Faraco-Júnior e Holland, 2004; Maroto et al., 2006; Bogen et al., 2008; Nair et al., 2008; Sakai et al., 2009; Hugar e Despande, 2010; Cardoso-Silva et al., 2011; Oliveira et al., 2013; De Rossi et al., 2014; Łuczaj-Cepowicz et al., 2019; Paula et al., 2019).

Segundo Tan et al. 2020, a pulpotomia deve ser considerada tratamento definitivo em dentes assintomáticos, com elevadas taxas de sucesso a longo prazo, desde que feito monitoramento dos dentes restaurados, reduzindo o risco de novas infecções. Entretanto, falhas na indicação do tratamento afetam o prognóstico (Mejare et al., 2012; Ricucci et al., 2014, Tan et al., 2020).

A extensão da pulpotomia pode ser determinada pelo tipo do dente envolvido, pela etiologia da exposição pulpar, pela gravidade e extensão da fratura do dente, estado de formação do dente e condição da polpa avaliada. Na pulpotomia, realizada em dentes decíduos e permanentes, a polpa coronal é amputada e o restante da polpa radicular é tratado com um tipo de medicação, com o intuito de manter a vitalidade pulpar (AAPD, 2014; Bimstein et al., 2016). Entretanto, em dentes permanentes jovens, as exposições pulpares decorrentes de traumas complicados geralmente são tratadas com a remoção parcial da polpa, de 1 - 3 mm de extensão,

denominada pulpotomia Cevek, preservando o tecido da polpa rico em células com maior probabilidade de cicatrização, do que a polpa radicular (de Blanco, 1996; AAPD, 2014; Bimstein et al., 2016)

Apesar do uso contraditório, o formocresol ainda é um material bastante utilizado na pulpotomia por sua capacidade de “fixar a polpa radicular”, o que para alguns, reduz a inflamação pulpar (Chakraborty et al., 2018). Entretanto, seu uso tem sido questionado principalmente pela carcinogenicidade do formaldeído e cresol, contido em sua formulação (Ghoniem et al., 2018). Dentre os materiais estudados para substituir este produto, o glutaraldeído tamponado vem sendo utilizado por apresentar propriedade fixadora e por ser menos volátil, diminuindo a penetração apical. Entretanto sua taxa de sucesso tem sido inferior aos demais materiais (Goyal et al., 2016).

Também o sulfato férrico tem sido utilizado por alguns profissionais no caso de pulpotomia em crianças por possuir ação hemostática e curto tempo de aplicação. No entanto, as proteínas aglutinadas formam tampões que obstruem os orifícios capilares, impedindo que haja regeneração da polpa (Goyal et al., 2016), não havendo evidências científicas confiáveis para indicar seu uso (Nuvvula et al., 2018). Tradicionalmente o hidróxido de cálcio é o material de escolha para a pulpotomia, especialmente por promover o reparo tecidual e por apresentar elevada atividade antimicrobiana (Rao et al., 2020), atingindo uma taxa de sucesso entre 79% a 100% em casos de pulpotomia em incisivos permanentes com fraturas complicadas da coroa, por exemplo (Gudkina et al., 2012; Caprioglio et al., 2014; Wang et al., 2017).

Dentre os métodos não farmacológicos, a eletrocirurgia e o uso do laser estão sendo utilizados como alternativa em diversos casos. A eletrocirurgia possui a capacidade de proporcionar uma boa visualização e homeostase, necessitando de menos tempo de trabalho. Já

o laser possui a capacidade de superar os déficits histológicos e acelerar o processo de cicatrização, além de propriedades antimicrobianas e estimulante celular (Gupta et al., 2015).

Contudo, apesar de ter bons resultados com os métodos não farmacológicos, como a eletrocirurgia e o laser, para pulpotomia o agregado trióxido mineral (MTA) tem atraído a atenção de clínicos e pesquisadores pela elevada taxa de sucesso, especialmente pela sua indicação de uso em caso de pulpotomias (Holland et al., 2001; Faraco-Júnior e Holland, 2004; Maroto et al., 2006; Bogen et al., 2008; Nair et al., 2008; Sakai et al., 2009; Hugar e Despande, 2010; Cardoso-Silva et al., 2011; Oliveira et al., 2013; De Rossi et al., 2014; Stringhini Junior et al., 2015; Łuczaj-Cepowicz et al., 2019; Paula et al., 2019).

No entanto, o MTA apresenta algumas desvantagens, como longo tempo de endurecimento (2,75 horas), necessidade de hidratação durante esse período (Pérard et al., 2013) e dificuldades de manuseio (Walker et al., 2013), além do alto custo frente a outros materiais com respostas biológicas semelhantes (Lopes et al., 2019). Ainda, além dos trióxidos e do pó de óxido de bismuto, esse material possui minerais não conhecidos, com semelhança ao cimento Portland (Maroto et al., 2005).

Uma vez que o principal componente ativo do MTA é o silicato tricálcico, pesquisadores têm buscado o desenvolvimento de materiais que apresentem esse componente em sua forma pura, sintetizados em laboratório, com condições controladas a partir de matérias-primas de natureza conhecida. As tentativas de substituição do cimento Portland resultaram no desenvolvimento experimental de materiais dentários contendo o silicato tricálcico puro, com propriedades físicas adequadas (Camilleri et al., 2007; Sorrentino, 2008; Hursh et al., 2019; Miletic et al., 2019), ação antimicrobiana comparável à do hidróxido de cálcio (Boddeda et al., 2019) e boa capacidade seladora (Wang et al., 2012). O sucesso nas pesquisas laboratoriais resultou na comercialização de um cimento à base de silicato tricálcico, a Biodentine™ (Septodont

- St-Maur-des-Fossés - França). De acordo com o fabricante, a Biodentine™ é um material biológico com boas propriedades físicas, químicas e alta resistência mecânica, atuando como substituto da dentina em procedimentos restauradores, sem necessidade de realização de condicionamento ácido da superfície.

As principais vantagens da utilização da Biodentine™ sobre o MTA incluem facilidade de manuseio, grande viscosidade, menor tempo de endurecimento e melhores propriedades físicas (Villat et al., 2010; Nowicka et al., 2013), além de apresentar em sua composição matéria prima de grau de pureza conhecido (Predelle-Plasse et al., 2009). Apesar de apresentar diferenças, com relação ao MTA, na composição e tempo de presa, a Biodentine™ permite a deposição de hidroxiapatita em sua superfície quando exposta ao fluido corporal (Camilleri et al., 2013), apresenta estabilidade de cor (Vallés et al., 2013), não é genotóxica (Opacic-Galic et al., 2013) e apresenta baixa citotoxicidade (Laurent et al., 2008), mantendo a viabilidade de fibroblastos gengivais (Zhou et al., 2013). Estudos in vitro demonstraram que a Biodentine™ apresentou compatibilidade com células da polpa dental e estimulou a formação de dentina terciária (Zanini et al., 2012; Laurent et al., 2012; Pérard et al., 2013; Chang et al., 2014; Jung et al., 2014; Lee et al., 2014; Luo et al., 2014; Mythraiye et al., 2019; Riccuci et al., 2020).

Atualmente, a busca de materiais biológicos tem crescido na Odontologia, na tentativa de promover adequado processo de reparo, sem ação citotóxica ou irritante ao organismo e estudos têm avaliado e comparado a resposta inflamatória dos materiais MTA e Biodentine™ (Simsek et al., 2015; de Fonseca et al., 2016; Simsek et al., 2016; Hinata et al. 2017; Andrade et al., 2018; Pinheiro et al., 2018; Cosme-Silva et al., 2019). Embora existam estudos na literatura avaliando ambos os materiais, é importante a detecção de marcadores pro e anti-inflamatórios estimulados pelo MTA e Biodentine™ para determinar o sucesso após o tratamento.

2. Proposição

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual, resposta imune e participação de citocinas pró- e anti-inflamatórias induzidas pelos materiais Biodentine™ e MTA em tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos isogênicos.

3. Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento do projeto foi baseado nas diretrizes ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (Kilkenny et al., 2012). Inicialmente, o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA/FORP-USP) (Processo Número 2015.1.890.58.4) (Anexo A). Os cuidados com o bem-estar dos animais seguiram as normas e princípios éticos adotados pela CEUA/FORP-USP e as Resoluções Normativas do Conselho Nacional do Controle de Experimentação Animal (CONCEA), regulamentadas pela Constituição Federal Brasileira na Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008. Os testes foram conduzidos como determinado pela norma ISO 10993-6:2007.

Preparo dos Materiais

Os materiais Biodentine™ (Septodont, Saint Maur des Fosses, France) e Pro-Root MTA (Dentsplay, Tulsa, USA), e Óxido de zinco e eugenol (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA., Ibiporã, PR – Brasil) foram manipulados de acordo com seus respectivos fabricantes em fluxo laminar para a manutenção da cadeia asséptica. Foram preparados trinta corpos de prova de cada material introduzindo o material em matrizes de Teflon com dimensões de 5 mm de altura por 1,5 mm de diâmetro até que ele tomasse presa.

Obtenção dos Animais

Foram utilizados 120 camundongos machos isogênicos da linhagem BALB/c, de 6 a 8 semanas de idade, pesando em média 20 gramas, adquiridos no Biotério Geral do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Todos os animais foram mantidos no Biotério

I da FORP/USP, em gaiolas de polipropileno (5 animais por gaiola e em alguns grupos, gaiolas individuais), com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar ($55 \pm 10\%$) constantes, em ciclo de claro escuro de 12:12 horas, com ração padrão e livre acesso à água.

Estudo in vivo da resposta em tecido subcutâneo em camundongos isogênicos

Após uma semana de adaptação, os animais foram anestesiados na parte interna da pata traseira esquerda com injeção intramuscular de ketamina 10% (Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier, SA, Barcelona, Espanha) na proporção de 0,2 mL/kg e 0,8 mL/kg, respectivamente, imediatamente antes do ato cirúrgico. Em seguida, foi realizada a tricotomia do pelo do dorso do animal e a antisepsia da região com digluconato de clorexidina a 1%. A incisão foi realizada com tesoura cirúrgica, na região lombar do dorso do animal, com tamanho de 1 cm, seguida de divulsão com tesoura romba. Após posicionar o corpo de prova no interior do tecido, foi realizada a sutura da pele utilizando fio de seda (Vicryl 4-0, Ethicon, Johnson & Johnson). Os animais foram mantidos no Biotério I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, durante os períodos experimentais, com alimentação e água *ad libitum*.

Os grupos experimentais foram divididos de acordo com o material inserido no dorso de cada animal. A distribuição dos grupos, materiais utilizados, número de animais e tempos experimentais e estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais, materiais utilizados, quantidade de animais e períodos experimentais

Grupo	Material	Animais por período	Períodos experimentais
Experimental	Biodentine™	n=10	7, 21 e 63 dias
Experimental	MTA	n=10	7, 21 e 63 dias
Controle positivo	Óxido de zinco e eugenol	n=10	7, 21 e 63 dias
Controle negativo	Procedimento cirúrgico somente (<i>sham</i>)	n=10	7, 21 e 63 dias

Ao final de cada um dos períodos experimentais (7, 21 e 63 dias), os animais foram novamente anestesiados, como previamente descrito, e submetidos à eutanásia por sobredose anestésica. O bloco de tecido conjuntivo contendo o corpo de prova com o material foi removido com tesoura cirúrgica e dividido em duas partes. A parte superior, o tecido foi removido, fixado em formol a 10% e enviado para o processamento histotécnico de rotina para posterior análise microscópica com H&E. Já a parte inferior do bloco de tecido conjuntivo contendo o corpo de prova com o material foi mergulhada em solução de RNAlater® (Ambion™, Carlsbad, CA, EUA) para posterior análise da expressão gênica pela técnica de qRT-PCR.

Processamento histotécnico e avaliação microscópica

Para a realização da análise microscópica em H&E foram utilizadas as peças contendo a parte superior do tecido conjuntivo subcutâneo. O conjunto contendo o corpo-de-prova do material testado, a porção circundante do tecido conjuntivo subcutâneo e a pele foram removidas com tesoura cirúrgica esterilizada, fixadas por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas por, aproximadamente, 4 horas em água corrente. Em seguida, as peças foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina, sendo lavadas em água corrente por 2 horas, desidratadas em álcool de concentrações crescentes (70%

e 95% por 30 minutos cada; 2 trocas de 100% por 20 minutos cada e 2 trocas de álcool 100% por 40 minutos cada), diafanizadas em xilol (2 banhos de 20 minutos e 1 de 40 minutos) e incluídas em parafina.

Cortes semi-seriados de 5 μ m (10 a 15 lâminas com 2 cortes por lâmina), com intervalos de 15 μ m, foram obtidos em toda a extensão do tecido. Então, os cortes foram corados com HE, e submetidos à análise em microscopia óptica convencional, para descrição do fibrosamento e infiltrado inflamatório e análise quantitativa e semi-quantitativa do tecido adjacente aos materiais avaliados. Para as análises utilizou-se microscópio Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha), com câmera AxioCam MRc5 acoplada (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha). Todas as análises foram realizadas por um único avaliador experiente, sem conhecimento prévio do grupo a ser analisado.

Análise microscópica descritiva

Foi realizada a descrição histopatológica do tecido reacional em contato com os materiais testados ou do grupo controle (*Sham*) foi realizada em cada período experimental (7, 21 e 63 dias).

Análise microscópica semi-quantitativa

No tecido periférico ao material testado, foram observados fenômenos referentes ao fibrosamento e infiltrado inflamatório do tecido adjacente aos materiais avaliados, de acordo com os seguintes critérios descritos por nosso grupo de pesquisa previamente (Queiroz, 2011; Queiroz et al., 2011; Martinez-Colomer et al., 2016; Silva et al., 2017):

- Fibrosamento: O número e a densidade de fibras colágenas de permeio às células periféricas no tecido reacional circunjacente aos materiais avaliados foram analisados. O

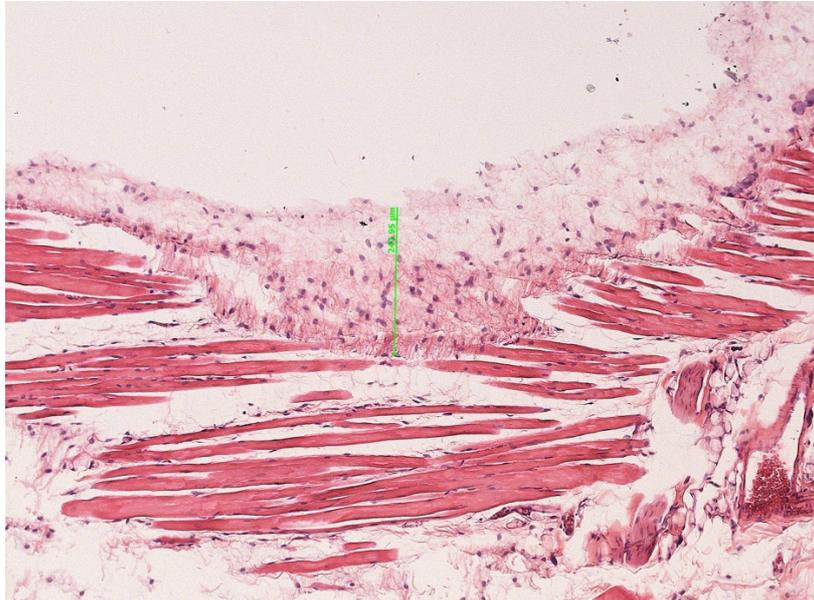
fibrosamento foi classificado em 4 graus de severidade, de acordo com os seguintes escores: Escore 0: ausência de fibrosamento; Escore 1: fibrosamento discreto: quando as fibras colágenas apresentaram-se individualizadas tal qual um tecido conjuntivo normal, entremeadas por espaços negativos indicativos de componentes não fibrosos de matriz extracelular; Escore 2: fibrosamento moderado: quando em algumas áreas as fibras colágenas apresentaram-se individualizadas, mas com áreas alternadas de matriz extracelular eosinofílica sem formações lineares e onduladas típicas das mesmas; Escore 3: fibrosamento intenso: quando as fibras colágenas apresentaram-se em meio a uma matriz extracelular eosinofílica, sem formações lineares e onduladas típicas, não permitindo observação individualizada das mesmas.

- **Infiltrado Inflamatório:** A densidade de neutrófilos polimorfonucleares de permeio ao tecido reacional adjacente aos materiais avaliados foi analisada. Esta densidade foi classificada em 4 graus de severidade (valores numéricos) de acordo com os seguintes escores: Escore 0: ausência de infiltrado inflamatório; Escore 1: infiltrado inflamatório discreto: quando foram observados de 1 a 10 neutrófilos no tecido reacional; Escore 2: infiltrado inflamatório moderado: quando foram observados de 11 a 20 neutrófilos no tecido reacional; Escore 3: infiltrado inflamatório intenso: quando foram observados mais de 21 neutrófilos no tecido reacional.

Análise microscópica quantitativa

A espessura da cápsula fibrosa foi mensurada em imagens obtidas de 3 regiões de cada corte, sendo utilizados 3 cortes por espécime, no aumento de 10×. Os resultados foram expressos em μm .

Figura 1. Imagem representativa da mensuração da espessura da cápsula fibrosa no tecido subcutâneo de camundongo, após implante com Biodentine™, MTA, Óxido de zinco e eugenol e do grupo *Sham*



Avaliação da expressão gênica - qRT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)

Para a realização da análise de qRT-PCR foram utilizadas as peças contendo a parte inferior do conjunto contendo o corpo-de-prova do material testado, a porção circundante do tecido conjuntivo subcutâneo. As peças foram removidas e mergulhadas em solução de RNAlater® (Ambion™, Carlsbad, CA, EUA) para posterior realização do qRT-PCR para detecção do RNA mensageiro para as citocinas *Il10*, *Infg*, *Il6*, *Tnf* e receptor *Il1r1*. RNA total foi extraído pelo método de colunas, utilizando um método à base de tiocianato de guanidina (RNEasy, Qiagen Inc.). Em seguida foi realizada a transcrição reversa para síntese do DNA complementar (cDNA) e, finalmente, a reação em cadeia da polimerase. *Primers* e sondas para *Il10* (Mm00439614), *Infg* (Mm01168134), *Il6* (Mm00446190), *Il1r1* (Mm00434237), *Tnf* (Mm00443258) foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas, portanto as sequências não estão disponíveis (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O gene

gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*; Hs 138400) foi utilizado como referência. As reações de qRT-PCR foram realizadas em duplicata, utilizando o aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems).

A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: ativação da polimerase AmpliTaq Gold Enzyme a 95°C por 2 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 1 segundo para desnaturação do DNA e 60°C por 15 segundos para anelamento do *primer* e polimerização. Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (*Ct*, *cycle threshold*). Como controle negativo foi utilizada a água destilada deionizada, submetida à reação com cada par das sequências dos *primers* e sondas utilizados. Para cada gene, o cálculo da expressão relativa foi realizado a partir da diferença entre o ΔCt das amostras e o ΔCt apresentado pelo controle ($\Delta\Delta Ct$), com base na equação: *Expressão relativa* = $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Análise Estatística

Para a comparação dos resultados do fibrosamento e infiltrado inflamatório os dados obtidos foram e comparados entre si por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do Pós-teste de Dunn. Para os valores obtidos após análise da espessura da cápsula de tecido e para os valores de expressão relativa de cada RNAm, os dados obtidos foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5%. Todas as análises e representações gráficas foram realizadas com o auxílio do Software GraphPad Prism 7a (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4. Resultados

RESULTADOS

Análise Microscópica Descritiva

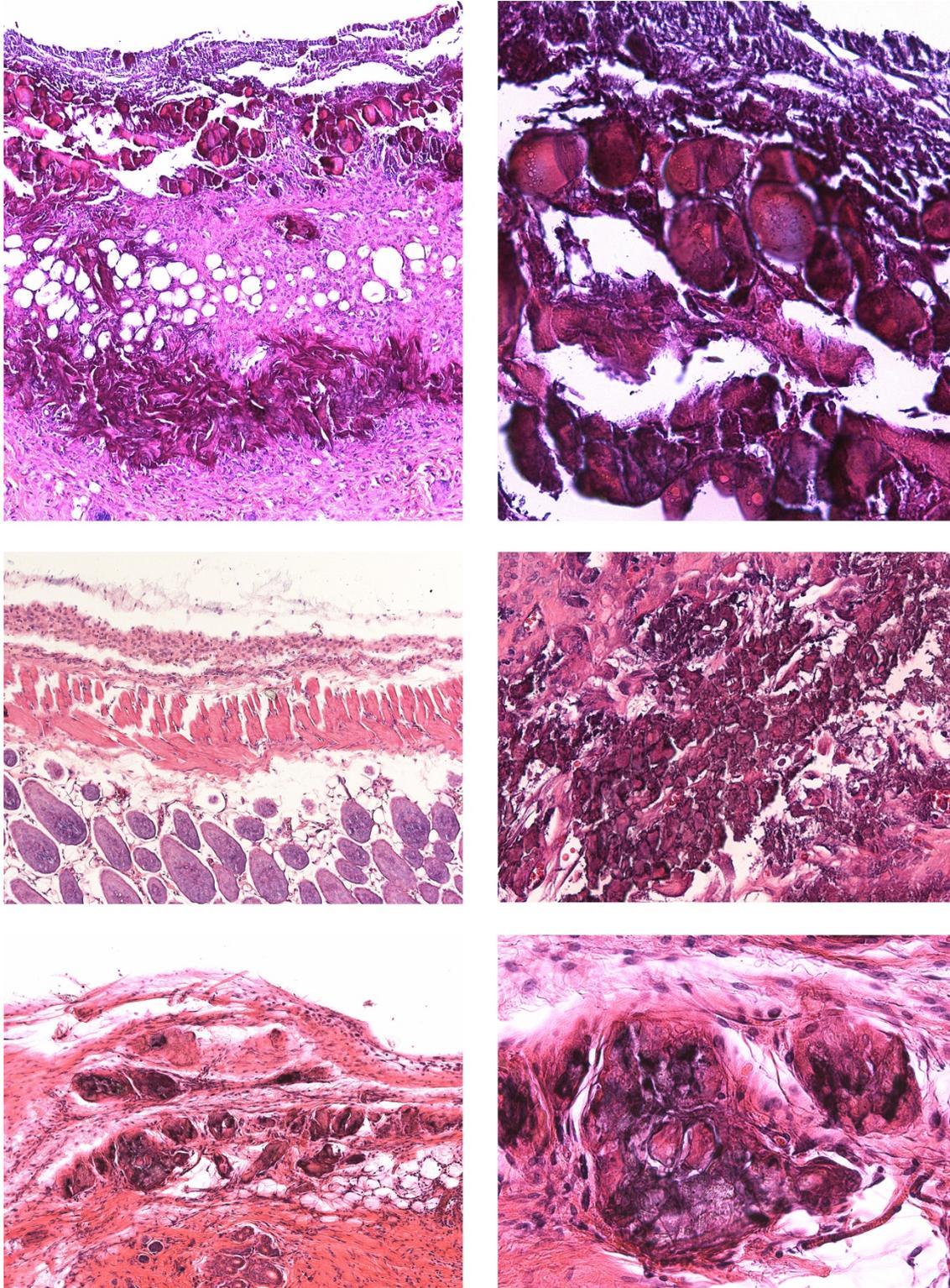
Biodentine™

A Figura 2 é uma imagem representativa da resposta tecidual observada no conjuntivo subcutâneo de camundongos aos 7 (A, B), 21 (C, D) e 63 (E, F) dias após implantação do cilindro de Biodentine™. No período experimental de 7 dias observa-se a formação de uma membrana fibrosa desorganizada e grande infiltração de polimorfonucleares e macrófagos. Nessa área, focalmente ou logo abaixo do tecido reacional, notou-se degeneração basofílica do tecido, caracterizado pela perda dos limites celulares com coloração azulada e/ou arroxeadada dos espaços intercelulares. Observou-se ainda pontos isolados de calcificação distrófica.

Aos 21 dias, na interface ao redor do material, o tecido reacional apresentou um grau de fibrosamento leve e infiltrado inflamatório misto composto por macrófagos e polimorfonucleares, variando de leve a moderado. A espessura do tecido reacional era uniforme e a estrutura organizacional rudimentar. Na parte mais periférica ao material, o tecido conjuntivo apresentou muitas formações basofílicas, indicando a presença de calcificações distróficas.

Aos 63 dias, o tecido reacional apresentava-se com fibrosamento leve e discreto infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente macrofágico e com eventuais polimorfonucleares dispersos aleatoriamente. A espessura da cápsula formada era uniforme. Muitas calcificações distróficas foram encontradas na periferia do tecido reacional.

Figura 2. Fotomicrografias representativas da resposta tecidual observada no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos aos 7 (A, B), 21 (C, D) e 63 (E, F) dias após implantação do cilindro de Biodentine™.



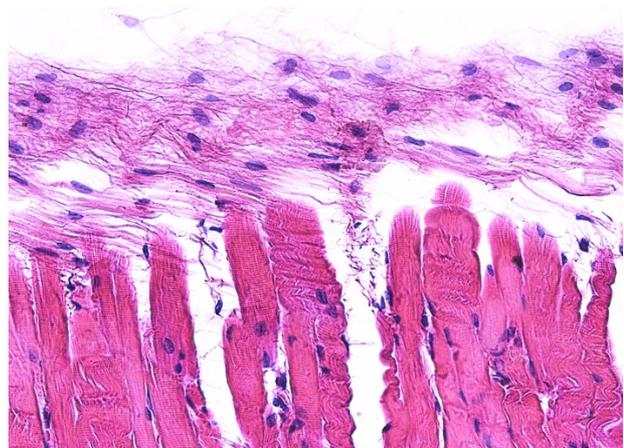
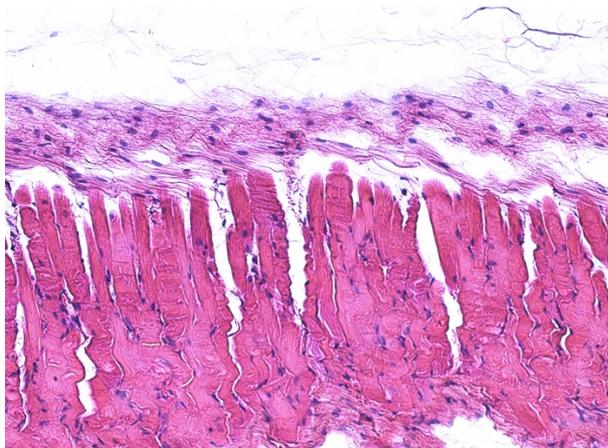
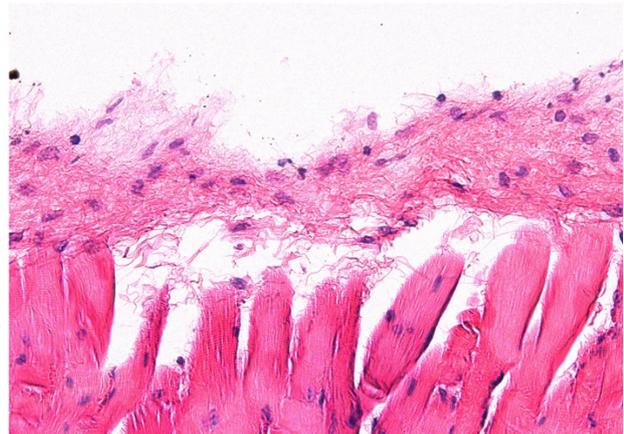
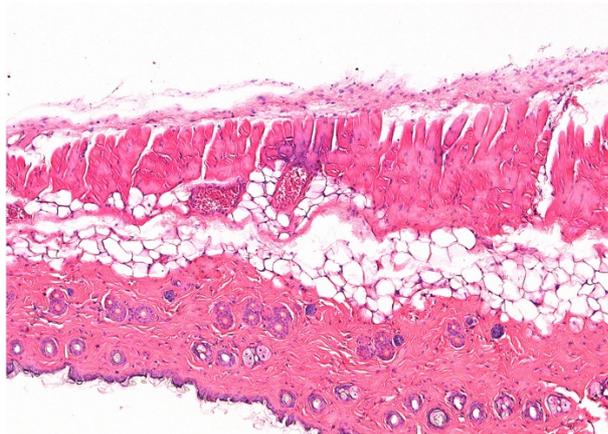
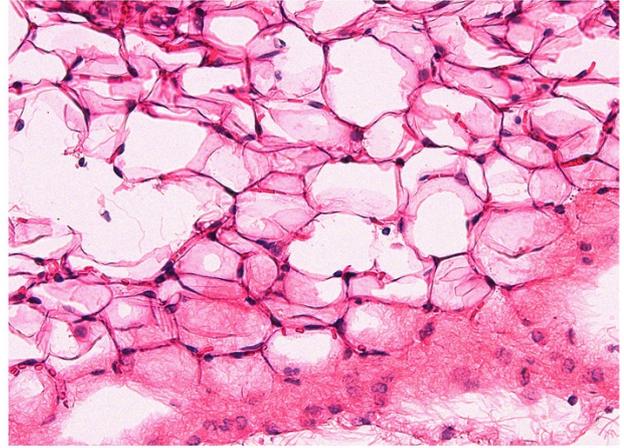
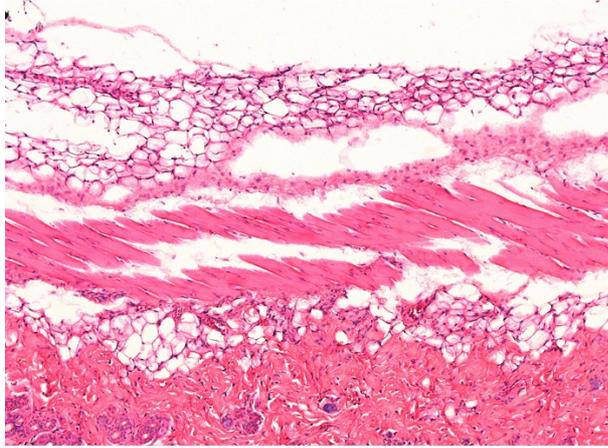
MTA

A Figura 3 evidencia a resposta tecidual no conjuntivo subcutâneo de camundongos aos 7 (A, B), 21 (C, D) e 63 (E, F) dias após implantação do cilindro de MTA. Aos 7 dias, observou-se reação tecidual uniforme em sua espessura, com grau de fibrosamento discreto. A intensidade do infiltrado variou, em alguns espécimes de moderado a intenso e em outros de leve a moderado. Apesar da predominância macrofágica, os polimorfonucleares eram comuns. Em dois espécimes observou-se partículas de material envoltos pelo tecido reacional.

Aos 21 dias, ocorreu um aumento no grau de fibrosamento do tecido reacional. O infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, variou de leve a moderado com eventuais polimorfonucleares. Em dois espécimes notou-se calcificação distrófica na periferia do tecido reacional.

Aos 63 dias, a espessura do tecido reacional era acentuadamente fina e regular com poucos leucócitos infiltrados na estrutura. O fibrosamento, em alguns casos, foi moderado. Em dois espécimes observou-se calcificação distrófica na periferia do tecido reacional.

Figura 3. Fotomicrografias representativas da resposta tecidual observada no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos aos 7 (**A, B**), 21 (**C, D**) e 63 (**E, F**) dias após implantação do cilindro de agregado de trióxido mineral (MTA).



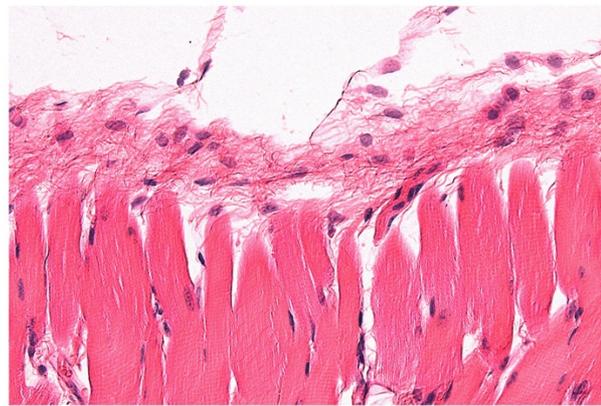
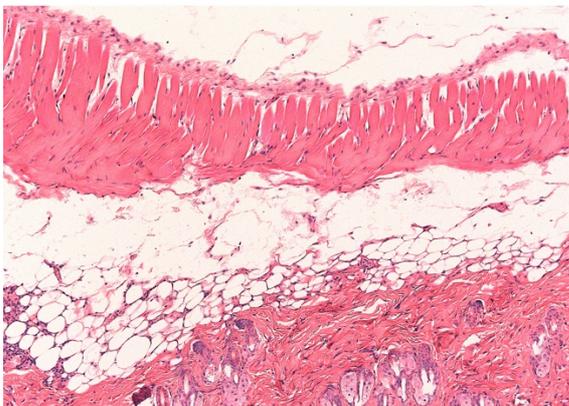
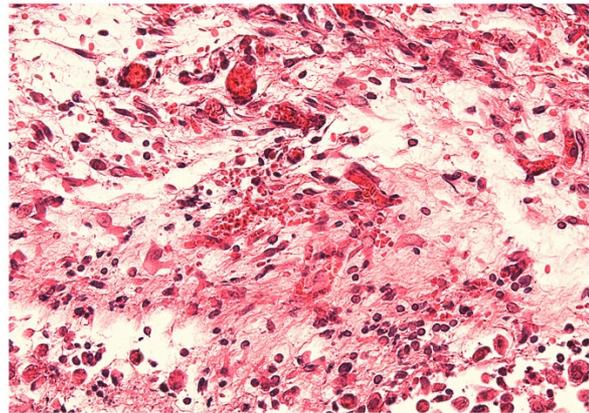
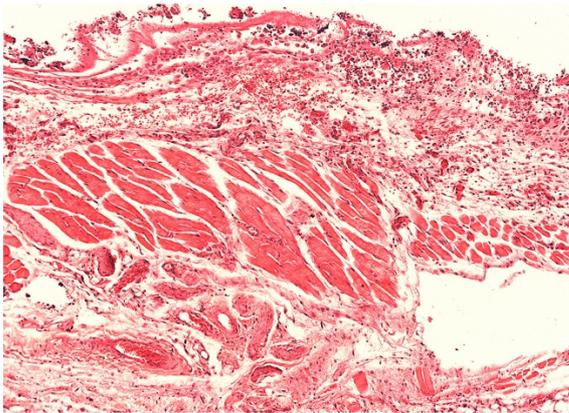
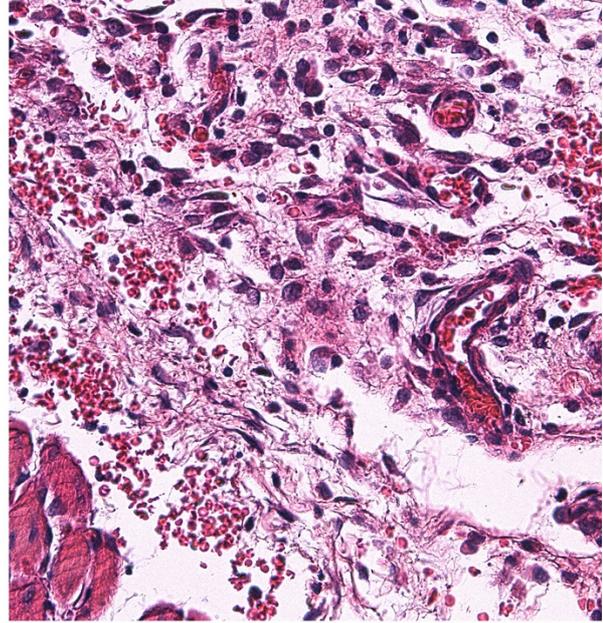
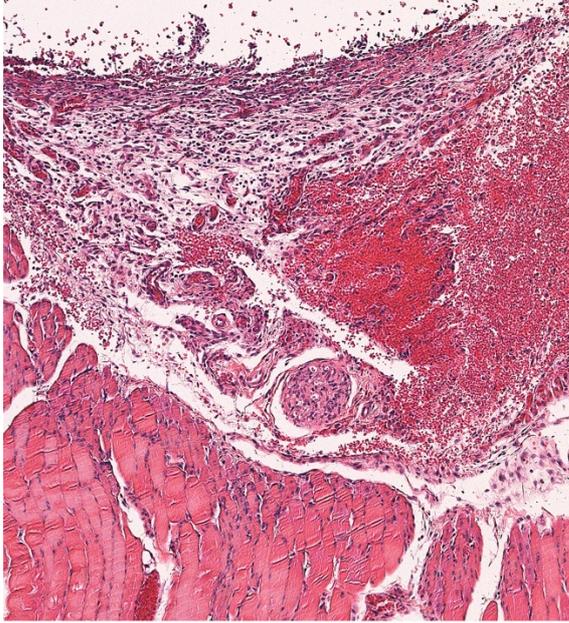
Óxido de zinco e eugenol

A Figura 4 é uma imagem representativa da resposta tecidual observada no conjuntivo subcutâneo de camundongos aos 7 (A, B), 21 (C, D) e 63 (E, F) dias após implantação do cilindro de Óxido de Zinco e Eugenol (ZOE). No período de 7 dias, observou-se um tecido reacional periférico com reduzida densidade de colágeno e edema, com infiltrado inflamatório predominantemente macrofágico e com presença marcante de polimorfonucleares, especialmente do tipo neutrófilos, embora tenham sido observados eosinófilos ocasionalmente. A espessura apresentou-se uniforme em toda a extensão de contato com o material.

Aos 21 dias, o tecido reacional formou uma cápsula muito fina e uniforme na sua espessura, com fibrosamento leve e um discreto infiltrado mononuclear predominantemente macrofágico. Neutrófilos e eosinófilos foram observados eventualmente.

A característica principal no período experimental de 63 dias frente ao óxido de zinco e eugenol foi a fina espessura do tecido reacional e a reduzida quantidade de células inflamatórias caracterizadas por macrófagos e polimorfonucleares.

Figura 4. Fotomicrografias representativas da resposta tecidual observada no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos aos 7 (**A, B**), 21 (**C, D**) e 63 (**E, F**) dias após implantação do cilindro de óxido de zinco e eugenol (ZOE).



Sham

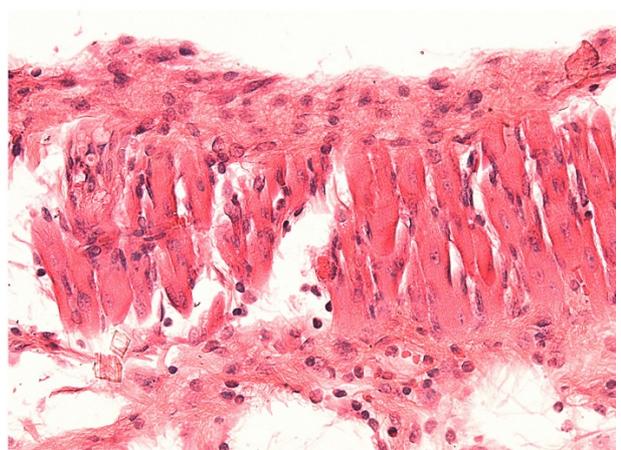
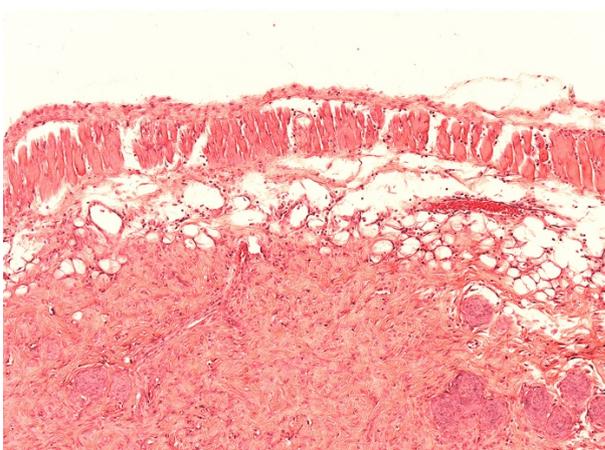
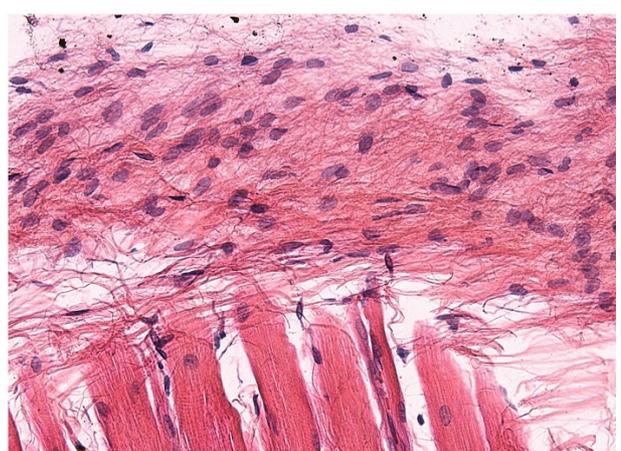
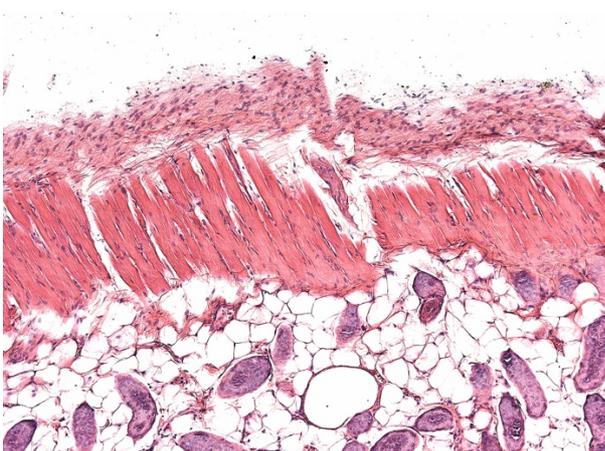
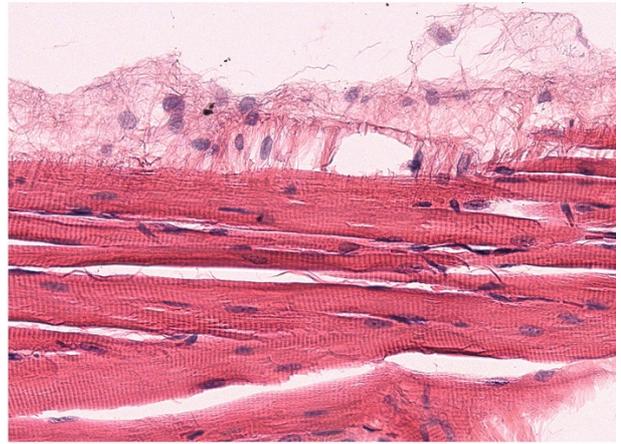
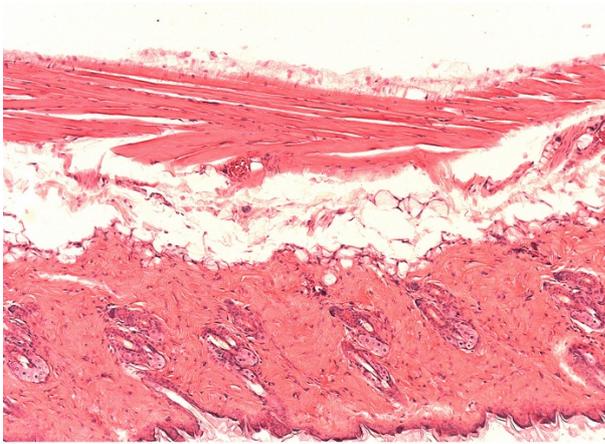
A Figura 5 é uma imagem representativa da resposta tecidual observada no conjuntivo subcutâneo de camundongos aos 7 (A, B), 21 (C, D) e 63 (E, F) dias após o procedimento cirúrgico (sham).

Aos 7 dias, o tecido conjuntivo apresentou-se acentuadamente frouxo e infiltrado por eventuais leucócitos mononucleares. A estrutura organizacional era delicada e livre de edema ou manipulações por instrumentos ou implantações.

Aos 21 dias, o grupo *Sham* revelou no local um ligeiro aumento da espessura do tecido reacional quando comparados aos espécimes do período de 7 dias. Não houve infiltrado inflamatório nem edema.

Aos 63 dias, o tecido reacional na área era fino, bem organizado e pouco fibrosado, sem edema ou infiltração local por leucócitos.

Figura 5. Fotomicrografias representativas da resposta tecidual observada no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos aos 7 (**A, B**), 21 (**C, D**) e 63 (**E, F**) dias após realização do procedimento cirúrgico experimental sem implantação do material (*sham*).



Análise Microscópica Semi-quantitativa

Fibrosamento (Tabela 2)

Aos 7 dias, todos os grupos, Biodentine™, MTA, ZOE e *sham* induziram um discreto fibrosamento do tecido conjuntivo ao redor do implante ($p > 0,05$).

Aos 21 dias, o fibrosamento tornou-se maior ao redor do MTA e dos espécimes do grupo *sham*. Esses grupos experimentais apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos grupos Biodentine™ e ZOE ($p < 0,05$), os quais mantiveram-se com discreto fibrosamento.

Aos 63 dias, todos os grupos apresentaram um fibrosamento discreto na maioria dos espécimes ($p > 0,05$).

Infiltrado inflamatório (Tabela 2)

Aos 7 dias, Biodentine™ e MTA e ZOE induziram o recrutamento de células inflamatórias de intensidade moderada a intensa para o tecido conjuntivo subcutâneo ao redor do implante, diferentemente do grupo *sham* que apresentou um infiltrado inflamatório discreto. Essa resposta foi mais intensa para a Biodentine™ e MTA, os quais apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao grupo ZOE e *sham* ($p < 0,05$).

Aos 21 e 63 dias a maioria dos espécimes mantiveram-se com infiltrado discreto ($p > 0,05$).

Tabela 2. Tabela apresentando os valores das medianas dos escores do fibrosamento e infiltrado inflamatório ao redor do material implantado qualificado em ausente(0), discreto (1), moderado (2) e intenso (3), aos 7, 21 e 63 dias após implantação de Biodentine™, Agregado de trióxido mineral (MTA), Óxido de zinco e eugenol (ZOE) ou o procedimento cirúrgico experimental sem implantação (*sham*) no tecido subcutâneo de camundongos. (1Q: 1º quartil; 3Q: 3º quartil)

Períodos Experimentais	Grupos	Fibrosamento (Q1-Q3)	Infiltrado Inflamatório
7 dias	Biodentine™	1 ^a (1-1)	3 ^a (3-3)
	MTA	1 ^a (1-1)	2,5 ^a (2-3)
	ZOE	1 ^a (1-1)	2 ^{a,b} (1,25-2,75)
	<i>sham</i>	1 ^a (0,5-1)	1 ^b (0,5-1)
21 dias	Biodentine™	1 ^a (1-1)	1,5 ^a (1-2)
	MTA	2 ^b (1-2)	1 ^a (1-1)
	ZOE	1 ^{a,b} (1-1)	1 ^a (1-1)
	<i>sham</i>	2 ^{a,b} (1-2)	1 ^a (1-1)
63 dias	Biodentine™	1 ^a (1-1)	1 ^a (1-1)
	MTA	1 ^a (1-1)	1 ^a (1-1)
	ZOE	1 ^a (1-1,5)	1 ^a (0,5-1)
	<i>sham</i>	1 ^a (1-1)	1 ^a (1-1)

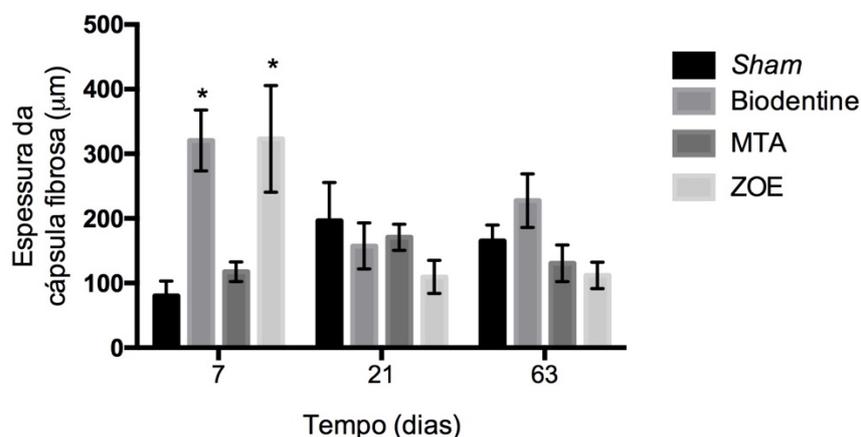
Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Análise Microscópica Quantitativa

Espessura da cápsula fibrosa (Figura 6)

Aos 7 dias, a espessura da cápsula fibrosa apresentou-se aumentada ao redor dos espécimes de Biodentine™ e ZOE, comparativamente ao grupo *sham* e MTA ($p < 0,05$). Nos períodos de 21 e 63 dias, o tecido ao redor dos materiais não apresentou aumento de espessura e se mostrou semelhante ao grupo *sham* ($p > 0,05$).

Figura 6. Gráfico representativo da espessura da cápsula fibrosa ao redor do material implantado, aos 7, 21 e 63 dias após implantação no tecido subcutâneo de camundongos. Valores expressos em micrometros para os espécimes dos grupos Biodentine™, Agregado de trióxido mineral (MTA), Óxido de zinco e eugenol (ZOE) e procedimento cirúrgico experimental sem implantação (*sham*). * $p < 0,05$ comparado ao grupo *sham*.



Avaliação da Expressão Gênica (Figura 7)

Tnf

Aos 7 dias, Biodentine™, MTA e ZOE inibiram a expressão de *Tnf* ($p < 0,05$), mas não mostraram nenhum efeito aos 21 dias ($p > 0,05$). Aos 63 dias, novamente Biodentine™, MTA e ZOE inibiram a expressão de *Tnf* ($p < 0,05$). A maior inibição da expressão gênica ocorreu no tecido conjuntivo subcutâneo em contato com o MTA, aos 7 dias, e com a Biodentine™ aos 63 dias.

Infg

Aos 7 e 21 dias, Biodentine™, MTA e ZOE inibiram a expressão de *Infg* ($p < 0,05$). Essa inibição se manteve até os 63 dias para a Biodentine™ e ZOE ($p < 0,05$), porém não foi modulada pelo MTA nesse período ($p > 0,05$). A maior inibição ocorreu em contato com o MTA aos 7 dias e com a Biodentine™ e ZOE aos 63 dias, sem diferença estatística entre eles ($p > 0,05$).

I/6

Aos 7 dias, Biodentine™, MTA e ZOE induziram a expressão de *I/6* ($p < 0,05$). Essa indução se manteve até os 21 dias para a Biodentine™ e ZOE ($p < 0,05$), porém não foi modulada por MTA nesse período ($p > 0,05$). Aos 63 dias, MTA e ZOE inibiram *I/6* enquanto a Biodentine™ não apresentou nenhum efeito na modulação gênica ($p > 0,05$).

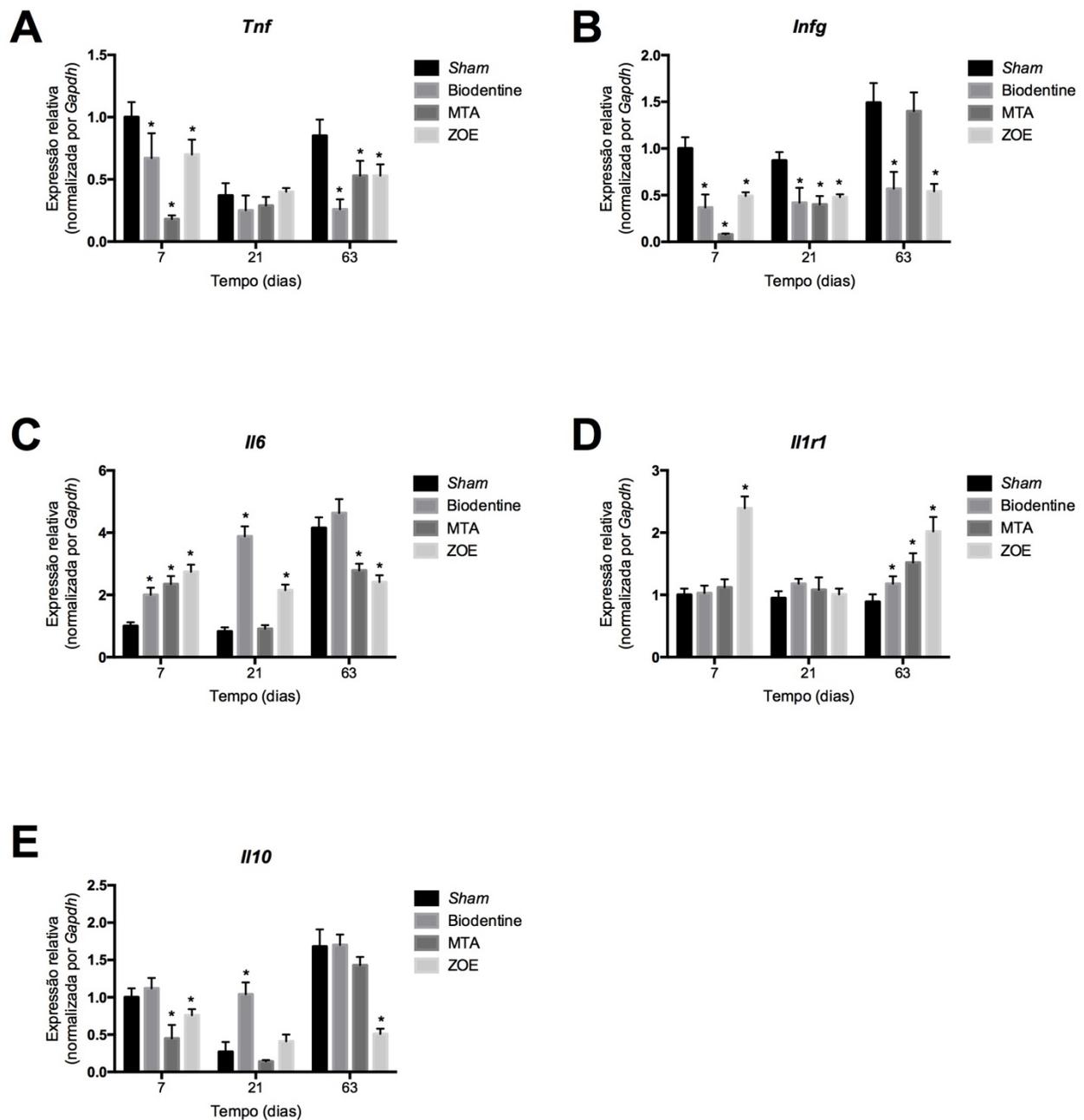
I/1r1

Aos 7 dias, ZOE induziu a expressão de *I/1r1* ($p < 0,05$) enquanto Biodentine™ e MTA não apresentaram efeito ($p > 0,05$). Aos 21 dias nenhum material modulou a expressão gênica ($p > 0,05$), diferentemente do período de 63 dias quando Biodentine™, MTA e ZOE induziram *I/1r1* ($p < 0,05$).

I/10

Aos 7 dias, MTA e ZOE inibiram a expressão de *I/10* ($p < 0,05$) e Biodentine™ não apresentou nenhum efeito ($p > 0,05$). Aos 21 dias, MTA e ZOE não apresentaram nenhum efeito ($p > 0,05$) enquanto a Biodentine™ induziu *I/10* ($p < 0,05$). Aos 63 dias, ZOE inibiu *I/10* ($p < 0,05$), mas MTA e Biodentine™ não apresentaram nenhum efeito ($p > 0,05$).

Figura 7. Gráfico representativo da expressão gênica relativa ao *Tnf* (A), *Infg* (B), *Il6* (C), *Il1r1* (D) e *Il10* (E) para os espécimes dos grupos Biodentine, Agregado de trióxido mineral (MTA), Óxido de zinco e eugenol (ZOE) e procedimento cirúrgico experimental sem implantação (*sham*), aos 7, 21 e 63 dias após implantação no tecido subcutâneo de camundongos. * $p < 0,05$ comparado ao grupo *sham*.



5. Discussão

DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar para a pulpotomia materiais que possuam propriedades que possam manter a homeostase tecidual da polpa remanescente, no presente trabalho foram avaliados dois materiais - Biodentine™, Agregado de trióxido mineral (MTA), e dois grupos utilizados como controles - Óxido de zinco e eugenol (ZOE) e procedimento cirúrgico experimental sem implantação (sham), com a finalidade de identificar a resposta tecidual frente a esses materiais, avaliando o grau de fibrosamento e infiltrado inflamatório, além da espessura da cápsula fibrosa e expressão gênica de marcadores pró- e anti-inflamatórios.

Para ser utilizado diretamente no tecido pulpar, qualquer material Odontológico deve apresentar propriedades físico-mecânicas adequadas e também propriedades biológicas satisfatórias. Desse modo, os testes de compatibilidade tecidual são essenciais (Haurman e Love, 2003; Giraud et al., 2019) e para isso diversas metodologias podem ser utilizadas (Noorani et al., 2017; Thomas e Gupta, 2017), dentre elas destaca-se a avaliação da resposta tecidual de subcutâneo de camundongos isogênicos após implante de diferentes materiais Odontológicos (da Silva et al., 2018; Pucinelli et al., 2019). A avaliação do subcutâneo é efetuada pela análise do tecido reacional após o implante do material, avaliando as características desse tecido, como a descrição das fibras colágenas, infiltrado inflamatório, e análises quantitativas como a espessura da cápsula fibrosa e PCR para diversos mediadores (Queiroz et al., 2011; Boaventura et al., 2012; da Silva et al., 2018).

Para que um material seja considerado biocompatível, a toxicidade deve ser baixa ou nula. Quanto à inflamação, sabe-se que para que haja reparo tecidual, ela é um pré-requisito necessário, sendo inclusive considerado como o estágio inicial do reparo juntamente com a coagulação, seguido da resolução da inflamação e finalizando pela revascularização (Kim e Nair,

2019). Então, é aceitável que o material biocompatível desencadeie uma inflamação nos períodos iniciais de avaliação (Silveira et al., 2011).

Estudos prévios demonstraram que a Biodentine™ é capaz de promover uma reação inflamatória inicial, a qual se torna discreta em pouco tempo (Mori et al., 2014; da Fonseca et al., 2016). Concordamos com esses estudos, pois a semelhança do que foi observado neles, no presente estudo a Biodentine™ induziu um grau severo de infiltrado inflamatório no período inicial, chegando à discreto no período mais tardio de avaliação.

A cápsula fibrosa formada em resposta aos materiais é um importante marcador inflamatório (Sanders e Rochefort, 2003), isso porque os materiais podem liberar substâncias as quais estimulam a constante resposta inflamatória, estimulando a manutenção da cápsula na tentativa do organismo em isolar aquele material (Zmener et al., 2012). No presente trabalho, observou-se que a Biodentine™ formou inicialmente uma cápsula fibrosa mais espessa que o MTA e o grupo *sham*, mas não foi diferente estatisticamente do grupo induzido por óxido de zinco e eugenol. No entanto, com o decorrer dos dias, essa espessura sofreu redução não sendo mais possível observar diferença com os outros grupos experimentais.

Em relação ao MTA, um estudo de 2013 de Cintra e colaboradores, observou que aos 7 dias, o MTA induziu uma resposta inflamatória variando de leve a moderada, a qual não se mantinha ao longo do tempo. Andrade e colaboradores (2018) após avaliação de tecido subcutâneo em ratos estimulados por materiais à base de silicato tricálcio, como a Biodentine™ e o MTA, concluiu que esse tipo de material pode apresentar uma propriedade importante no reparo radicular, já que houve uma redução significativa na reação inflamatória acompanhada pela diminuição da expressão de IL-6 nas cápsulas fibrosas ao longo do tempo.

Quando bem indicados, os casos tratados com MTA e Biodentine™ podem atingir uma taxa de sucesso de 84,6% e 92,3%, respectivamente (Linu et al., 2017). Essa taxa de sucesso

pode estar associada ao mecanismo de ação de ambos os materiais. Materiais como MTA e a Biodentine™ são considerados bioativos, ou seja, materiais que têm algum efeito sobre o organismo no qual ele é inserido. A Biodentine™ - material à base de silicato tricálcico – quando em contato com a água se dissocia em silicato de cálcio e hidróxido de cálcio (Paula et al., 2019).

De forma semelhante, os cimentos à base de agregados de trióxido mineral (MTA), quando aplicado nos tecidos, formam hidróxido de cálcio. O hidróxido de cálcio, por sua vez, apresenta duas propriedades fisiológicas importantes: libera íons cálcio, fundamentais para a adesão e proliferação celular; e alcaliniza o meio, criando assim um ambiente antibacteriano, modulando a produção de citocinas, induzindo a diferenciação e migração de células capazes de produzir tecido dentinário e ósseo dentina, dando início então à produção da ponte de dentina (Camilleri e Pitt Ford, 2006).

Seguindo essa linha de raciocínio, o presente estudo observou em análise microscópica que ambos os materiais bioativos, Biodentine™ e MTA apresentaram na porção mais periférica do tecido conjuntivo analisado muitas formações basofílicas, o que são compatíveis com calcificações distróficas. Ainda nesse sentido, trabalhos prévios *in vivo* do nosso grupo de pesquisa demonstraram que após utilização de MTA e Biodentine™ após perfuração da furca, o MTA apresentou maior espessura e área de tecido mineralizado recém-formado (Silva et al., 2017). Silva e colaboradores (2019) observaram ainda que o MTA e a Biodentine™ mostraram-se biocompatíveis, favorecendo à formação de tecido mineralizado e reinserção parcial das fibras colágenas após sua utilização em perfuração de furca induzida em cães. Contrariamente à Biodentine™, o MTA estimulou a expressão de proteínas associadas à formação de um tecido mineralizado semelhante ao cimento. No presente trabalho os resultados demonstraram a presença de uma calcificação distrófica precoce estimulada pela Biodentine™, aos 7 dias, ao passo que com o MTA a mesma aconteceu apenas após 21 dias.

Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são expressos em células da primeira linha de defesa tais como os odontoblastos e os fibroblastos. Para que ocorra o reconhecimento dos patógenos, os PRRs devem se ligar aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), expressos pelos antígenos. Esse reconhecimento desencadeia a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias capazes de atrair células inflamatórias para a região, tais como neutrófilos e macrófagos (Lawrence, 2009; Cooper et al., 2014; da Rosa et al., 2014; Giraud et al., 2019). Além disso, as citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias estimulam a migração de células pulpares indiferenciadas para o local da lesão pulpar (Tecles et al., 2005), podendo se diferenciarem em odontoblastos, formando assim uma barreira reparadora à dentina (Sloan e Smith, 2007). Dessa maneira, o estudo dos marcadores inflamatórios como citocinas e interleucinas são de extrema importância para o entendimento do processo de reparo tecidual da polpa dental. Eles são moduladores das respostas imunes e inflamatórias, podendo exercer um papel pró- ou anti-inflamatório, ou ambos, dependendo das células e dos tecidos analisados (Turner, 2014), podendo favorecer o agravamento da inflamação ou o processo de reparo.

No presente estudo foram avaliados os marcadores pró-inflamatórios (*Tnf*, *Infg*, *IL-6* e *Il1r1*), marcadores anti-inflamatório (*Il10*) após estímulo do tecido subcutâneo de camundongos com MTA e Biodentine™ e utilizando como controles o ZOE e o grupo *sham*.

O TNF (fator de necrose tumoral) faz parte de uma superfamília de proteínas que podem ser expressas em forma de receptores ou ligantes por diversos tipos celulares, ativando assim uma ampla gama de atividades celulares (Wallach et al., 2018). Essas proteínas podem estar associadas à morte celular imuno-mediada e também contribuem para a expansão e duração das atividades da população de células imunes (Falschlehnet et al., 2009; Strasser et al., 2009; Wallach et al., 2018). O interferon gama (IFN- γ) por sua vez é uma citocina que apresenta importantes propriedades inflamatórias, servindo como gatilho para que os macrófagos produzam

e liberem mediadores inflamatórios como as espécies reativas de oxigênio, poderosos agentes citostático ou citotóxico de agentes agressores como bactérias, vírus e células tumorais (MacMicking et al., 2009; Elsalhy et al., 2013). Elsalhy e colaboradores em 2013 observaram altos níveis de IFN- γ nas polpas de dentes acometidos com lesões de cárie, bem como em polpas que apresentavam um quadro de pulpite irreversível, apresentando assim seus efeitos imunomoduladores e inflamatórios.

Ainda sobre o IFN- γ , sabe-se que ele é um indutor clássico, juntamente com o TNF- α e lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), para a polarização de macrófagos para o seu fenótipo M1 (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Os macrófagos polarizados apresentam fenótipos específicos que ocorrem devido à diferença de microambiente durante sua diferenciação, resultando em respostas distintas (Sica & Mantovani, 2012). Os principais fenótipos são os macrófagos M1 e M2. Os macrófagos M1, ou classicamente ativados, apresentam como sua principal função a remoção de patógenos durante a infecção, com importantes medidas pró-inflamatórias, como a geração de espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, os macrófagos M2 têm um caráter mais anti-inflamatório, protegendo o tecido contra danos teciduais causados pela própria resposta inflamatória e estimulando o reparo tecidual (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

No presente estudo, observou-se que a Biodentine™ e o MTA foram capazes de inibir, ao longo dos períodos experimentais, a expressão dos marcadores pró-inflamatórios *Tnf*, *Infg*, demonstrando assim a característica anti-inflamatória desses materiais. A Biodentine™ e o MTA têm apresentado propriedades capazes de modular o processo inflamatório, estimulando o reparo tecidual (Giraud et al., 2019). A Biodentine™, por exemplo, possui atividade anti-inflamatória, controlando a secreção de fatores pró-inflamatórios e diminuindo o recrutamento de células inflamatórias (Giraud et al., 2018).

Foncesca et al. (2016) avaliou o processo inflamatório ocasionado pelo MTA e pela Biodentine™, em que a resposta inflamatória foi mensurada pelo número de células inflamatórias presentes no tecido conjuntivo de ratos, estimado em secções coradas com HE e pela densidade numérica de células imunizadas com *IL6*. Neste estudo observou-se uma reação inflamatória inicialmente induzida pela Biodentine™, em comparação ao MTA. A partir de 15 dias, uma redução significativa no número de células inflamatórias e da imunexpressão de *IL6* em ambos os grupos. No estudo de Giraud et al. (2018) os pesquisadores avaliaram *in vitro* o efeito de materiais à base de silicatos na modulação das etapas iniciais da inflamação e reparo, percebendo que, independentemente do período de incubação do meio condicionado, a Biodentine proporcionou menor expressão de *IL6*. No presente estudo, corroborando com os estudos citados, tanto a Biodentine quanto o MTA foram capazes de estimularem a expressão de *IL6* nos períodos iniciais. No entanto, observamos que no último período avaliado, 63 dias, o MTA inibiu a expressão dessa citocina, o que não aconteceu com a Biodentine. A interleucina (IL)-6 exibe diferentes efeitos biológicos, podendo atuar como mediador da resposta do hospedeiro após lesão e infecção tecidual, bem como um mediador inflamatório, especialmente por apresentar atividade na regulação das moléculas de adesão, induzindo a angiogênese e aumentando a permeabilidade vascular e edema inflamatório (Elsalhy et al., 2013).

Observou-se ainda nesse estudo que a *IL-10* teve sua expressão diminuída após estímulo com MTA e ZOE no período de 7 dias. Já aos 21 dias, a Biodentine foi capaz de estimular a expressão de *IL-10* e no período final de avaliação, 63 dias, apenas o ZOE foi capaz de modular a inibição dessa interleucina. A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória, sendo o principal inibidor da síntese de citocinas pró-inflamatórias e da atividade de macrófagos (Mosser & Zhang, 2008; Elsalhy et al., 2013). Sendo uma interleucina anti-inflamatória, os resultados do presente estudo demonstraram que o MTA foi capaz de mediar uma resposta pró-inflamatória

nos períodos iniciais, com a inibição da expressão da *IL-10*. Sabe-se que a inflamação inicial é essencial para o reparo tecidual e, conseqüentemente, para um resultado clínico bem-sucedido (Farges et al., 2015). Por isso, o MTA não ter inibido a expressão da *IL-10* foi um resultado satisfatório. Por outro lado, a Biodentine demonstrou seu efeito anti-inflamatório no período de 21 dias, com aumento da expressão dessa citocina.

De maneira geral, os resultados do presente estudo demonstraram que inicialmente houve uma inflamação tanto nos grupos estimulados por Biodentine tanto com MTA, com discreto fibrosamento e com diminuição das citocinas analisadas.

6. Conclusão

CONCLUSÃO

Após análise dos dados, conclui-se que de maneira geral os materiais avaliados, MTA e Biodentine, mediaram a inflamação, com aumento do fibrosamento e produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias.

Referências

REFERÊNCIAS

American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. *Pediatr Dent* 2015;37:244–52.

American Association of Endodontists Glossary of Endodontic Terms (8th ed.), American Association of Endodontists, Chicago (2012).

American Association of Endodontists. (2003). Glossary of endodontic terms. American Association of Endodontists.

Andrade AS, Silva GF, Camilleri J, Cerri ES, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS, Tanomaru-Filho M. Tissue Response and Immunoexpression of Interleukin 6 Promoted by Tricalcium Silicate-based Repair Materials after Subcutaneous Implantation in Rats. *J Endod*. 2018 Mar;44(3):458-463.

Bimstein E, Rotstein I. Cvek pulpotomy—revisited. *Dental Traumatology*. 2016 Dec;32(6):438-42.

Boaventura JM, Bertolini MJ, Padovani GC, de Oliveira MR, Zaghete MA, de Oliveira Junior OB, et al. Tissue response to experimental dental cements prepared from a modified powder glass composition. *Dent Mater J* 2012;31(4):583-92.

Boddeda KR, Rani CR, V Vanga NR, Chandrabhatla SK. Comparative evaluation of biodentine, 2% chlorhexidine with RMGIC and calcium hydroxide as indirect pulp capping materials in primary molars: An in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2019 Jan-Mar;37(1):60-66.

Bogen G, Kim JS, Bakland LK. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. *J Am Dent Assoc* 2008 Mar;139(3):305-15.

Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater* 2013; 29:580–93.

Camilleri J., Pitt Ford T.R. Mineral trioxide aggregate: A review of the constituents and biological properties of the material. *Int. Endod. J.* 2006;39:747–754.

Caprioglio A, Conti V, Caprioglio C, Caprioglio D. A long-term retrospective clinical study on MTA pulpotomies in immature permanent incisors with complicated crown fractures. *Eur J Paediatr Dent*. 2014;15(1):29–34.

Cardoso-Silva C, Barbería E, Maroto M, García-Godoy F. Clinical study of Mineral Trioxide Aggregate in primary molars. Comparison between Grey and White MTA - a long term follow-up (84 months). *J Dent*. 2011 Feb;39(2):187-93.

Chakraborty A, Dey B, Jana S. A Nonconventional Approach to Formocresol Pulpotomy. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2018 Nov-Dec;11(6):490-495.

Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *J Endod* 2014;40(8):1194-200.

Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod*. 2014 Apr;40(4 Suppl):S46-51.

Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Gonçalves LO, Prado ASD, Piazza FA, Viola NV, Cintra LTA, Gomes Filho JE. Hypertension affects the biocompatibility and biomineralization of MTA, High-plasticity MTA, and Biodentine®. *Braz Oral Res*. 2019 Jul 29;33:e060.

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 immunoeexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *Int Endod J*. 2016 Feb;49(2):145-53.

da Rosa WLO, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *Int Endod J*. 2018 Aug;51(8):829-846.

da Silva LAB, Bertasso AS, Pucinelli CM, da Silva RAB, de Oliveira KMH, Sousa-Neto MD, Consolaro A. Novel endodontic sealers induced satisfactory tissue response in mice. *Biomed Pharmacother*. 2018 Oct;106:1506-1512.

de Blanco LP. Treatment of crown fractures with pulp exposure. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Nov;82(5):564-8.

De Rossi A, Silva LAB, Gatón-Hernández P, Sousa-Neto MD, Nelson-Filho P, Silva RAB, de Queiroz AM. Comparison of pulpal responses to pulpotomy and pulp capping with biodentine and mineral trioxide aggregate in dogs. *Journal of Endodontics* 2014, 40(9), 1362-1369.

Elsalhy M, Azizieh F, Raghupathy R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *Int Endod J*. 2013 Jun;46(6):573-80.

Falschlehner C, Schaefer U, Walczak H. Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology*. 2009 Jun;127(2):145-54.

Faraco Junior IM, Holland R. Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* 2004;15(2):104-8.

Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, Cooper PR. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:230251.

Ghoniem N., Vaidyanathan V., Zealand C.M. Mineral trioxide aggregate and diluted formocresol pulpotomy: prospective and retrospective study outcomes. *J Mich Dent Assoc*. 2018;100:40–65.

Giraud T, Jeanneau C, Bergmann M, Laurent P, About I. Tricalcium Silicate Capping Materials Modulate Pulp Healing and Inflammatory Activity In Vitro. *J Endod*. 2018 Nov;44(11):1686-1691.

Giraud T, Jeanneau C, Rombouts C, Bakhtiar H, Laurent P, About I. Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. *Dent Mater*. 2019 Jan;35(1):24-35.

Goyal P, Pandit IK, Gugnani N, Gupta M, Goel R, Gambhir RS. Clinical and radiographic comparison of various medicaments used for pulpotomy in primary molars: A randomized clinical trial. *Eur J Dent*. 2016 Jul-Sep;10(3):315-320.

Gudkina J, Mindere A, Locane G, Brinkmane A. Review of the success of pulp exposure treatment of cariously and traumatically exposed pulps in immature permanent incisors and molars. *Stomatologija*. 2012;14(3):71–80.

Gupta G, Rana V, Srivastava N, Chandna P. Laser Pulpotomy-An Effective Alternative to Conventional Techniques: A 12 Months Clinicoradiographic Study. *International journal of clinical pediatric dentistry*, 2015; 8(1), 18–21.

Hauman CH and Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. *Int Endod J* 2003; 36:147-160.

Hinata, G., Yoshiba, K., Han, L., Edanami, N., Yoshiba, N., & Okiji, T. (2017). Bioactivity and biomineralization ability of calcium silicate-based pulp-capping materials after subcutaneous implantation. *International endodontic journal*, 50, e40-e51.

Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, Dezan-Júnior E. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J* 2001;12(2):109-13.

Hugar SM, Deshpande SD. Comparative investigation of clinical/radiographical signs of mineral trioxide aggregate and formocresol on pulpotomized primary molars. *Contemp Clin Dent* 2010 Jul;1(3):146-51.

Hursh KA, Kirkpatrick TC, Cardon JW, Brewster JA, Black SW, Himel VT, Sabey KA. Shear Bond Comparison between 4 Bioceramic Materials and Dual-cure Composite Resin. *J Endod*. 2019 Nov;45(11):1378-1383.

International Organization for Standardization (ISO). ISO 10993-6: Biological evaluation of medical devices. Part 6: Tests for local effects after implantation. Geneva; 2007.

Jung JY, Woo SM, Lee BN, Koh JT, Nör JE, Hwang YC. Effect of Biodentine and Bioaggregate on odontoblastic differentiation via mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp cells. *Int Endod J* 2014.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Apr;20(4):256-60.

Kim SY, Nair MG. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol Cell Biol*. 2019 Mar;97(3):258-267.

Laurent P, Camps J, About I. Biodentine induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J* 2012; 45:439–48.

Laurent P, Camps J, De Méo M, et al. Induction of specific cell responses to a Ca₃SiO₅-based posterior restorative material. *Dent Mater* 2008; 24:1486–94.

Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6):a001651.

Lee BN, Lee KN, Koh JT, Min KS, Chang HS, Hwang IN, Hwang YC, Oh WM. Effects of 3 endodontic bioactive cements on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J Endod.* 2014 Aug;40(8):1217-22.

Linu S., Lekshmi M.S., Varunkumar V.S., Sam Joseph V.G. Treatment Outcome Following Direct Pulp Capping Using Bioceramic Materials in Mature Permanent Teeth with Carious Exposure: A Pilot Retrospective Study. *J. Endod.* 2017;43:1635–1639.

Lopes CS, Junqueira MA, Cosme-Silva L, Pegoraro COR, Garbelini CCD, Oliveira TM, Martins NS, Neves JDS, Sakai VT. Initial inflammatory response after the pulpotomy of rat molars with MTA or ferric sulfate. *J Appl Oral Sci.* 2019 Jul 29;27:e20180550.

Łuczaj-Cepowicz E, Marczuk-Kolada G, Pawińska M, Różycki J, Chorzewska E. Comparison of the radiopacity of selected materials used for vital pulp therapy: An in vitro assessment. *Dent Med Probl.* 2019 Jul-Sep;56(3):285-290.

Luo Z, Kohli MR, Yu Q, Kim S, Qu T, He WX. Biodentine induces human dental pulp stem cell differentiation through mitogen-activated protein kinase and calcium-/calmodulin-dependent protein kinase II pathways. *J Endod* 2014;40(7):937-42.

MacMicking JD. Recognizing macrophage activation and host defense. *Cell Host Microbe.* 2009 May 8;5(5):405-7.

Maroto et al., 2006; Maroto M, Barbería E, Planells P, García Godoy F. Dentin bridge formation after mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomies in primary teeth. *Am J Dent* 2005 Jun;18(3):151-4.

Maroto M, Barbería E, Planells P, García Godoy F. Dentin bridge formation after mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomies in primary teeth. *Am J Dent* 2005 Jun;18(3):151-4.

Martínez-Colomer S, Gatón-Hernández P, Romano FL, De Rossi A, Fukada SY, Nelson-Filho P, Consolaro A, Silva RA, Silva LA. Latex and nonlatex orthodontic elastics: In vitro and in vivo evaluations of tissue compatibility and surface structure. *Angle Orthod* 2016;86(2):278-84.

Mejère IA, Axelsson S, Davidson T, Frisk F, Hakeberg M, Kvist T, Norlund A, Petersson A, Portenier I, Sandberg H, Tranaeus S, Bergenholtz G. Diagnosis of the condition of the dental pulp: a systematic review. *Int Endod J.* 2012 Jul;45(7):597-613.

Miletic V, Marjanovic J, Veljovic DN, Stasic JN, Petrovic V. Color stability of bulk-fill and universal composite restorations with dissimilar dentin replacement materials. *J Esthet Restor Dent*. 2019 Sep;31(5):520-528.

Mori GG, Teixeira LM, de Oliveira DL, Jacomini LM, da Silva SR. Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. *Journal of endodontics* 2014, 40(9), 1485-1488.

Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:205-18.

Mythraiye R, Rao VV, Minor Babu MS, Satyam M, R P, Paravada C. Evaluation of the Clinical and Radiological Outcomes of Pulpotomized Primary Molars Treated with Three Different Materials: Mineral Trioxide Aggregate, Biodentine, and Pulpotec. An In-vivo Study. *Cureus*. 2019 Jun 2;11(6):e4803.

Nair PN, Duncan HF, Pitt-Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int Endod J* 2008; 41:128–50.

Noorani TY, Luddin N, Rahman IA, Masudi SM. In Vitro Cytotoxicity Evaluation of Novel Nano-Hydroxyapatite-Silica Incorporated Glass Ionomer Cement. *J Clin Diagn Res* 2017;11(4):Zc105-zc9.

Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, Kaczmarek W, Buczkowska- Radlińska J. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2013;39(6):743-7.

Nuvvula S, Bandi M, Mallineni SK. Efficacy of ferric sulphate as a pulpotomy medicament in primary molars: an evidence based approach. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2018 Dec;19(6):439-447.

Oliveira TM, Moretti AB, Sakai VT, et al. Clinical, radiographic and histologic analysis of the effects of pulp capping materials used in pulpotomies of human primary teeth. *Eur Arch Paediatr Dent* 2013;14:65–71.

Opacic-Galic V, Petrovic V, Zivkovic S et al. New nanostructural biomaterials based on active silicate systems and hydroxyapatite: characterization and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Int Endod J* 2013;46: 506–16.

Paula A, Carrilho E, Laranjo M, Abrantes AM, Casalta-Lopes J, Botelho MF, Marto CM, Ferreira MM. Direct Pulp Capping: Which is the Most Effective Biomaterial? A Retrospective Clinical Study. *Materials (Basel)*. 2019 Oct 16;12(20). pii: E3382.

Paula AB, Laranjo M, Marto CM, Paulo S, Abrantes AM, Fernandes B, Casalta-Lopes J, Marques-Ferreira M, Botelho MF, Carrilho E. Evaluation of dentinogenesis inducer biomaterials: an in vivo study. *J Appl Oral Sci*. 2019 Nov 28;28:e20190023.

Pérard M, Le Clerc J, Meary F, et al. Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. *J Mater Sci Mater Med* 2013; 24:1527–34.

- Pinheiro LS, Iglesias JE, Boijink D, Mestieri LB, Poli Kopper PM, Figueiredo JAP, Grecca FS. Cell Viability and Tissue Reaction of NeoMTA Plus: An In Vitro and In Vivo Study. *J Endod.* 2018 Jul;44(7):1140-1145.
- Pucinelli CM, Silva RABD, Borges LL, Borges ATDN, Nelson-Filho P, Consolaro A, Gatón-Hernández P, Silva LABD. Tissue Response after Subcutaneous Implantation of Different Glass Ionomer-Based Cements. *Braz Dent J.* 2019 Nov-Dec;30(6):599-606.
- Queiroz AM, Assed S, Consolaro A, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva RA, Silva LA. Subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. *Braz Dent J* 2011;22(3):203-11.
- Rao Q, Kuang J, Mao C, et al. Comparison of iRoot BP Plus and Calcium Hydroxide as Pulpotomy Materials in Permanent Incisors with Complicated Crown Fractures: A Retrospective Study. *J Endod.* 2020;46(3):352–357.
- Ricucci D, Grande NM, Plotino G, Tay FR. Histologic Response of Human Pulp and Periapical Tissues to Tricalcium Silicate-based Materials: A Series of Successfully Treated Cases. *J Endod.* 2020 Feb;46(2):307-317.
- Ricucci, D., Loghin, S., & Siqueira Jr, J. F. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. *Journal of Endodontics.* 2014; 40(12), 1932-1939.
- Sakai VT, Moretti AB, Oliveira TM, Fornetti AP, Santos CF, Machado MA, Abdo RC. Pulpotomy of human primary molars with MTA and Portland cement: a randomised controlled trial. *Br Dent J* 2009 Aug 8;207(3):E5.
- Sanders JE, Rochefort JR. Fibrous encapsulation of single polymer microfibers depends on their vertical dimension in subcutaneous tissue. *J Biomed Mater Res A.* 2003 Dec 15;67(4):1181-7.
- Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018 Sep;233(9):6425-6440.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012 Mar;122(3):787-95.
- Silva BLA, Leonardo MR, Faccioli LH, Figueiredo F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *J Endod* 1997; 23:86-90.
- Silva LA, Azevedo LU, Consolaro A, Barnett F, Xu Y, Battaglino RA, Cañadas PS, de Oliveira KM, Silva RA. Novel endodontic sealers induce cell cytotoxicity and apoptosis in a dose-dependent behavior and favorable response in mice subcutaneous tissue. *Clin Oral Investig* 2017. In press.
- Silva LAB, Pieroni KAMG, Nelson-Filho P, Silva RAB, Hernández-Gatón P, Lucisano MP, Paula-Silva FWG, de Queiroz AM. Furcation Perforation: Periradicular Tissue Response to Biodentine as a Repair Material by Histopathologic and Indirect Immunofluorescence Analyses. *J Endod.* 2017 Jul;43(7):1137-1142.

Silva LLCE, Cosme-Silva L, Sakai VT, et al. Comparison between calcium hydroxide mixtures and mineral trioxide aggregate in primary teeth pulpotomy: a randomized controlled trial. *J Appl Oral Sci.* 2019;27:e20180030.

Silva RAB, Borges ATN, Hernández-Gatón P, de Queiroz AM, Arzate H, Romualdo PC, Nelson-Filho P, Silva LAB. Histopathological, histoenzymological, immunohistochemical and immunofluorescence analysis of tissue response to sealing materials after furcation perforation. *Int Endod J.* 2019 Oct;52(10):1489-1500.

Silveira CM, Pinto SC, Zedebki Rde A, Santos FA, Pilatti GL. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J.* 2011;22(1):21-7.

Simsek, N., Alan, H., Ahmetoglu, F., Taslidere, E., Bulut, E. T., & Keles, A. (2015). Assessment of the biocompatibility of mineral trioxide aggregate, bioaggregate, and biodentine in the subcutaneous tissue of rats. *Nigerian journal of clinical practice*, 18(6), 739-743.

Simsek, N., Bulut, E. T., Ahmetoğlu, F., & Alan, H. (2016). Determination of trace elements in rat organs implanted with endodontic repair materials by ICP-MS. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(3), 46.

Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis.* 2007 Mar;13(2):151-7.

Sorrentino F. Upscaling the synthesis of tricalcium silicate and alite. *Cement Wapno Beton* 2008; 8:177–83.

Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity.* 2009 Feb 20;30(2):180-92.

Stringhini Junior E, Vitcel ME, Oliveira LB. Evidence of pulpotomy in primary teeth comparing MTA, calcium hydroxide, ferric sulphate, and electrosurgery with formocresol. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2015;16(4):303–312.

Tan SY, Yu VSH, Lim KC, Tan BCK, Neo CLJ, Shen L, Messer HH. Long-term Pulpal and Restorative Outcomes of Pulpotomy in Mature Permanent Teeth. *J Endod.* 2020 Jan 2. pii: S0099-2399(19)30914-8.

Téclès O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, About I. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol.* 2005 Feb;50(2):103-8.

Thomas B, Gupta K. In vitro biocompatibility of hydroxyapatite-added GIC: An SEM study using human periodontal ligament fibroblasts. *J Esthet Restor Dent* 2017;29(6):435-41.

Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Nov;1843(11):2563-2582.

- Vallées M, Mercade M, Duran-Sindreu F et al. Influence of light and oxygen on the color stability of five calcium silicate-based materials. *J Endod* 2013; 39:525–8.
- Villat C, Tran XV, Pradelle-Plasse N, Ponthiaux P, Wenger F, Grosogeat B, Colon P. Impedance methodology: A new way to characterize the setting reaction of dental cements. *Dent Mater* 2010 ;26(12):1127-32.
- Walker LA, Sanders BJ, Jones JE, et al. Current trends in pulp therapy: a survey analyzing pulpotomy techniques taught in pediatric dental residency programs. *J Dent Child* 2013; 80:31–5.
- Wallach D. The Tumor Necrosis Factor Family: Family Conventions and Private Idiosyncrasies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 Oct 1;10(10). pii: a028431.
- Wang G, Wang C, Qin M. Pulp prognosis following conservative pulp treatment in teeth with complicated crown fractures-A retrospective study. *Dent Traumatol*. 2017;33(4):255–260.
- Wang X, Chang J, Hu S. A study on the sealing ability and antibacterial activity of Ca₃- SiO₅/CaCl₂ composite cement for dental applications. *Dent Mater J* 2012; 31:617–22.
- Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod* 2012; 38:1220–6.
- Zhao W, Wang J, Zhai W, Wang Z, Chang J. The self-setting properties and in vitro bioactivity of tricalcium silicate. *Biomaterials* 2005; 26:6113–21.
- Zmener O, Martinez Lalis R, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu G, Grana D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. *J Endod*. 2012 Sep;38(9):1233-8.

Anexo

Anexo



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 101/2015

Ribeirão Preto, 21 de outubro de 2015.

Ref. processo nº 2015.1.890.58.4

Senhor(a) Pesquisador(a),

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP, em sua 32ª Sessão Ordinária, realizada em 21 de outubro de 2015, **aprovou** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "Resposta do Tecido Conjuntivo Subcutâneo em Camundongos Isogênicos Induzida por Biodentine e Agregado Trióxido Mineral", emitindo o certificado anexo.

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 30/11/2016**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Michel Reis Messor

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo(a). Sr(a).

Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva

Departamento de Clínica Infantil

desta Faculdade