



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – MG**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Alfenas – MG  
CEP 37.130-000 Fone: (35) 3299-1000 Fax: (35) 3299 - 1083



**AMANDA FERREIRA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE FIBROBLASTOS L929 E DA  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS AO NOVO  
MATERIAL BIO-C PULPO**

Alfenas/MG

2019

**AMANDA FERREIRA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE FIBROBLASTOS L929 E DA  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS AO NOVO  
MATERIAL BIO-C PULPO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL/MG).

Linha de pesquisa: Biologia dos tecidos do complexo bucomaxilofacial

Orientadora: Prof. Dra. Naiana Viana Viola Nícoli

Coorientador: Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

S237a Santos, Amanda Ferreira.  
Avaliação da viabilidade celular de fibroblastos L929 e da resposta  
inflamatória em tecido subcutâneo de ratos ao novo aterial Bio-C Pulpo. –  
Alfenas/MG, 2019.  
65 f.: il. --

Orientadora: Naiana Viana Viola Nicoli.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade  
Federal de Alfenas, 2019.  
Bibliografia.

1. Pulpotomia. 2. Teste de Materiais. 3. Teste de Citotoxicidade. 4.  
Biocompatibilidade. I. Nicoli, Naiana Viana Viola. II. Título.

CDD-617.6342



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG. CEP 37130-001



**AMANDA FERREIRA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE FIBROBLASTOS L929 E DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS AO NOVO MATERIAL BIO-C PULPO**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovada em: 12/03/2019

Profa. Dra. Naiana Viana Viola Nicoli  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Daniela Silva Barroso de Oliveira  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Renata Gonçalves Soares  
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano  
UNIFENAS

Assinatura:

## AGRADECIMENTOS

### *Á Deus;*

Foste Tu que me ensinaste que nada é impossível, que perante qualquer dificuldade quem acredita no teu amor encontrará o caminho da superação. Assim, meu Deus, a Ti dedico e agradeço por mais esta conquista, pois em todo instante senti Tua mão me amparando e Teu amor me guiando.

### *Á minha família;*

Aos meus pais **Mariza Helena e Carlos Eduardo**, vocês me deram o dom da vida, se sacrificaram, se dedicaram, abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter não só uma boa formação profissional, mas também pessoal. Juntamente com meu irmão **Gian Carlo**, eu devo tudo a vocês, e se sinto orgulho de mim e do lugar onde cheguei, é porque sei que vocês vieram segurando a minha mão a todo momento.

Ao meu companheiro **Rondinele**, por seu apoio incondicional, por fazer de meus sonhos seus próprios objetivos e de meus objetivos sua própria luta. Palavras não são suficientes para demonstrar o quão grata sou por me proporcionar o maior presente que eu poderia ganhar em toda minha vida, a nossa filha.

Á minha filha **Alícia**, obrigada pelos 9 meses em que tive o prazer de tê-la em meu ventre, durante o mestrado, sendo minha fonte de força, esperança e luz que me impulsiona a cada dia. Prometo dar-te eternamente o meu amor, ser sua amiga, companheira, a melhor mulher e mãe que eu puder ser para que se orgulhe de mim.

### *UNIFAL/MG;*

**Prof. Dra. Naiana Viana Viola Nícoli**, os seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos do currículo. A sua missão vai muito além da missão de uma professora, você é uma verdadeira orientadora de vida. Obrigada por todos momentos juntas, todos os almoços corridos, sua amizade, carinho, conselhos, consolos, dedicação e tamanha paciência. Você soube despertar minha admiração de modo único, e se

tornou uma gigantesca fonte de inspiração como profissional, mãe, amiga e mulher que és.

**Aos Doutorandos Camila e Leopoldo** pela parceria, incentivo, carinho, paciência e amizade construída no decorrer dessa caminhada. Ambos demonstraram tamanha dedicação e amor que me impulsionaram a ser e dar o meu melhor em cada etapa do mestrado.

Ao **Corpo docente do Programa de Pós Graduação em ciências Odontológicas da UNIFAL-MG** pelos valiosos ensinamentos que engradeceram minha formação profissional e pessoal.

Aos **colegas de turma**, pelas amizades construídas, alegrias compartilhadas, assim como medos e mãos trêmulas que antecederam as apresentações dos seminários. Vocês foram essenciais para conclusão de cada etapa do mestrado.

Aos **Funcionários da pós-graduação da UNIFAL-MG**, obrigado pela convivência agradável, pelo auxílio e acolhimento a todo momento.

***Á UNESP-Araçatuba;***

Ao **Coorientador Prof Dr. João Eduardo Gomes Filho**, por todo apoio e atenção, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

***Ao Procad/CAPES;***

Ao **Programa Nacional de Cooperação Acadêmica** (Procad 2013) e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pelo apoio financeiro e por permitir a parceria entre as instituições UNESP-FOA e UNIFAL-MG o qual foi essencial para a realização deste estudo.

***Á empresa Angelus;***

Pelo fornecimento dos materiais estudados e confiar em nossa dedicação e seriedade para o desenvolvimento desta pesquisa.

*“ Sem sonhos, a vida não tem brilho.*

*Sem metas, os sonhos não tem alicerces.*

*Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.*

*Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos.”*

*Augusto Cury*

## RESUMO

O desenvolvimento de materiais biocompatíveis é de suma importância, assim como a análise do mesmo, com o intuito de determinar as características biológicas em contato com o tecido pulpar. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade e a resposta inflamatória do novo material para pulpotomia - Bio-C Pulpo (Angelus®). No estudo *in vitro* foi realizado o ensaio de MTT em cultura de células fibroblásticas L929 com o intuito de analisar a viabilidade celular. No estudo *in vivo* foram utilizados 30 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*). Os animais foram divididos em 5 períodos de análise – 7, 15, 30, 60 e 90 dias, sendo 6 animais por período, nos quais foram inseridos na região dorsal 3 implantes (tubos de polietileno) contendo os seguintes materiais: (1) Bio-C Pulpo (Angelus®), (2) MTA branco (Angelus®), (3) Controle – tubo vazio. Foi realizada a análise morfométrica das células inflamatórias e a técnica imuno-histoquímica para TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Os resultados mostraram que a viabilidade não foi afetada pelos extratos não diluídos, e nas diluições  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{8}$  o MTA e o Bio-C Pulpo apresentaram maior viabilidade que o Controle. O Bio-C Pulpo apresentou viabilidade celular semelhante ao do MTA, sendo que, em ambos os materiais, a melhor resposta encontrada foi na diluição 1/1 as 24 horas e as 48 horas o BioC obteve melhor resposta que o MTA. Ao avaliar a resposta inflamatória dos materiais nos diferentes períodos, o grupo MTA aos 7, 15 e 30 dias apresentou resposta inflamatória mais intensa que aos 60 e 90 dias ( $p < 0,05$ ). No Bio-C Pulpo, aos 7 e 15 dias verificou-se maior número de células inflamatórias que nos demais períodos ( $p < 0,05$ ). O Controle aos 7 dias apresentou a maior resposta inflamatória ( $p < 0,05$ ). Ao analisar os diferentes materiais no mesmo período, aos 7, 15 e 30 dias Bio-C Pulpo obteve maior resposta inflamatória que os demais grupos ( $p < 0,05$ ). Em 60 dias Bio-C Pulpo e MTA apresentaram maior número de células inflamatórias que Controle ( $p < 0,05$ ). Aos 90 dias todos os materiais possuem resposta inflamatória semelhante ( $p > 0,05$ ). A análise imuno-histoquímica para citocinas pró inflamatórias TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  permite afirmar que ambos os materiais apresentaram resposta inflamatória reduzida aos 7,15 e 30 dias e leve aos 60 e 90 dias e na análise das citocinas no mesmo período os materiais e o controle foram semelhantes estatisticamente. Conclui-se que o material Bio-C Pulpo é um material biocompatível e com baixa citotoxicidade podendo ser utilizado clinicamente.

Palavras-chaves: Pulpotomia, Teste de Materiais, Teste de Citotoxicidade, Biocompatibilidade



## ABSTRACT

Developing biocompatible material is extremely important, as so as analyzing this material aiming to determine biological characteristics with pulpar tissue. This work intended to evaluate cytotoxicity and inflammation response of the new material for pulpotomy - Bio-C Pulpo (Angelus®). During the in vitro study, an MTT test has been done to L929 fibroblast cells culture in order to analyze cellular viability. For the in vivo study, 30 male rats (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) have been used. The animals were divided in 5 different periods - 7, 15, 30, 60 and 90 days, thus 6 animals per period, in which 3 implants (poliethilene pipes) containing the following material: 1) Bio-C Pulpo (Angelus®), (2) white MTA (Angelus®), (3) Control – empty pipe, were inserted into their dorsal region. The inflammatory cells have been analyzed morphometrically as so as the imuno-histochemic technique for TNF $\alpha$  AND IL-1 $\beta$ . The results showed that the viability wasn't affected by non diluted extracts and in 1/2, 1/4 and 1/8 solutions, MTA and Bio-C Pulpo have showed more viability than the Control. Bio-C Pulpo has presented cellular viability similar to MTA's and in both materials the best response was in 1/1 solution in 24 hours and in 48 hours Bio-C reached best response than MTA. By evaluating inflammatory response of the material in different periods, the MTA group presented more intense inflammatory response in 7, 15 and 30 days than in 60 and 90 days ( $p < 0,05$ ). In Bio-C Pulpo case, it has been verified a bigger number of inflammatory cells in 7 and 15 days than the other periods ( $p < 0,05$ ). In 7 days the Control presented the biggest inflammatory cells ( $p < 0,05$ ). When analyzing different material in the same period, Bio-C Pulpo had the biggest inflammatory response ( $p < 0,05$ ). In 60 days, Bio-C Pulpo and MTA presented more inflammatory cells than Control ( $p > 0,05$ ). In 90 days, all the materials showed similar inflammatory response ( $p > 0,05$ ). The TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  pro inflammatory citocinese imuno-histochemic analysis allows to say that both materials presented inflammatory response reduced in 7, 15 and 30 days, moderated response in 60 and 90 days and analyzing citocinese in the same period the materials and the control were similar statistically. This word concludes that Bio-C Pulpo is a biocompatible material with low cytotoxicity and it can be used in clinic cases.

Key-Words: Pulpotomy, Material tests, Cytotoxicity tests, Biocompatibility.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	A: Tubo vazio medindo 10 mm de comprimento x 1,6 mm de diâmetro; B: Tubo preenchido com o material.....	31
Figura 2 -	Divulsão dos tecidos para inserção dos tubo e inserção do tubo com ajuda de pinça clínica.....	32
Figura 3 -	A: Tubos aderidos ao subcutâneo dos animais; B: Tubo removido com tecido circundante.....	32
Figura 4 -	Quantificação das células inflamatórias utilizando o Software Image-Pro Plus 4.5 .....	34
Figura 5 -	Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes com os materiais corados com H&E.....	41
Figura 6 -	Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes com os materiais, as quais foram submetidas à marcação imuno-histoquímica para detecção de TNF $\alpha$ .....	44
Figura 7 -	Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes com os materiais, as quais foram submetidas à marcação imuno-histoquímica para detecção de Interleucina-1 $\beta$ .....	45
Gráfico 1 -	Viabilidade celular dos diferentes materiais, nas diluições em diferentes períodos de análise.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Percentual de células inflamatórias/área $\mu\text{m}^2$ dos materiais em diferentes períodos.....	39
Tabela 2 -	Percentual de células inflamatórias/área $\mu\text{m}^2$ dos materiais no mesmo período.....	40
Tabela 3 -	Percentual imunomarcção para TNF- $\alpha$ dos materiais em diferentes períodos.....	42
Tabela 4 -	Percentual imunomarcção para TNF- $\alpha$ dos materiais no mesmo período.....	43
Tabela 5 -	Percentual imunomarcção para IL-1 $\beta$ dos materiais nos diferentes períodos.....	43
Tabela 6 -	Percentual imunomarcção para IL-1 $\beta$ dos materiais no mesmo período.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Teste de Análise de Variância
BD	Biodentine
$\text{Bi}_2\text{O}_3$	Óxido de Bismuto
$\text{Ca}^{2+}$	Íon cálcio
$\text{CaSO}_4$	Sulfato de Cálcio
$\text{CaSiO}_4$	Silicato de Cálcio
$\text{CaCO}_3$	Carbonato de Cálcio
$\text{CaAl}_2\text{O}_4$	Aluminato de Cálcio
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
FC	Formocresol
HE	Hematoxilina e Eosina
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
IL-1	Interleucina um
IL-1 $\beta$	Interleucina um beta
IL-4	Interleucina quatro
IL-6	Interleucina seis
IL-10	Interleucina dez
IL-17	Interleucina dezesseis
IFN	Interferon
IFN- $\gamma$	Interferon gama
HPRT	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
RANKL	Ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa
RANTES	Regulação da Ativação de Células T Normais Expressas e Secretadas
RT-PCR	

	Reação da Transcriptase Reversa e Reação em Cadeia da
CCL2	Polimerase
CCL5	Ligante 2 da Quimiocina
MCP1	Ligante 5 da Quimiocina
Ph	Monocyte Chemoattractant Protein 1
PGE	Potencial Hidrogênioônico
SF	Prostaglandinas
HC	Sulfato Férrico
MTA	Hidróxido de cálcio
MTT	Agregado Trióxido Mineral
	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5difeniltetrazólio
OCN	Osteocalcina
OPN	Osteopontina
BSP	Sialoproteína Óssea

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1	BIOCOMPATIBILIDADE.....	21
2.2	CITOCINAS PRÓ INFLAMATÓRIAS.....	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>28</b>
3.1	GERAL.....	28
3.2	ESPECÍFICO.....	28
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>29</b>
4.1	MODELO EXPERIMENTAL IN VITRO.....	29
4.1.1	Extrato de cimentos.....	29
4.1.2	Cultura de células.....	29
4.1.3	Teste de viabilidade celular.....	30
4.2	MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> .....	30
4.2.1	Modelo experimental.....	30
4.3	EUTANÁSIA.....	32
4.4	FIXAÇÃO E PREPARO PARA PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	33
4.5	FORMA DE ANÁLISE.....	33
4.5.1	Quantificação de células inflamatórias.....	33
4.5.2	Método imunohistoquímico para detecção de TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
5.1	ANÁLISE <i>IN VITRO</i> .....	37
5.2	ANÁLISE <i>IN VIVO</i> .....	39
5.2.1	Análise morfométrica de células inflamatórias.....	39
5.2.2	Análise morfológica de células inflamatórias.....	39

5.3	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS PRÓ INFLAMATÓRIAS: TNF- $\alpha$ E INTERLEUCINA-1 $\beta$ .....	
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A terapia pulpar conservadora, pulpotomia, consiste na amputação da polpa coronária e a superfície radicular vital remanescente é medicada e clinicamente avaliada a longo prazo, a fim de preservar a vitalidade e função da mesma (HVALE; INDUSHEKAR; SUDHA, 2013).

O sucesso da pulpotomia depende do diagnóstico correto, portanto as condições clínicas da polpa (exposição pulpar por cárie, resistência ao corte, sangramento vermelho vivo, hemostasia inferior a 5 minutos) e radiográficas (ausência de reabsorções patológicas radiculares e lesão periapical), devem ser avaliadas com o intuito de manter a vitalidade da polpa radicular (CAVALCANTI, 2011; NIRANJANI et al., 2015).

A preservação da vitalidade do tecido pulpar e a paralização das alterações patológicas, dependem do selamento da polpa vital exposta com um material biocompatível, protegendo de lesões adicionais e para promover a cicatrização e reparação (LEE et al., 2015). Portanto, os materiais endodônticos devem apresentar propriedades adequadas para que possam ser indicados, tais como: ser resistente à umidade, ser radiopaco, biocompatível, estéril, de fácil inserção e remoção (BOGEN; KUTTLER, 2009).

O Agregado Trióxido Mineral (MTA) se destacou dentre os materiais existentes pois possui a capacidade de manter a vitalidade pulpar e promover o reparo quando colocado em contato com a polpa dental ou com os tecidos perirradiculares (FUNTEAS; WALLACE; FOCHTMAN, 2003; DALTOÉ et al., 2016). Acredita-se que a habilidade do MTA em induzir a formação de barreira de tecido mineralizado ocorra devido a sua biocompatibilidade e excelente capacidade de selamento, fornecendo um ambiente ideal para cicatrização e induzindo a regeneração do tecido pulpar (TORABINEJAD; CHIVIAN, 1999; DOMINGUEZ et al., 2003; KARABUCAK et al., 2005; CHACKO; KURIKOSE, 2006; CAICEDO et al., 2006; MORETTI et al., 2008; PARIROKH; TORABINEJAD, 2010; OLATOSI; SOTE; ORENUGA, 2015; HAGHGOO; AHMADVAND, 2016). O efeito do MTA como agente capeador pode também ser visto



nos canais radiculares, nos quais ocorre uma deposição ativa de tecido mineralizado, com estreitamento ou obliteração do canal radicular (SALAKO et al., 2003; MENEZES et al., 2004; MAROTO et al., 2005; HOLAN; EIDELMAN; FUKS 2005; MORETTI et al., 2008).

Em vários estudos, foram analisados o potencial regenerativo do material MTA (KUKIROSE, 2006; BOGEN et al., 2008; CHACKO; TUNA; OLMEZ, 2008; BJORNDAL et al., 2010), em que afirmaram suas propriedades antimicrobianas, biocompatibilidade com o tecido pulpar, manutenção da integridade com baixa reação inflamatória e indução de células pulpares para liberação de citocinas, que aceleram a formação de barreira de tecido duro (KOH et al., 1997; EIDELMAN et al., 2002; NEAMATOLLAHI et al., 2006; SONMEZ; SARI; ÇETINBAS, 2008).

Apesar do MTA apresentar altas taxas de sucesso clínico e radiográfico, capacidade de manchamento dentário e seu custo elevado são inconvenientes notáveis (PARIROKH; TORABINEJAD, 2010; WALKER et al., 2013; FELMAN, PARASHOS, 2013; YILDIZ; TOSUN, 2014; AL-HAJ ALI; AL-JUNDI; DITTO, 2015; OLATOSI; SOTE; ORENUGA, 2015; MARCIANO; DUARTE; CAMILLERI, 2015; ALSUBAIT; AL-HAIDAR; AL-SHARYAN, 2017).

No intuito de melhorar as características físicas, químicas e biológicas dos materiais utilizados na terapia endodôntica, novos materiais estão em desenvolvimento. Entre eles, o Bio - C Pulpo (Angelus®), que por se tratar de um material novo tem apenas uma pesquisa na literatura por Cosme-Silva (2018). Este material se apresenta na forma de pó e líquido, sendo o pó composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, óxido de zircônia, fluoreto de cálcio, óxido de silício, óxido de ferro e o líquido: água destilada, plastificante e cloreto de cálcio.

Cada material desenvolvido para pulpotomia deve ter suas propriedades biológicas de forma abrangente e independente, testadas *in vitro* e *in vivo* antes do seu uso clínico ilimitado, a fim de minimizar a incidência de efeitos adversos locais e / ou sistêmicos ( GEURTSSEN, 2001; SCHWARZE et al., 2002; SILVA, et al., 2012). Os testes de citotoxicidade *in vitro* são importantes para a compreensão dos riscos biológicos desses materiais (SCELZA et al., 2012; SILVA, et al., 2013; TRICHÊS, et al., 2013; CAMARGO et al., 2014; COTTI et al., 2014). Os estudos histológicos são o padrão ouro para o diagnóstico das alterações teciduais, permitindo a análise do

estado inflamatório real dos tecidos. Já o estudo dos níveis de citocinas pode fornecer uma indicação do grau de inflamação. Há muitos estudos relatando a relação entre citocinas e os materiais amplamente utilizados em tratamento pulpar conservador (ELSALHY; AZIZIEH; RAGHPATHY, 2013).

Portanto, este estudo com o novo material desenvolvido pela empresa Angelus® Bio - C Pulpo, pretende avaliar sua biocompatibilidade como material para pulpotomia de dentes decíduos e permanentes jovens, visto que estas análises são altamente necessárias antecedendo a projeção do material para a utilização clínica.

## 2 REVISÃO LITERATURA

O procedimento de pulpotomia é indicado quando a remoção de cárie resulta na exposição pulpar em um dente com polpa normal ou pulpíte reversível, ou após uma exposição traumática pulpar. O tecido coronário é amputado, e a polpa radicular remanescente é julgada vital quando não há sinais de supuração, purulência, necrose ou hemorragia excessiva, e sem sinais radiográficos de infecção ou reabsorção patológica (AAPD, 2017).

As técnicas de pulpotomia variam de acordo com os materiais capeadores pulpares utilizados, os quais irão provocar no remanescente pulpar: desvitalização, mumificação ou cauterização (formocresol), preservação ou mínima desvitalização (sulfato férrico, glutaraldeído) e indução do reparo ou regeneração (hidróxido de cálcio, agregado de trióxido mineral, proteínas morfogenéticas, biodentine, cimento portland) (NEAMATOLLAHI; TAJIK, 2006; SONMEZ; SARI; CETINBAS, 2008; SHAYEGAN; PETEIN; ABBEELE, 2008; SAKAI et al., 2009; SRINIVASAN; JAYANTHI, 2011; LAURENT; CAMPS; ABOUT, 2012). O uso de substâncias biocompatíveis é uma das maiores preocupações atualmente na odontologia, principalmente quando o material entra em contato direto com o tecido pulpar (LIMA et al., 2011).

Os materiais utilizados na terapia pulpar devem apresentar biocompatibilidade e bioatividade adequadas para promover a regeneração pulpar em dentes permanentes (GANDOLFI et al., 2015). Deste modo, vários materiais são indicados para pulpotomia e estes se diferem na forma de atuação na polpa dental, como na desvitalização utiliza-se formocresol (FC), na preservação o sulfato férrico (SF), na regeneração o hidróxido de cálcio (HC) ou Agregado de Trióxido Mineral (MTA) (RANLY, 1994).

O FC é um dos medicamentos mais estudados para pulpotomia, porém várias preocupações foram levantadas sobre este medicamento devido ao formaldeído em sua composição (CASAS et al., 2005). É comprovado cientificamente que o formaldeído é tóxico para o tecido conjuntivo, por apresentar um potencial carcinogênico e efeitos mutagênicos (FALLAHINEJAD et al., 2008).

Outro material que vem sendo considerado um material de escolha para pulpotomia é o sulfato férrico (SF) devido ao seu baixo custo e altas taxas de sucesso

radiográfico (SONMEZ; SARI; ÇETINBAS, 2008; ERDEN, et al. 2011; YILDIZ; TOSUN, 2014). A reação do SF com sangue resulta em um complexo íon-proteína férrica, que bloqueia mecanicamente os orifícios capilares, favorecendo hemostasia (SONMEZ; SARI; ÇETINBAS, 2008; HAVALE, INDUSHEKAR, SUDHA, 2013). Apesar das taxas de sucesso favoráveis (FUKS, 1997), poucos estudos avaliaram os efeitos microscópicos do SF no tecido pulpar (SHAYEGAN; PETEIN; ABBEELE, 2008). Segundo outro estudo, os autores avaliaram os resultados clínicos, radiográficos e histológicos do complexo dentino-pulpar de molares decíduos após pulpotomia com MTA e 15,5% SF. Concluíram que ambos são eficazes para pulpotomias de dentes decíduos, embora o MTA seja considerado o material de primeira escolha, o SF pode ser uma alternativa adequada quando o custo do tratamento é um problema (JUNQUEIRA, M.A. et al., 2018).

O hidróxido de cálcio (HC) é muito utilizado em endodontia pois possui atividade antimicrobiana, capacidade para limitar a reabsorção radicular e promoção do reparo periapical (DUARTE 2000; MORI, 2007; MORI, 2009; MOHAMMADI, 2011). Entretanto o HC possui várias desvantagens; pode ser utilizado apenas em ambiente seco, as pontes dentinárias produzidas podem ter defeitos, e apresenta dissolução ao longo do tempo (HILTON, 2009).

Outro material disponível é o Biodentine (BD), que consiste em uma forma de silicato tricálcico, contendo no pó silicato tricálcico, óxido de zircônio, óxido de cálcio, carbonato de cálcio, pigmentos e óxido de ferro marrom. O líquido é composto de cloreto de cálcio dihidratado, areo e água purificada (CAMILLERI, 2013). Apresenta propriedades biológicas como resistência ao meio ácido, interação dinâmica com a interface da dentina e do tecido pulpar, estimulando o recrutamento e a diferenciação das células, aumentando a expressão gênica e promovendo a dentinogênese (BOGEN; CHANDLER, 2010; MALKONDU et al., 2014).

Em um estudo, foram avaliados os efeitos dos materiais MTA, HC e BD em células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) *in vitro*. SHED foram cultivadas por 1 - 7 dias em meio condicionado por incubação com MTA, BD ou CH (1 mg / mL) e testado para viabilidade (ensaio MTT) e proliferação (ensaio SRB). Os autores concluíram que os três materiais são biocompatíveis, possuem a capacidade de estimular a proliferação, migração e diferenciação em células-tronco dentárias (ARAÚJO et al., 2018).

O MTA é um pó fino hidrofílico desenvolvido por Mahmoud Torabinejad na Universidade de Loma Linda (USA), composto de silicato de cálcio ( $\text{CaSiO}_4$ ), óxido de bismuto ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ), carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) e aluminato de cálcio ( $\text{CaAl}_2\text{O}_4$ ). Quando misturado com água, formam-se cristais de óxido de cálcio em uma estrutura amorfa que consiste de 33% de cálcio, 49% de fosfato, 2% de carbono, 3% de cloreto e 6% de sílica (CAMILLERI et al., 2005).

O MTA atraiu a atenção de pesquisadores, como um material para pulpotomia, devido à sua excelente capacidade de vedação, biocompatibilidade e maior taxa de sucesso radiográfico que o FC (NOOROLLAHIAN, 2008). Além disso, o MTA é superior ao HC na indução do processo dentinogênico na cobertura pulpar (MIN et al., 2008). Há evidências de que a formação deste tecido ocorre devido aos principais componentes da hidroxiapatita presentes no MTA como o fósforo e cálcio (ACCORINTE et al., 2008). O MTA ou silicato de cálcio formam ponte de dentina mais espessas com menor resposta inflamatória e menor taxa de necrose de tecido pulpar quando comparado a outros materiais disponíveis (BORTOLUZZI et al., 2015; MARGUNATO et al., 2015).

Há diversos materiais disponíveis para utilização clínica, sendo de suma importância a pesquisa *in vitro* e *in vivo* a fim de verificar a biocompatibilidade do mesmo. Para analisar as propriedades biológicas de um novo material, pesquisadores avaliaram um novo material para pulpotomia, o Bio-C Pulpo, através de sua resposta inflamatória e a capacidade de induzir deposição mineral por análises histológicas e imuno-histoquímicas para osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN) e sialoproteína óssea (BSP) do Bio-C Pulpo (Angelus), comparado ao MTA Branco. Utilizaram tubos de polietileno contendo Bio-C Pulpo, MTA branco e tubos vazios foram implantados no tecido conjuntivo dorsal de ratos. Foi realizada a análise histológica com HE e imuno-histoquímica para a detecção de OCN, OPN e BSP. Os autores concluíram que o Bio-C Pulpo é biocompatível e induz a resposta imunológica de marcadores osteogênicos como OCN, OPN e BSP, semelhante ao MTA Branco (COSME-SILVA, et al., 2018).

## 2.1 BIOCOMPATIBILIDADE

A biocompatibilidade é testada no intuito de avaliar a reação de células e tecidos à presença de materiais, sendo que os mais comuns são os testes de citotoxicidade, ensaios de genotoxicidade, implantes ósseos e implantes subcutâneos (HAUMAN; LOVE, 2003).

Um material biocompatível deve apresentar baixa toxicidade sem promover reação inflamatória, a qual deve ser insignificante quando presente (STANFORD, 1980; HAUMAN; LOVE, 2003; MORI, 2009). Um material é considerado biocompatível se a reação inflamatória for reduzida a insignificante no decorrer do tempo (SILVEIRA et al., 2011)

A toxicidade de biomateriais é definida pela capacidade de liberação de substâncias causadoras de danos ou morte celular direta ou indireta, por meio da inibição de vias metabólicas. Portanto, a adoção de métodos que verifiquem possíveis características tóxicas previamente à implantação de biomateriais é imprescindível. A avaliação da citotoxicidade *in vitro* permite obter dados significativos mais facilmente e limitar o número de variáveis experimentais, além de reduzir o período de teste quanto comparado aos testes *in vivo* (ROGERO et al., 2003). O objetivo é mimetizar as condições biológicas para testar biomateriais simulando, *in vitro*, a implantação nos tecidos do organismo (SEHNEM et al., 2012).

Vários testes para avaliar a toxicidade de biomateriais foram padronizados utilizando culturas celulares. Segundo a normativa ISO 10993-5, os protocolos para testes *in vitro* compõem-se por métodos de contato direto, indireto e extrato do material em diferentes diluições. A interação com diferentes culturas de células permite verificar alterações por mecanismos distintos, como incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (SEHNEM et al., 2012; ROGERO et al., 2003).

As técnicas de cultura de células são úteis para avaliar a biocompatibilidade de diferentes materiais, pois oferece uma ferramenta econômica e reproduzível para

melhorar o conhecimento dos possíveis efeitos tóxicos dos materiais (ALHIYASAT et al., 2005; DE MENEZES et al., 2009).

Os ensaios *in vitro* com culturas de células são comumente utilizados para elucidar os mecanismos envolvidos em diferentes respostas biológicas e investigar o comportamento celular em situações específicas. Embora os resultados destes ensaios *in vitro* não possam ser imediatamente extrapolados para condições clínicas em seres humanos, eles são clinicamente relevantes por representarem um modelo apropriado para o rastreamento correto de diferentes propriedades dos materiais dentários, bem como para avaliação de seus potenciais riscos para a saúde (PIRES et al., 2016).

O ensaio colorimétrico do MTT é um modelo para avaliação *in vitro* simples e eficaz para detecção de células vivas ou em crescimento. Para o procedimento da técnica, linhagens de células com densidade populacional pré-determinadas são distribuídas em poços de placas de cultivo e aderência. As células não aderidas, após o período de incubação, são removidas por aspiração e o biomaterial é adicionado em forma de pó ou extrato. Todo o sistema é novamente incubado em estufa por 24 a 72 horas e, posteriormente o ensaio de viabilidade celular pelo MTT é quantificado determinando-se a densidade óptica com auxílio de um leitor de ELISA (ORÉFICE et al., 2006).

A toxicidade do MTA e de outros materiais de aplicação endodôntica, foi estudada utilizando os protocolos da ISO e ensaio de MTT, através da exposição dos extratos das substâncias a fibroblastos da linhagem L-929. Dentre todos agentes avaliados, o MTA foi o material que menos inibiu a viabilidade celular, não exercendo efeito tóxico em fibroblastos da linhagem L-929 (OSORIO et al., 1998).

Um estudo avaliou a citotoxicidade de três materiais de reparo radicular através do cultivo de fibroblastos do ligamento periodontal e as células de fibroblastos foram colocadas em contato com os materiais Biodentine, MTA, Endosequence root e grupo Controle. A viabilidade celular foi determinada usando microscópio de contraste de fase inversa, concluindo-se que o MTA é menos tóxico para os fibroblastos do ligamento periodontal do que os outros materiais (SAMYUKTHA et al., 2014)

Outro estudo avaliou e comparou a toxicidade *in vitro* do formocresol, sulfato férrico e do MTA em cultura de fibroblastos de ligamento periodontal humano. As células do ligamento periodontal foram submetidas a diferentes concentrações dos materiais por 24, 48 e 72 horas. Apenas o MTA apresentou viabilidade celular próxima

ao Controle negativo, os outros materiais testados foram significativamente inferiores em todos os períodos de exposição (AL-HAJ; AL-JUNDI; DITTO, 2015).

Considerando a importância das propriedades biológicas dos materiais que estarão em contato com os tecidos, um estudo avaliou a citotoxicidade do MTA HP em comparação com o MTA branco. Cultivaram-se linhagens celulares de fibroblastos L929 em meio Eagle modificado por Dulbecco (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD). A viabilidade celular foi determinada usando o alamar Blue (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Às 6, 24, 48 e 72 horas após a adição de MTA e alamar Blue, 200 mL do meio foi transferido para uma placa de 96 poços e a densidade ótica foi medida em comprimentos de onda de 570 e 600 nm. Os autores concluíram que o MTA HP mostrou maior viabilidade celular de fibroblastos em comparação com o MTA branco após um período mais longo (CINTRA et al., 2017a).

Vários métodos estão sendo utilizados para avaliar a biocompatibilidade de cimentos endodônticos, incluindo testes de implantação em subcutâneo de ratos, sendo considerado um dos testes mais adequados para determinar os efeitos que os materiais causam no tecido por possibilitar cortes mais finos quando há inclusão em parafina, oferecendo boa definição celular e permitindo uma melhor definição do processo inflamatório (GOMES-FILHO et al., 2001; BUENO et al., 2016).

Pesquisadores avaliaram a reação tecidual promovida de um material experimental (MTAs) no subcutâneo de ratos, através de análises morfológicas e morfométricas. Nos animais de cada grupo (n = 20), tubos de polietileno preenchidos com MTAs, cimento Portland (PC) ou MTA convencional foram implantados no subcutâneo. No grupo de controle, tubos vazios foram implantados. Após 7, 14, 30, e 60 dias, os espécimes foram fixados e incluídos em parafina. Concluindo que o MTAs apresentou resposta tecidual semelhante aos materiais MTA e CP (VIOLA et al, 2012).

Outro estudo avaliou a biocompatibilidade do MTA HP em comparação com o MTA branco, através da avaliação da viabilidade celular às 6, 24, 48 e 72 horas utilizando o ensaio alamar Blue (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Um teste de implante subcutâneo foi realizado com tubos de polietileno contendo um dos materiais ou tubos vazios (controle) utilizando 20 ratos Wistar. Após 7 e 30 dias de implantação, os tubos com tecidos circundantes foram removidos para análise usando HE ou corante von Kossa ou permaneceram sem coloração para observação sob luz



polarizada. Os autores concluíram que o MTA HP mostrou biocompatibilidade e biomineralização semelhante ao MTA-Ang (CINTRA et al., 2017b).

A biocompatibilidade via resposta tecidual inflamatória subcutânea e capacidade de mineralização do novo MTA Flow em relação ao MTA Angelus e ProRoot MTA foi avaliada *in vivo*. Foram utilizados 40 ratos Wistar machos que receberam implantes de tubo de polietileno subcutâneo contendo os materiais de teste e um grupo controle com tubo vazio (n = 10 animais / grupo). Após os dias 7, 15, 30 e 60, os animais foram eutanasiados e os tubos de polietileno foram removidos com os tecidos circundantes. Infiltrado inflamatório e espessura da cápsula fibrosa foram avaliados histologicamente. Segundo os autores, no final do experimento, o novo MTA Flow mostrou biocompatibilidade e induziu a biomineralização em todos os períodos de tempo ( GOMES-FILHO et al., 2019).

## 2.2 CITOCINAS PRÓ INFLAMATÓRIAS

A implantação de todo material em tecidos vivos sempre será seguida por processo inflamatório, visto que rupturas vasculares e teciduais são inevitáveis durante o procedimento cirúrgico. A injúria e, subseqüentemente, a perturbação dos mecanismos homeostáticos irão desencadear a cascata celular responsável pelo processo cicatricial (ANDERSON, 2001).

O processo inflamatório é fundamental para restabelecimento tecidual. É por meio dele que todos os tecidos vivos reagem contra as agressões, incluindo o ato cirúrgico de implantação e interação do organismo com o biomaterial (ORÉFICE et al., 2006). O tipo, intensidade e duração dessa resposta inflamatória dependem das características físicoquímicas de cada biomaterial. O grau de sucesso na implantação de biomateriais pode ser associado, entre outros fatores, à severidade do processo inflamatório desencadeado (SANTOS et al., 2013; NYSKA et al., 2014). Os efeitos locais devem ser avaliados por meio da resposta tecidual causada pela amostra teste em comparação à resposta ocasionada pela amostra controle, cuja biocompatibilidade e aceitabilidade clínica se encontram estabelecidas (ANDERSON, 2001).

A primeira etapa do processo inflamatório é a agressão ao tecido causando a migração de diversas células inflamatórias. A intensidade e progressão do processo inflamatório dependem de fatores locais e sistêmicos, envolvendo eventos celulares

que resultam na produção e liberação de moduladores da inflamação (HRABÁK; BAJOR; CSUKA, 2008; NIBALI et al., 2012).

A interleucina exibe múltiplos efeitos biológicos e atua como um importante mediador da resposta do hospedeiro após o tecido sofrer uma lesão, infecção ou inflamação, aumentando os níveis de proteínas de fase aguda, proteína C-reativas, amilóide sérica e fibrinogênio. A IL-6 provoca a regulação das moléculas de adesão e induz angiogênese aumentando a permeabilidade vascular e edema inflamatório, induzindo a diferenciação e reabsorção óssea através da ação dos osteoclastos, assim como quando está associada com a IL-1  $\beta$  (GEMMELL; SEYMOUR, 1993; NISHIMOTO, 2010).

O contato do tecido com o MTA promove um aumento do pH (12) e liberação de cálcio que induz a produção e a secreção de citocinas pró inflamatórias, tais como a IL -1 e IL-6. Estas citocinas potencializam a ação dos neutrófilos que promovem a ativação da produção de prostaglandinas e a produção de enzimas proteolíticas (MASSI et al., 2011). A alcalinidade do pH e a liberação de cálcio promovem uma reação inflamatória, onde os íons de cálcio reagem com dióxido de carbono presente nos tecidos, originando cristais de calcita que reduzirão o processo inflamatório (HOLLAND et al., 1975).

Em um estudo, os pesquisadores testaram o cimento de aluminossilicato de cálcio (QuickSet) em comparação ao ProRoot MTA e MTA Plus. Citocinas pró-inflamatórias IL -1 $\beta$  e a IL-1 $\alpha$  foram avaliadas aos 30 e 60 dias. Os autores concluíram que não houve diferença estatística entre os 3 cimentos, portanto, as concentrações de IL -1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  foram baixas, sendo o cimento QuickSet foi considerado uma opção viável para pulpotomia por possuir propriedades similares ao MTA (KRAMER et al., 2014).

A participação dos fibroblastos da polpa de dentes decíduos no processo inflamatório, foi avaliada através da avaliação da produção de IL -1 $\beta$  e IL-8 dessas células. Os agentes de pulpotomia foram aplicados como meios condicionados em culturas celulares nos seguintes grupos: (1) controle negativo; (2) controle positivo (Lipopolissacarídeo-LPS); (3) hidróxido de cálcio (pó); (4) MTA; (5) resina adesiva; e (6) formocresol. Concluíram que o hidróxido de cálcio estimulou apenas a produção de IL -1 $\beta$ , a resina adesiva e o formocresol estimularam apenas a produção de IL-8 e

o MTA estimulou ambas as citocinas, portanto diferentes materiais de pulpotomia podem ajudar na resposta imunológica dos fibroblastos (FERREIRA et al., 2009).

A resposta inflamatória induzida por um cimento experimental de silicato tricálcico foi analisada com 20% de óxido de zircônio (TSC) e MTA Plus (MTAP; Avalon Biomed, Bradenton, FL). Avaliou-se tecidos subcutâneos de ratos após serem implantados tubos de polietileno com TSC (n = 20) e MTAP (n = 20) e tubos vazios foram utilizados como controle (grupo controle [GC], n = 20). Após 7, 15, 30 e 60 dias, os tubos com tecido conjuntivo foram removidos, as células inflamatórias e as células imunomarcadas para interleucina 6 (IL-6) foram contadas. Observaram um número aumentado de células inflamatórias e imunomarcadas para IL-6 aos 7 dias, sendo o número de células inflamatórias foi maior para TSC e MTAP do que o GC nesse período. Após 30 e 60 dias, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e observou-se, nas cápsulas adjacentes ao TSC e MTAP, fibroblastos e feixes de fibras de colágeno. O número de células imunomarcadas para IL-6 foi semelhante para os grupos em todos os períodos avaliados. Os autores concluíram que TSC e o MTAP causaram reação subcutânea semelhante em ratos, sugerindo que são biocompatíveis e apresentam respostas imunes semelhantes (ANDRADE et al., 2018).

O TNF- $\alpha$  é um mediador inflamatório proeminente e absolutamente central em iniciar a cascata de reações inflamatórias do sistema imunológico, incluindo indução de produção de citocinas, ativação e expressão de moléculas de adesão e estimulação de proliferação celular. Coordena as respostas iniciais a lesões e, portanto, representa um importante ponto de regulação em doenças inflamatórias (HEHLGANS; PFEFFER, 2005).

O objetivo de outro estudo foi avaliar a expressão de citocinas em resposta ao agregado MTA e selênio em camundongos com perfuração de furca experimental. O primeiro molar superior esquerdo foi aberto e a área da furca foi perfurada e tratada com pós- MTA-Se (grupo experimental). A mesma intervenção cirúrgica foi realizada para o primeiro molar superior direito, que foi tratado com MTA (grupo controle). Quinze ratos foram sacrificados 7, 14 e 21 dias após a perfuração furcal, e amostras de tecido periapical foram coletadas. Os níveis de expressão de mRNA das citocinas TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , HPRT, IL-10, IL-4, RANK, RANKL, IL-1e a IL-17 foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real. No grupo experimental, aos 21 dias após o selamento com MTA- Se, os níveis de mRNA de TNF- $\alpha$  e IL-10

foram supra-regulados em comparação com aqueles no grupo controle ( $p < 0,05$ ). Esta avaliação revelou níveis baixos de expressão de mRNA de IL-1  $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , RANK, RANKL, IL-17A, IL-4 e TGF- $\beta$ , em tempos experimentais longos, tanto no grupo experimental como no controle ( $p > 0,05$ ). Em conclusão, o selamento com MTA-Se favoreceu o aumento da expressão de IL-10 e TNF- $\alpha$ , podendo ser considerado um material com ação anti-inflamatória (ESPALADORI et al., 2018).

Para determinar o efeito das citocinas, o tecido pulpar foi exposto ao MTA, e a expressão de CCL5 / RANTES, CCL2 / MCP1, IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-6 foi avaliada por RT-PCR aos 10 e 20 dias após a exposição. O grupo controle não foi exposto ao MTA. Nesta pesquisa não foi encontrada expressão detectável de CCL2, IL-4 e IL-6 no tecido de nenhum dos grupos, enquanto o TNF- $\alpha$  foi expresso em altos níveis 20 dias após a exposição ( $P < 0,05$ ). Tais achados sugerem que o MTA regula negativamente as citocinas inflamatórias CCL5, IL-1 $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e pode ter um efeito anti-inflamatório (BARBOSA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

O objetivo geral deste estudo foi avaliar as propriedades biológicas *in vitro* e *in vivo* de um novo material experimental para pulpotomia - Bio-C Pulpo (Angelus®).

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

Avaliação da citotoxicidade através da análise da viabilidade celular, em cultura de células fibroblásticas L929, seguida da análise morfológica e morfométrica da resposta inflamatória em tecido subcutâneo de ratos e análise imuno-histoquímica das citocinas pró inflamatórias, Interleucina - 1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , em subcutâneo de ratos.

## 4 METODOLOGIA

Nesta sessão apresentamos a metodologia deste trabalho.

### 4.1 MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

#### 4.1.1 Extrato de cimento

O MTA branco (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S / A, Londrina, PR, Brasil) e Bio-C Pulpo (Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S / A, Londrina, PR, Brasil) foram misturados de acordo com as instruções do fabricante: MTA 1 dose de pó / 1 gota de líquido e Bio-C Pulpo 1 dose de pó / 3 gotas de líquido. Em seguida, discos contendo esses materiais foram preparados sob condições assépticas usando um tubo de polietileno estéril cilíndrico (diâmetro de 5 mm; altura de 3 mm). Os discos foram mantidos em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 ° C por 6 horas para o ajuste completo. Depois de 6 horas, os discos foram removidos do molde e esterilizados por luz ultravioleta por 1 hora. Cada disco foi imerso em 1 mL de meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com 10% soro fetal bovino (FBS) e incubado em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 3 dias. Então os discos foram descartados, e os sobrenadantes (eluato extrato) foram coletados e filtrados através de um filtro estéril de 0,22 µm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). O sobrenadante coletado foi referido como extrato de cimento, que foram realizados de acordo com estudos anteriores (CINTRA et al., 2017b). Foram utilizadas diluições de extratos em série (não diluídos, 1/2, 1/4 e 1/8) neste estudo.

#### 4.1.2 Cultura de células

As células do tipo Fibroblastos L929 foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de FBS, estreptomicina e penicilina sob condições de cultura de células padrão (37 ° C, 100% de umidade, 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>) de acordo com estudos prévios (CINTRA et al., 2017a; CINTRA et al., 2017b).

#### 4.1.3 Teste de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada usando o ensaio de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células do tipo fibroblasto L929 foram semeadas em placas de 96 poços (104 células/poço) e incubadas durante 24 horas em uma atmosfera de ar de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 ° C para conseguir a ligação das células antes de adicionar os extratos. Em seguida, os extratos de cimentos foram adicionados ao meio de cultura (não diluído,  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{8}$ ). As células tipo fibroblastos L929 cultivadas em DMEM sem extrato foram utilizadas como controle. Às 6, 24 e 48 horas, foi adicionada a solução de MTT nas células, e os fibroblastos foram incubados a 37°C durante 4 horas protegidos da luz. Em seguida, a solução de MTT foi descartada e 200 mL de álcool isopropílico adicionado a cada poço. A placa foi mantida sob agitação contínua durante 30 minutos para dissolver os cristais azul escuro. A solução azul foi transferida para outra placa de 96 poços para medir a densidade óptica (OD) a 570 nm em um espectrofotômetro. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados foram analisados estatisticamente pelo Software R-3.4.4. Para a realização da avaliação estatística dos dados utilizamos análise de variância (ANOVA) e pós teste de Bonferroni para comparação das médias, considerando o nível de significância de 5%.

## 4.2 MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

### 4.2.1 Modelo experimental

Este estudo foi submetido e previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas-MG, com protocolo número 692/2015 (Anexo 1).

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), machos, com peso entre 250 a 300 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas identificadas (4 animais por gaiola), em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e consumiram ração sólida e água *ad libitum* durante todo período experimental. Para sedação e anestesia utilizou-se a associação dos fármacos: Ketamina-80mg/kg (Avenco Inc., Fort Dodge, IA) e Xilazina-4mg/kg (Mobay Corp. Shawnee, KS). Deste modo, os animais receberam injeção intraperitoneal contendo 0,04mL/100g de Xilazina e 0,08mL/100g de Ketamina. Uma dosagem suplementar de anestésico foi administrada sempre que necessária para a sedação.

Os animais foram divididos em 5 períodos experimentais – 7, 15, 30, 60 e 90 dias, sendo 6 animais por período, nos quais foram inseridos na região dorsal 3 implantes - tubos de polietileno contendo os seguintes materiais:

1. Material experimental a base de MTA para pulpotomia - Bio-C Pulpo (Angelus®)
2. MTA branco (Angelus®)
3. Controle – tubo vazio

Para realizar a implantação dos materiais no dorso dos ratos, os materiais foram manipulados de acordo com as instruções de seus fabricantes e colocados no interior dos tubos de polietileno (120 tubos com: 10 mm de comprimento x 1,6 mm de diâmetro) (FIGURA 1 A e 1 B), previamente esterilizados em óxido de etileno, mantendo ambas extremidades abertas. Após realizar a tricotomia e assepsia com solução de iodo a 5% na região dorsal do animal, realizamos três incisões utilizando bisturi de lâmina 15 com aproximadamente 2 cm, orientando-se na direção da cabeça para a cauda.



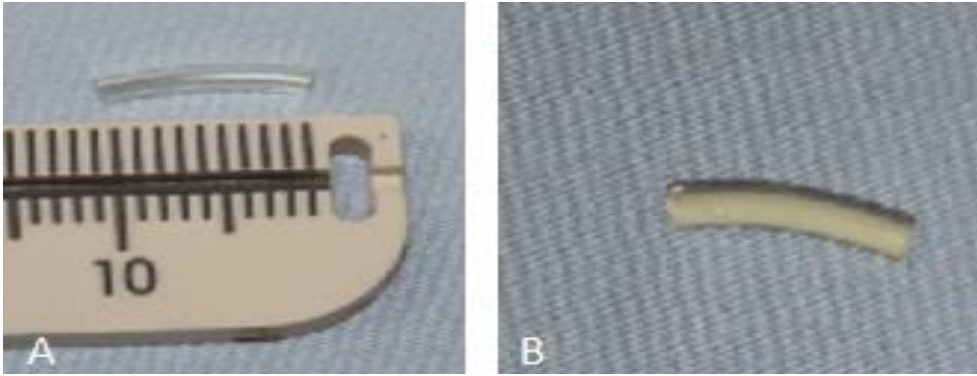


Figura 1- A: Tubo vazio medindo 10 mm de comprimento x 1,6 mm de diâmetro;  
B: Tubo preenchido com o material.  
Fonte: Da autora

O tecido foi divulsionado, criando-se bolsas paralelas às incisões para implantação dos tubos (FIGURA 2A). Cada animal recebeu 3 implantes (FIGURA 2B) e o local da incisão foi suturado com pontos simples utilizando fio de seda (Seda 4-0, ETHICON, São José dos Campos, SP-Brasil).

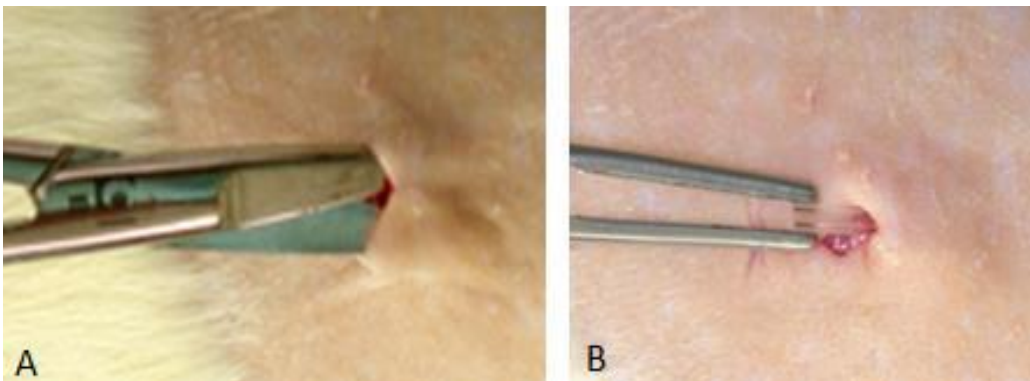


Figura 2- A: Divulsão dos tecidos para inserção dos tubo; B: inserção do tubo com auxílio de pinça clínica.  
Fonte: Da autora

### 4.3 EUTANÁSIA

Os animais foram eutanasiados 7, 15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios através de exposição de CO<sub>2</sub> em câmara apropriada. Após a eutanásia, realizamos a tricotomia através da identificação do tubo por sensação tátil e uma incisão foi realizada no dorso do animal, distante do tubo. Os tecidos foram divulsionados distantes da região do tubo, para que o tecido de interesse não fosse danificado. Após

localizarmos visualmente os tubos, os mesmos foram removidos com lâminas de bisturi e tesouras (FIGURA 3).

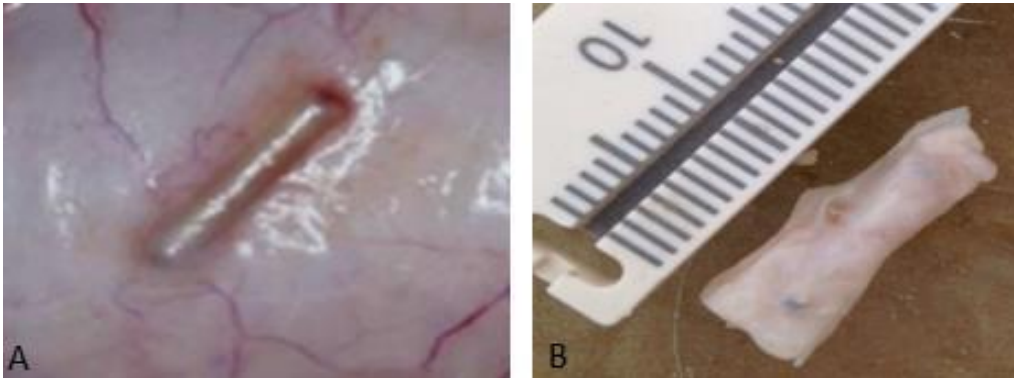


Figura 3- A: Tubos aderidos ao subcutâneo dos animais; B: Tubo removido com tecido circundante.  
Fonte: Da autora

#### 4.4 FIXAÇÃO E PREPARO PARA PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os tecidos foram fixados em formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,2 por 12 horas. Após esta etapa, o tecido foi preparado para inclusão em parafina.

Os blocos foram cortados de forma seriada em micrótomo com navalha de tungstênio na espessura de 3  $\mu$ m. Um total de seis lâminas foram obtidas de cada bloco (quatro cortes por lâmina). Das seis lâminas obtidas, duas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise morfológica e morfométrica e quatro foram utilizadas para análise imuno-histoquímica de TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  (2 lâminas para cada marcador).

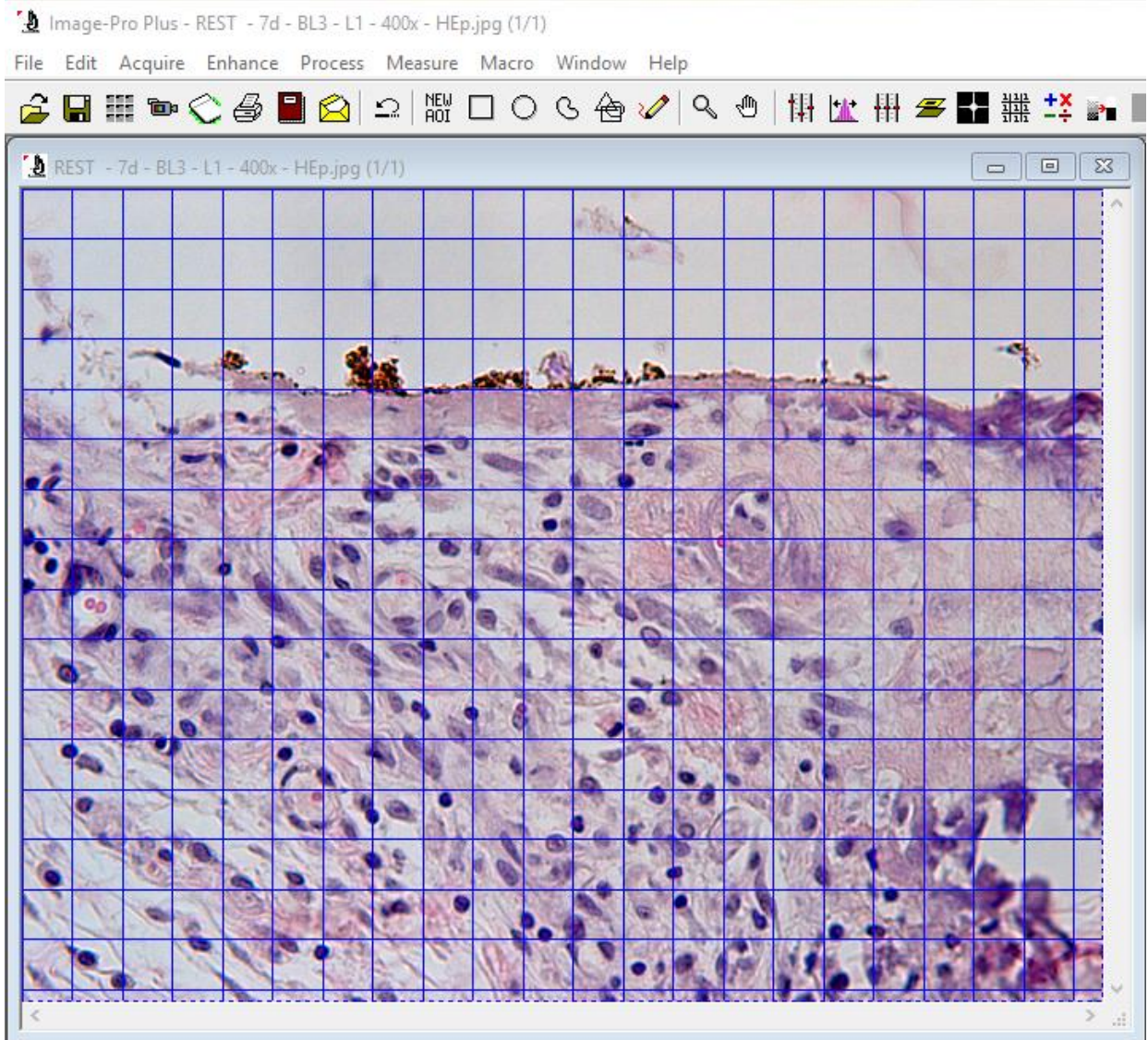
#### 4.5 FORMA DE ANÁLISE

##### 4.5.1 Quantificação de células inflamatórias.

As secções em série de 3 $\mu$ m de espessura foram coradas com HE. Nos cortes corados em H&E foi realizada uma captura da região central adjacente a abertura do tubo, área de contato do tecido com o material experimental (FIGURA 4) em uma

objetiva de 40x de ampliação. A análise morfométrica foi realizada através do Software Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) sendo aplicada uma grade, na qual a área considerada para análise foi de  $336\mu\text{m}^2$  (FIGURA 4). Nesta área foi quantificada o número de células inflamatórias (neutrófilos) através do zoom aplicado, obtendo-se, assim, um valor de células inflamatórias/área total  $\mu\text{m}^2$ . Em seguida foi realizada a análise estatística dos dados. Realizou-se a Análise de Variância, quando foi constatada normalidade foi realizado o Teste Shapiro Wilk ( $p>0.05$ ) e na ausência da normalidade foi realizado teste de Kruskal Wallis ( $p<0.05$ ).

Figura 4 – Quantificação das células inflamatórias pelo software Image-Pro Plus 4.5



Nota: Demonstração de uma das lâminas a ser quantificada pelo avaliador cego.  
Fonte: Da autora

#### 4.5.2 Método imunohistoquímico para detecção de TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$

Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão *Diva Decloaker*® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada *Decloaking Chamber*® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Após lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4, as lâminas histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio, por 1 hora, para o bloqueio da peroxidase endógena. Em prosseguimento, depois de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram tratados com 3% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Lâminas histológicas contendo amostras de todos os grupos experimentais foram submetidas à incubação com um dos seguintes anticorpos primários: rabbit anti-TNF $\alpha$  (orb11495 - Biorbyt, San Francisco, USA) and goat anti- IL-1 $\beta$  - SC 7884- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subseqüentes empregou-se o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotinilado, durante 2 horas, lavadas, e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Depois de três lavagens em PBS-TX se procedeu a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram contracordados com hematoxilina de Harris.

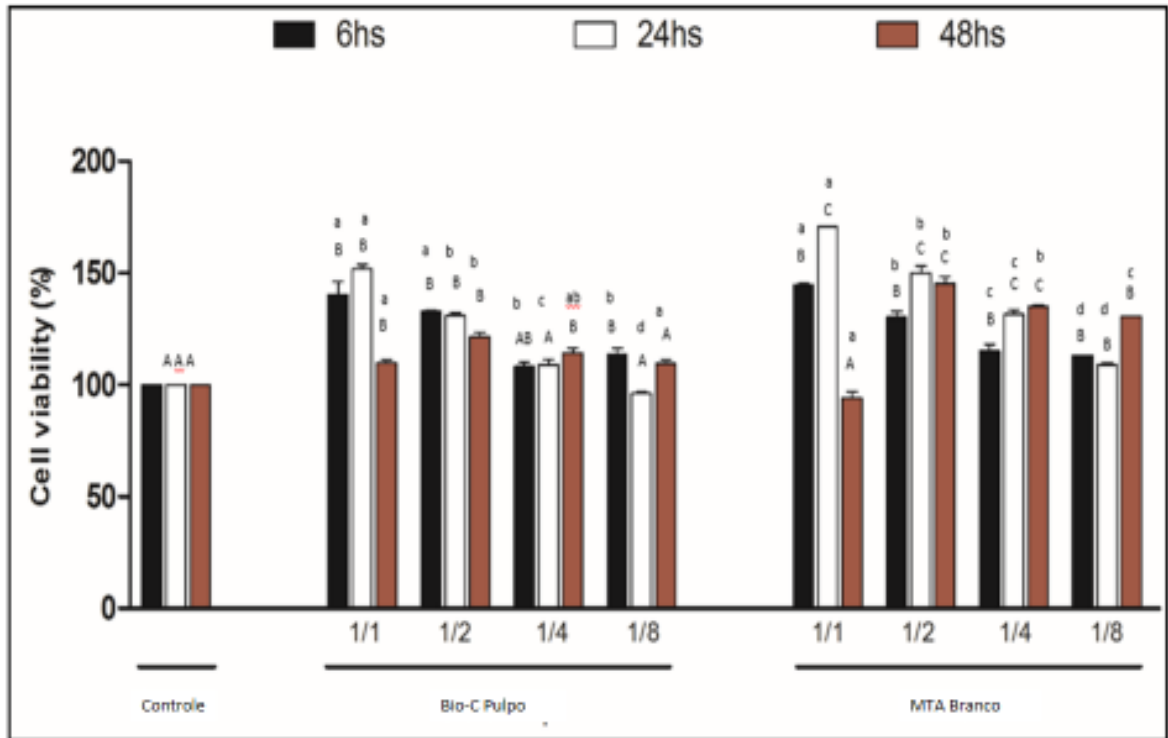
A imunomarcção foi definida como a de cor acastanhada presente predominantemente na matriz extracelular e, em menor concentraçõ, no compartimento citosólico das células. O TNF $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  foram analisados no tecido conjuntivo em contato com o material testado em uma área de 600  $\mu$ m x 800  $\mu$ m e com um aumento de 400x. Uma análise semiquantitativa da marcação imunológica foi realizada e o padrão de marcação foi baseado no estudo de Martins et al. 2016: Escore 0 - sem imunomarcção (ausência total de imunorreatividade); Escore 1 - imunomarcção baixa; Escore 2 - imunomarcção moderada; Escore 3 - imunomarcção alta. Para verificar a diferença entre os materiais (MTA, Bio-C e Controle) e entre os dias (7, 15, 30, 60 e 90), foi realizado o Teste de Kruskal Wallis considerando o nível de significância de 5%. As análises foram realizadas no Software R-versão 3.5.2 (2018).

## 5 RESULTADOS

## 5.1 ANÁLISE *IN VITRO*

Ao comparar o mesmo grupo nas diferentes diluições, a viabilidade celular não foi afetada pelos extratos do Bio-C Pulpo e do MTA branco não diluídos e diluídos quando comparada ao grupo Controle. Somente no extrato não diluído ( $\frac{1}{1}$ ) em 48 horas o Bio-C Pulpo apresentou maior viabilidade que o MTA. Nas demais diluições e períodos de análise a viabilidade celular do Bio-C Pulpo foi igual ou menor a do MTA. Em 6 e 24 horas na diluição de  $\frac{1}{2}$  o Bio-C Pulpo e MTA apresentaram maior viabilidade celular comparado com as de  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{8}$ . As 24 horas houve redução na viabilidade celular em  $\frac{1}{8}$  de MTA e Bio-C Pulpo comparando com  $\frac{1}{4}$  MTA, em 6 e 24 horas o extrato não diluído mostrou maior viabilidade celular comparado com  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{8}$ , em 48 horas mostrou redução significativa em relação as outras diluições. Bio-C Pulpo apresentou maior viabilidade celular em 6 horas de  $\frac{1}{1}$  em relação a  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{8}$  e, em 24 horas, maior comparado com  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$  e  $\frac{1}{8}$ , considerando o nível de significância de 5% (GRÁFICO 1).

Gráfico 1 - Viabilidade celular dos diferentes materiais, nas diluições em diferentes períodos de análise.



Nota: Letras minúsculas iguais indicam não diferença estatística entre os grupos em cada tempo de análise ( $p > 0,05$ ); letras maiúsculas iguais indicam não diferença estatística entre cada grupo nos diferentes tempos de análise ( $p > 0,05$ ).

Fonte: Da autora.

## 5.2 ANÁLISE *IN VIVO*



Os cortes de porções do subcutâneo, contendo os implantes com os materiais testados foram submetidos a análise morfológica e morfométrica para avaliar a resposta inflamatória.

### 5.2.1 Análise morfométrica de células inflamatórias

Ao analisar o mesmo material em diferentes períodos (TABELA 1), verificou-se que o grupo MTA aos 7, 15 e 30 dias apresentou resposta inflamatória mais intensa que aos 60 e 90 dias, sendo que aos 90 dias houve menor resposta inflamatória que os demais períodos de análise ( $p < 0,05$ ). No Bio-C Pulpo, aos 7 e 15 dias verificou-se o maior número de células inflamatórias por área que nos demais períodos, aos 30 dias a resposta inflamatória é maior que aos 60 e 90 dias ( $p < 0,05$ ). O Controle aos 7 dias apresentou a maior resposta inflamatória que aos 15,30, 60 e 90 dias, que não diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Tabela 1 - Percentual de células inflamatórias/área  $\mu\text{m}^2$  dos materiais em diferentes períodos.

Material	Dia					Total
	7 n (%)	15 n (%)	30 n (%)	60 n (%)	90 n (%)	
MTA	0.169(32.4%) <sup>a</sup>	0.172(32.9%) <sup>a</sup>	0.093(17.8%) <sup>a</sup>	0.067(12.8%) <sup>ab</sup>	0.021(4.0%) <sup>b</sup>	<b>0.522(100%)</b>
Bio-C	0.541(42.5%) <sup>a</sup>	0.440(34.6%) <sup>a</sup>	0.176(13.8%) <sup>b</sup>	0.086(6.8%) <sup>c</sup>	0.030(2.3%) <sup>c</sup>	<b>1.273(100%)</b>
Controle	0.215(56.2%) <sup>a</sup>	0.054(14.1%) <sup>b</sup>	0.076(19.9%) <sup>b</sup>	0.029(7.6%) <sup>b</sup>	0.009(2.3%) <sup>b</sup>	<b>0.383(100%)</b>

Nota: Letras iguais indicam não diferença estatística entre os grupos em cada período de análise ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora

Comparando os diferentes materiais no mesmo período de análise (TABELA 2), observamos que o grupo Bio-C Pulpo aos 7 dias e 30 dias obteve maior resposta inflamatória que os demais grupos ( $p < 0,05$ ). Aos 15 dias Bio-C Pulpo possui maior número de células inflamatórias que o MTA ( $p < 0,05$ ). Aos 60 dias foi constatada a semelhança na quantidade de células inflamatórias entre os grupos Bio-C Pulpo e MTA ( $p > 0,05$ ) em que ambos obtiveram maior resposta inflamatória que o Controle

( $p < 0,05$ ). Aos 90 dias todos os materiais possuem resposta inflamatória semelhante ( $p > 0,05$ ). O MTA apresentou resposta inflamatória semelhante ao Controle aos 7, 30 e 90 dias ( $p > 0,05$ ), apresentando maior resposta inflamatória aos 15 e 60 dias ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2 – Percentual de células inflamatórias/área $\mu\text{m}^2$  dos materiais no mesmo período.

Material	Dia				
	7 n (%)	15 n (%)	30 n (%)	60 n (%)	90 n (%)
MTA	0.169(18,3%) <sup>a</sup>	0.172(25,8%) <sup>a</sup>	0.093(27,0%) <sup>a</sup>	0.067(36,8%) <sup>a</sup>	0.021(35,0%) <sup>a</sup>
Bio-C	0.541(58,5%) <sup>b</sup>	0.440(66,1%) <sup>b</sup>	0.176(51,0%) <sup>b</sup>	0.086(47,2%) <sup>a</sup>	0.030(50,0%) <sup>a</sup>
Controle	0.215(23,2%) <sup>a</sup>	0.054(8,1%) <sup>c</sup>	0.076(22,0%) <sup>a</sup>	0.029(16,0%) <sup>b</sup>	0.009(15,0%) <sup>a</sup>
<b>Total</b>	<b>0.925(100%)</b>	<b>0.666(100%)</b>	<b>0.345(100%)</b>	<b>0.182(100%)</b>	<b>0.060(100%)</b>

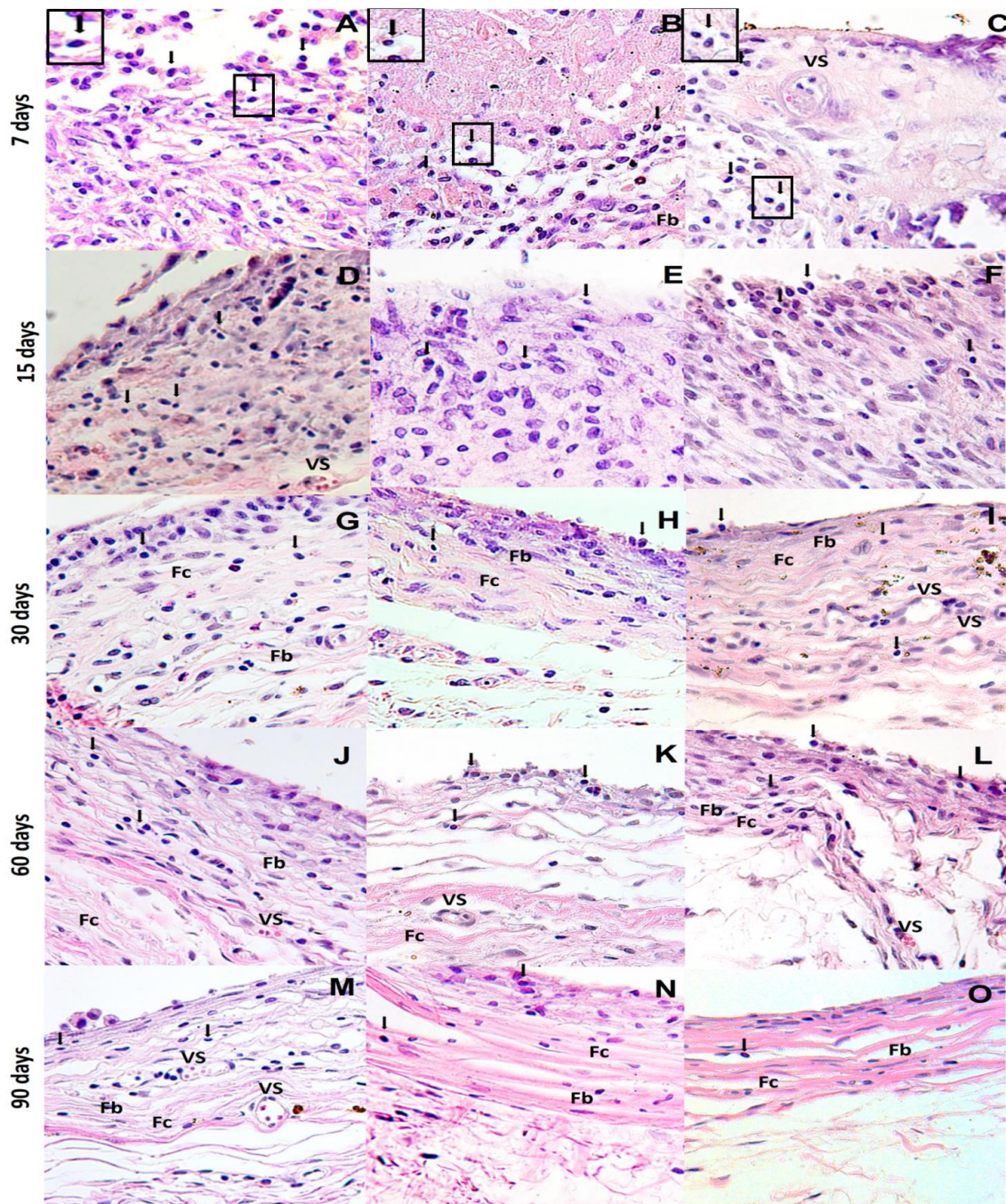
Nota: Letras iguais indicam não diferença estatística entre cada grupo nos diferentes períodos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Do autor.

### 5.2.2 Análise morfológica de células inflamatórias

Ao analisar morfológicamente as lâminas coradas em parafina, foi possível observar aos 7 dias em todos os grupos diversas células inflamatórias, em sua maior parte neutrófilos, e grande quantidade de vasos sanguíneos. Aos 15 dias o tecido conjuntivo ainda apresentava inúmeras células inflamatórias, principalmente neutrófilos na região adjacente ao tubo. Aos 30 dias em todos os grupos observou-se uma aparente redução do processo inflamatório e presença de fibroblastos situados entre feixes de fibras colágenas. Nota-se aos 60 e 90 dias em todos os grupos um tecido conjuntivo organizado exibindo diversos fibroblastos entre os vários feixes de fibras colágenas, além de apresentar vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias dispersas pelo tecido (FIGURA 5).

Figura 5: Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes com os materiais corados com HE



Legenda: Análise do infiltrado inflamatório, nos insets apresentam as células inflamatórias em zoom. **Fig. 3A- 3C** (7 dias) os grupos Controle (A), MTA (B), Bio-C Pulpo (C), apresentam um tecido conjuntivo (TC) adjacente aos tubos implantados, contendo vasos sanguíneos (VS), numerosos neutrófilos (setas) e fibroblastos (Fb). **Fig. 3D-3F** (15 dias) Controle (D), MTA (E), Bio-C (F) observa-se o aumento da quantidade de células inflamatórias (setas). **Fig. 3G – 3I** (30 dias) Controle (G) MTA (H), Bio-C Pulpo (I) os tecidos apresentam fibroblastos (Fb) dispostos entre os feixes de fibras colágenas (Fc), presença de vasos sanguíneos (Vs) e menos células inflamatórias. **Fig. 3J – 3L** (60 dias) Controle (J) MTA (K), Bio-C (L) observa-se a regressão do processo inflamatório, apresenta numerosos fibroblastos (Fb) nos feixes das fibras colágenas (Fc) e vasos sanguíneos (Vs). **Fig. 3M-3O** (90 dias) Controle (M), MTA (N), Bio-C (O) nota-se numerosos fibroblastos (Fb) entre os feixes de fibras colágenas (Fc), vasos sanguíneos (Vs) e raras células inflamatórias (setas).

Fonte: Da autora.

### 5.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS PRÓ INFLAMATÓRIAS: TNF- $\alpha$ E INTERLEUCINA-1 $\beta$ .

Nos cortes dos implantes no subcutâneo submetidos às reações imuno-histoquímicas para detecção de TNF- $\alpha$  (FIGURA 6) e IL-1 $\beta$  (FIGURA 7) em todos os grupos foi possível verificar principalmente a presença de imunorreatividade nos períodos iniciais analisados (7,15 e 30 dias), sendo que, aos 60 e 90 dias, as imunomarcações são escassas e inespecíficas.

Para as reações de TNF- $\alpha$  (TABELA 3), ao analisar os Grupos MTA e Bio-C Pulpo nos diferentes períodos observamos diferença estatística aos 7, 15 e 30 dias em que apresentaram maior imunomarcações que os demais períodos, sendo aos 60 dias houve imunomarcação moderada e aos 90 dias leve. Já o grupo Controle apresentou imunorreatividade maior aos 7 e 15 dias, moderada aos 30 e 60 e leve aos 90 dias.

Nas reações de IL-1 $\beta$  (TABELA 5) o grupo MTA aos 7, 15 e 30 dias houve maior imunomarcação de células, aos 60 dias moderada e aos 90 dias leve. O Bio-C Pulpo e o Grupo Controle apresentarem maior imunorreatividade aos 7 e 15 dias, seguida de moderada marcação aos 30 e 60 dias e leve aos 90 dias.

Ao analisar os diferentes materiais dentro do mesmo período não houve diferença estatística entre as análises realizadas de TNF- $\alpha$  (TABELA 4) e IL-1 $\beta$  (TABELA 6).

Tabela- 3 Percentual imunomarcação para TNF $\alpha$  dos materiais em diferentes períodos.

Material	Dia					Total
	7 n(%)	15 n(%)	30 n(%)	60 n(%)	90 n(%)	
MTA	15 (24.59) <sup>a</sup>	14(22.95) <sup>a</sup>	14(22.95) <sup>a</sup>	10(16.39) <sup>ab</sup>	8(13.11) <sup>b</sup>	<b>61 (100.00)</b>
BioC	15(23.43) <sup>a</sup>	15(23.43) <sup>a</sup>	14(21.88) <sup>a</sup>	12(18.75) <sup>ab</sup>	8(12.50) <sup>b</sup>	<b>64(100.00)</b>
Controle	16(24.62) <sup>a</sup>	15(23.08) <sup>a</sup>	14(21.54) <sup>ab</sup>	12(18.46) <sup>ab</sup>	8(12.31) <sup>b</sup>	<b>65(100.00)</b>

Nota: Letras iguais indicam não diferença estatística do material nos diferentes períodos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora.

Tabela- 4 Percentual imunomarcção para TNF $\alpha$  dos materiais no mesmo período.

Material	Dia				
	7 n(%)	15 n(%)	30 n(%)	60 n(%)	90 n(%)
MTA	15(32.61) <sup>a</sup>	14(31.82) <sup>a</sup>	14(33.33) <sup>a</sup>	10(29.41) <sup>a</sup>	8(33.33) <sup>a</sup>
BioC	15(32.61) <sup>a</sup>	15(34.09) <sup>a</sup>	14(33.33) <sup>a</sup>	12(35.29) <sup>a</sup>	8(33.33) <sup>a</sup>
Controle	16(34.78) <sup>a</sup>	15(34.09) <sup>a</sup>	14(33.33) <sup>a</sup>	12(35.29) <sup>a</sup>	8(33.33) <sup>a</sup>
<b>Total</b>	<b>46(100.00)</b>	<b>44(100.00)</b>	<b>42(100.00)</b>	<b>34(100.00)</b>	<b>24(100.00)</b>

Nota: Letras iguais indicam não diferença estatística entre cada grupo nos diferentes períodos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora.

Tabela- 5 Percentual imunomarcção para IL-1 $\beta$  dos materiais em diferentes períodos.

Material	Dia					Total
	7 n(%)	15 n(%)	30 n(%)	60 n(%)	90 n(%)	
MTA	14(24.14) <sup>a</sup>	14(24.14) <sup>a</sup>	12(20.69) <sup>a</sup>	10(17.24) <sup>ab</sup>	8(13.79) <sup>b</sup>	<b>58(100.00)</b>
BioC	14(26.42) <sup>a</sup>	12(22.64) <sup>a</sup>	12(22.64) <sup>ab</sup>	9(16.98) <sup>ab</sup>	6(11.32) <sup>b</sup>	<b>53(100.00)</b>
Controle	16(28.07) <sup>a</sup>	13(22.81) <sup>a</sup>	12(21.05) <sup>ab</sup>	9(15.79) <sup>ab</sup>	7(12.28) <sup>b</sup>	<b>57(100.00)</b>

Nota: Letras iguais indicam não diferença estatística do material nos diferentes períodos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora.

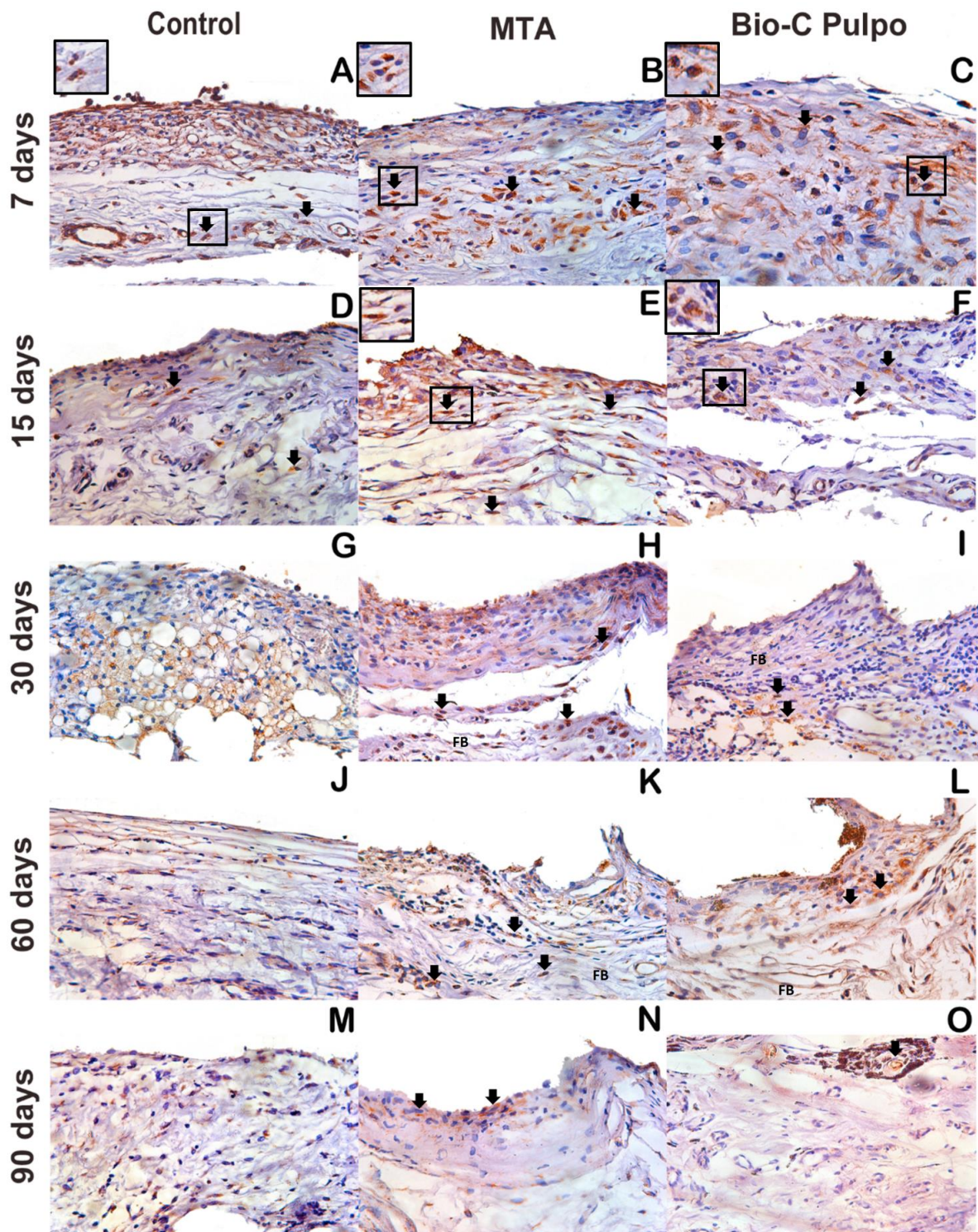
Tabela- 6 Percentual imunomarcção para IL-1 $\beta$  dos materiais no mesmo período.

Material	Dia				
	7 n(%)	15 n(%)	30 n(%)	60 n(%)	90 n(%)
MTA	14(31.82) <sup>a</sup>	14(35.90) <sup>a</sup>	12(33.33) <sup>a</sup>	10(35.71) <sup>a</sup>	8(38.10) <sup>a</sup>
BioC	14(31.82) <sup>a</sup>	12(30.77) <sup>a</sup>	12(33.33) <sup>a</sup>	9(32.14) <sup>a</sup>	6(28.57) <sup>a</sup>
Controle	16(36.36) <sup>a</sup>	13(33.33) <sup>a</sup>	12(33.33) <sup>a</sup>	9(32.14) <sup>a</sup>	7(33.33) <sup>a</sup>
<b>Total</b>	<b>44(100.00)</b>	<b>39(100.00)</b>	<b>36(100.00)</b>	<b>28(100.00)</b>	<b>21(100.00)</b>

Nota: Letras iguais indicam não diferença estatística entre cada grupo nos diferentes períodos ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Da autora.

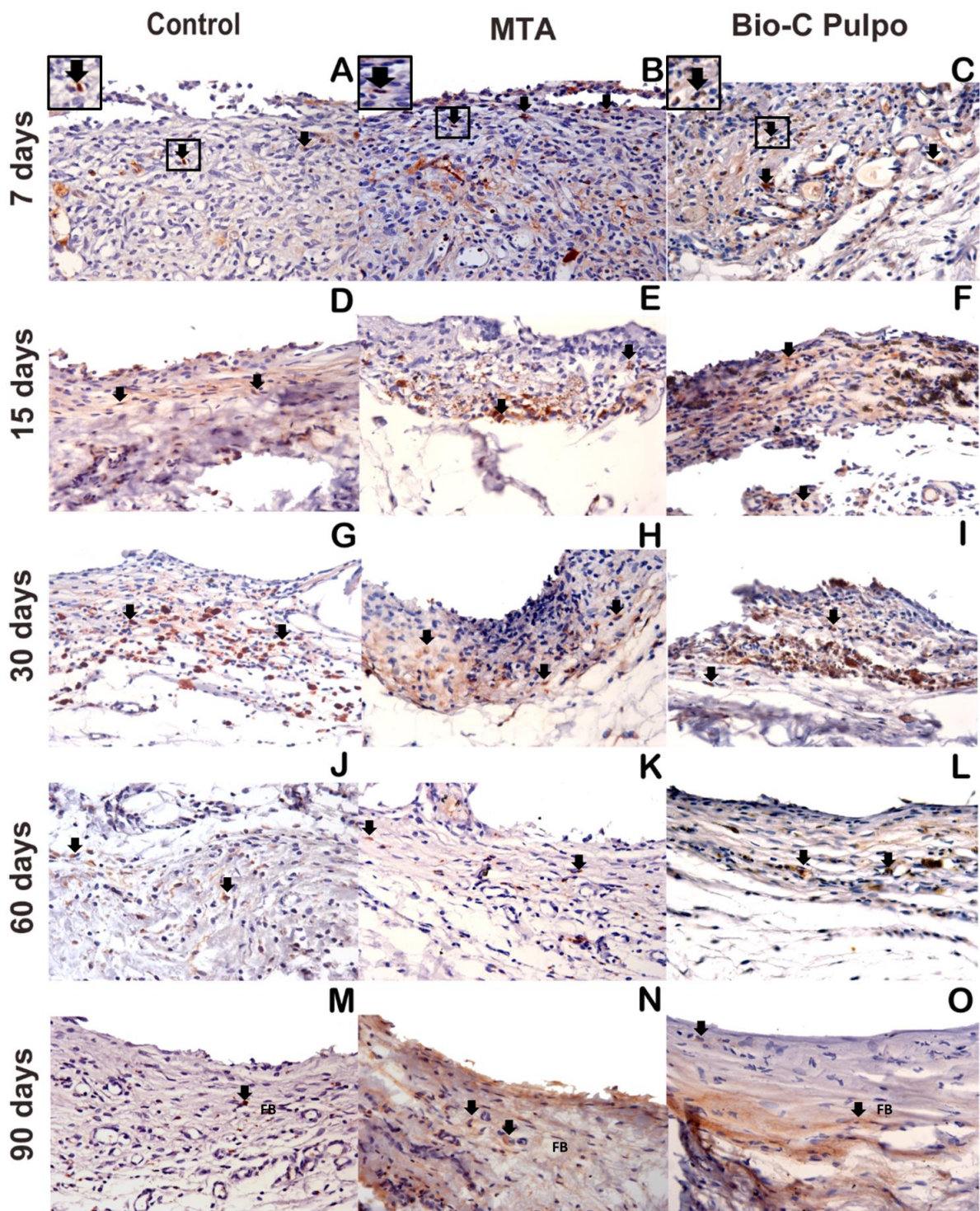
Figura 6 - Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes com os materiais, as quais foram submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de TNF- $\alpha$ .



Legenda: As setas indicam células imunorreativas á citocina. Nos insets A-C demonstram células imunorreativas em zoom. **Fig. 7A- 7C** (7 dias) no Controle (A) MTA (B), Bio-C Pulpo (C) observa-se imunomarcações superior aos demais períodos. **Fig. 7D - 7F** (15 dias) Controle (D), MTA (E), Bio-C Pulpo (F) verifica-se forte imunorreação. **Fig. 7G – 7I** (30 dias) Controle (G) MTA (H), Bio-C Pulpo (I) apresentam moderada imunomarcaçao e células inflamatórias. **Fig. 7J – 7L** (60 dias) Controle (J) MTA (K), Bio-C Pulpo (L) verifica-se moderada imunomarcações, poucas células inflamatórias e presença de fibroblastos (FB). **Fig. 7M-7O** (90 dias) Controle (M), MTA (N), Bio-C Pulpo (O) apresentam raras imunomarcações para TNF- $\alpha$  e numerosa presença de fibroblastos.

Fonte: Da autora

Figura 7 - Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes com os materiais, as quais foram submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de Interleucina-1 $\beta$ .



Legenda: As setas indicam células imunorreativas a citocina e os insets demonstras as mesmas em zoom.

**Fig. 8A- 8C** (7 dias) oControle (A), MTA (B), Bio-C Pulpo (C) exibem células inflamatórias e numerosa imunomarcção (setas). **Fig. 8D - 8F** (15 dias) Controle (D), MTA (E), Bio-C Pulpo (F) apresentam imunorreatividade. **Fig. 8G - 8I** (30 dias Controle (G) MTA (H), Bio-C Pulpo (I) moderada imunomarcção pode ser observada. **Fig. 8J - 8L** (60 dias) Controle (J) MTA (K), Bio-C Pulpo (L), algumas células inflamatórias (setas) estão presentes no tecido conjuntivo. **Fig. 8M-8O** (90 dias) Controle (M), MTA (N), Bio-C Pulpo (O), leve imunorreação e presença de diversos fibroblastos (FB).

Fonte: Da autora.

## 6 DISCUSSÃO

A pulpotomia consiste na amputação da polpa coronária e na preservação do tecido radicular remanescente, portanto, a fim de manter a vitalidade do tecido pulpar e evitar alterações patológicas, a polpa vital exposta deve ser selada com material biocompatível (OHKURA et al., 2017). Atualmente o MTA é considerado o material de capeamento pulpar padrão ouro (TORABINEJAD; PARIROKH; DUMMER, 2018).

O MTA é um material não citotóxico que apresenta excelentes propriedades biológicas, possui a capacidade de induzir a formação de tecido mineralizado, além de promover a dentinogênese reparativa (CINTRA et al., 2017a; OHKURA et al., 2017). Entretanto, o MTA é difícil de manipular e de inserir na cavidade, além de poder causar descoloração dentária (PARIROKH; TORABINEJAD, 2010; MARCIANO et al., 2019).

Deste modo, o Bio-C Pulpo, é um material capeador a base de silicato de cálcio recentemente desenvolvido com o objetivo de superar algumas características indesejáveis dos materiais já existentes no mercado. O silicato de cálcio proporciona ao material um comportamento bioativo e biointerativo, além disso, apresenta excelentes propriedades físicas, químicas e biológicas (SILVA et al., 2013; GANDOLFI et al., 2015).

Portanto, considerando a importância das propriedades biológicas dos materiais que estarão em contato com os tecidos, este estudo avaliou a citotoxicidade e a biocompatibilidade do material com indicação para pulpotomia Bio-C Pulpo em comparação com o MTA-branco, material comumente utilizado durante esse tratamento.

Segundo a American Dental Association (1982) os testes de citotoxicidade com uso de células são métodos aceitos para testar a biocompatibilidade dos materiais dentários. Diferentes tipos de células podem ser utilizados para testes *in vitro*, sendo que estas podem ser provenientes de linhas imortalizadas que oferecem a vantagem de melhorar a reprodutibilidade dos resultados para uma avaliação primária da citotoxicidade. A linhagem de fibroblastos de rato L929 é recomendada pela ISO 10993-5 e é das mais comumente utilizadas em estudos de biocompatibilidade (WENDT; ZIEMIECKI; SPÄNGBERG, 1993; TORABINEJAD et al., 1995; OSORIO et al., 1998; COHEN et al., 2000; SAIDON et al., 2003; HAGLUNG et al., 2003; KOULAZIDOU et al., 2005; CARVALHO, 2005). Portanto, para realizar o teste de



citotoxicidade foi utilizada a linhagem de fibroblastos L929, comparando a viabilidade celular do Bio-C Pulpo com o MTA branco, sendo os resultados encontrados para ambos os materiais semelhantes.

Diante dos resultados favoráveis nos diversos testes em que o MTA vem sendo submetido, sua ampla utilização vem confirmando a sua biocompatibilidade no acompanhamento clínico e radiográfico dos casos tratados (MAIN et al., 2004; MENEZES et al. 2005; MIRANDA; MIRANDA, 2005; BRAMANTE et al., 2006). Portanto o MTA foi o material de eleição para este estudo com o intuito de comparar suas propriedades biológicas com o novo material, Bio-C Pulpo. Segundo o fabricante, O Bio-C Pulpo é um material com indicação para pulpotomia de dentes decíduos e permanentes jovens que contém em sua formulação os componentes semelhantes ao MTA com acréscimo de alguns componentes no pó como óxido de zircônia que age como radiopacificador; fluoreto de cálcio como fonte de flúor; óxido de silício para controle da viscosidade e óxido de ferro como agente de pigmentação. No líquido, além de água destilada, foi inserido plastificante e cloreto de cálcio que age como acelerador de presa.

Um estudo recente em subcutâneo de ratos, avaliou a resposta inflamatória e a capacidade de induzir deposição de estruturas mineralizadas através da análise imuno-histoquímica para osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN) e sialoproteína óssea (BSP) do Bio - C Pulpo comparado com o MTA-Branco. Os autores concluíram que o Bio - C Pulpo é biocompatível e induz a imunomarcagem de marcadores osteogênicos como: OCN, OPN e BSP (COSME-SILVA et al., 2018). Os achados morfológicos deste atual estudo, suportados pela análise quantitativa das células inflamatórias, corroboram com estes autores, indicando que o uso de Bio-C Pulpo é biocompatível.

Diante dos resultados pode-se observar que aos 7 e 15 dias os materiais causaram uma reação inflamatória mais intensa que nos demais períodos. Tais achados são consistentes com investigações anteriores em que os autores afirmam que as reações nos primeiros períodos de análise são consequência da inflamação causada pelo contato dos materiais nos tecidos ou pelo trauma cirúrgico produzidos durante a colocação dos tubos de polietileno (BUENO, et al., 2016; ECONOMIDES et al., 1995; GOMES, et al, 2004). Além disso, a partir dos 30 dias, observou-se a

redução evidente de células inflamatórias e presença de diversos fibroblastos entre os feixes de fibras colágenas, caracterizando a presença de um típico tecido conjuntivo em organização, sendo consistente com os achados de Cosme-Silva (2018). Caso a inflamação persistisse deveria ser atribuída a toxicidade dos materiais e não mais ao ato traumático da implantação dos tubos (HAMMAD, HAMADA, AL-OMARI, 2011). Estes resultados suportam a idéia de que os tubos de polietileno constituem um modelo apropriado para a realização de implantes a fim de investigar as propriedades biológicas de materiais no subcutâneo (TORNECK, 1996; HOOLAND, et al. 1999; YALTIRIK, et al. 2004).

Quando em contato com o tecido o MTA promove um aumento do pH (12) e liberação de cálcio que induz a produção e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-1 e interleucina-6. Estas citocinas potencializam a ação dos neutrófilos, promovem a ativação da produção de prostaglandinas e a produção de enzimas proteolíticas (MASSI et al., 2011). Por isso, o pH alcalino e a liberação de cálcio promovem uma reação inflamatória. No entanto, os íons de cálcio reagem com dióxido de carbono presente nos tecidos dando origem a cristais de calcita e então há a redução no processo inflamatório (HOLLAND et al., 1999).

A progressão da inflamação está diretamente associada com o grau de resposta do hospedeiro a substâncias liberadas pelos materiais. Dependendo da composição dos cimentos, todos os materiais podem induzir algumas vias de sinalização que estimulam a expressão de citocinas pró inflamatórias e prostaglandinas que estão envolvidos na iniciação do processo inflamatório (FRANZ et al., 2011). Células imunes produzem e liberam citocinas e fatores de crescimento, os quais exercem um papel ativo na instalação e progressão do processo inflamatório (DA FONSECA et al., 2016; FRANZ et al., 2011). Especificamente para esta investigação, analisou-se a liberação das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

O TNF-  $\alpha$  desempenha um papel importante na resposta ao dano tecidual ou infecção promovendo inflamação, recrutamento de linfócitos e monócitos para locais de infecção, estimulando as células endoteliais a expressar moléculas de adesão, induzindo quimiocinas e ativação dos neutrófilos (PFEFFER, 2003). Através do TNF-  $\alpha$ , ocorre a dilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, provocando o extravasamento de leucócitos do sangue para a área infectada (STASHENKO et al., 1987). O TNF- $\alpha$  é produzido por macrófagos. Além de produzir

várias citocinas, esses macrófagos têm três funções principais: apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação (HAHN & LIEWEHR, 2007). Os resultados desta pesquisa mostraram forte imunomarcacão nos períodos iniciais de 7, 15 e 30 dias para TNF- $\alpha$  nos grupos BioC-Pulpo e MTA e moderada a leve nos períodos subsequentes, em que foi verificado raras imuno-marcações para a citocina em questão e numerosa presença de fibroblastos.

A IL-1 $\beta$  é uma das mais importantes interleucinas a ser observada no estudo do processo inflamatório do tecido pulpar, já que é responsável por uma variedade de ações de mediação das respostas inflamatórias do hospedeiro, e é produzida e liberada por diferentes células, sendo relatada na literatura sua ação no tecido pulpar (D'SOUZA et al., 1989; HOSOYA; MATSUSHIMA, 1997; LERTCHIRAKARN et al., 1998; LU et al., 2002). A imunomarcacão para esta citocina nesta pesquisa foi semelhante entre os grupos BioC-Pulpo e Controle em todos os períodos de análise, apresentando maior imunorreatividade aos 7 e 15 dias, moderada aos 30 e 60 dias e leve aos 90 dias. O grupo MTA apenas aos 30 dias apresentou imunomarcacão maior que os outros grupos, corroborando com outros estudos (KOH, et al. 1997; KOH, et al. 1998). Apesar de ser notada nos períodos iniciais maior imunomarcacão para a interleucina, ao comparar os materiais com o grupo Controle não houveram diferenças, sugerindo um efeito benéfico não agressor dos materiais estudados corroborando com outro estudo sobre o MTA (SILVA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* desta pesquisa, indicam que o material estudado, Bio-C Pulpo, possui baixa citotoxicidade e boa resposta inflamatória. Portanto, este material é biocompatível e pode ser utilizado em pulpotomia de dentes decíduos e permanentes jovens.

## REFERÊNCIAS

- ACCORINTE, M.L. et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. **J. Endod**, v. 34, n. 1, p. 1-6, Jan. 2008.
- AL-HAJ ALI, S.N.; AL-JUNDI, S.H.; DITTO, D.J. *In vitro* toxicity of formocresol, ferric sulphate, and grey MTA on human periodontal ligament fibroblasts. **Eur. Arch. Pediatr. Dent**, v. 16, n. 1, p. 51-55, Feb. 2015.
- ALHIYASAT, AS; DARMANI, H; MILHEM, MM. Cytotoxicity evaluation of dental resin composites and their flowable derivatives. **Clin Oral Investig**, v.9, n.1, p.21- 25, 2005.
- ALSUBAIT, A.; AL-HAIDAR, S.; AL-SHARYAN, N. A Comparison of the Discoloration Potential for EndoSequence Bioceramic Root Repair Material Fast Set Putty and ProRoot MTA in Human Teeth: An In Vitro Study. **J. Esthet Restor Dent**, v. 29, n.1, p. 59-67, Feb. 2017.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, AAPD, Reference Manual 2016-2017. Guideline on Pulp Therapy for Primary and Immature Permanent Teeth. **Pediatr. Dent**, v. 38, n. 6, p. 280-288, 2017.
- ANDERSON, J.M. Biological responses to materials. **Annu Ver Mater Res**, v. 31, p.81-110, 2001.
- ANDRADE, A.S. et al. Tissue Response and Immunoexpression of Interleukin 6 Promoted by Tricalcium Silicate-based Repair Materials after Subcutaneous Implantation in Rats. **J Endod**, v.44, n.3, p.458-463, Mar. 2018.
- ARAÚJO, L. B., et al. Effects of mineral trioxide aggregate, Biodentine™ and calcium hydroxide on viability, proliferation, migration and differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **J. of Applied Oral Science**, v.26, n.0, 2018.
- BARBOSA, S.M.J.; VIEIRA, L.Q; SOBRINHO, A.P. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod**, v.105, n.5, p. 70-76, May. 2008.

BJØRNDAL, L. et al. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries--characteristics of lesions and pulpal reactions. **Quintessence Int**, v. 32, n. 9, p. 717-736, 2001.

BOGEN, G.; KIM J.S.; BAKLAND L.K. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an observational study. **J of American Dental Association**, v.139, p.305–315, 2008.

BOGEN, G.; KUTTLER, S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. **J Endod**, v.35, p.777–90, 2009.

BOGEN, G.; CHANDLER, N. Pulp preservation in immature permanent teeth. **Endod Topics**, v.23, n.1, p.131-152, 2010.

BORTOLUZZI, E.A. et al. Cytotoxicity and osteogenic potential of silicate calcium cements as potential protective materials for pulpal revascularization. **Dent Mater**, v.31, p.1510–1522, 2015.

BRAMANTE, C. M. et al. Tratamiento de una perforación radicular con trióxido mineral agregado CPM. **Rev Asoc Odontol Argent**, v. 94, n. 1, p. 23-6, Mar. 2006.

BUENO, C. R. et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of bioceramic, epoxy, and calcium hydroxide-based sealers. **Braz Oral Res**, v. 30, n. 1, Jun. 2016.

CAICEDO, R. et al. Clinical, radiographic and histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulpotomies of primary teeth. **Aust. Dent. J**, v. 51, n. 4, p. 297-305, Dec. 2006.

CAMARGO, C.H. et al. Setting time affects *in vitro* biological properties of root canal sealers. **J Endod**, v.40, p.530-533, 2014.

CAMILLERI, J. et al. The constitution of mineral trioxide aggregate. **Dent. Mater**, v. 21, n. 4, p. 297-303, 2005.

\_\_\_\_\_. Investigation of Biodentine™ as dentine replacement material. **J Dent**, v.41, n.7, p.600-610, 2013.

CARVALHO, M. A. A. **Citotoxicidade de três cimentos obturadores do sistema de canais radiculares sobre cultura de células L929**. 86f. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

CASAS, M.J. et al. Do we still need formocresol in pediatric dentistry. **J. Can. Dent. Assoc**, v. 71, n. 10, p. 749-751, 2005.

CAVALCANTI, B.N. et al. Pulp capping materials exert an effect on the secretion of IL-1 $\beta$  and IL-8 by migrating human neutrophils. **Braz Oral Res**, v.25, p.13-18, 2011.

CHACKO, V.; KURIKOSE, S. Human pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA): a histologic study. **J. Clin. Pediatr. Dent**, v. 30, n. 3, p. 203-209, 2006.

CINTRA, L.T.A. et al. Cytotoxicity, Biocompatibility, and Biomineralization of the New High Plasticity MTA Material. **J Endod**, v.43, n.5, p.774-778. May, 2017a.

\_\_\_\_\_. Evaluation of the cytotoxicity and biocompatibility of new resin epoxy-based endodontic sealer containing calcium hydroxide. **J Endod**, v.43, n.12, p.2088-2092. Dec. 2017b.

COHEN, B. I. et al. An in vitro study of the citotoxicity of two root canal sealers. **J Endod**, v. 26, n. 4, p. 228-9, Apr. 2000.

COSME-SILVA, L. et al. Biocompatibility and immunohistochemical evaluation of a new calcium silicate-based cement, Bio-C Pulpo. **Int Endod J**, Dec. 2018.

COTTI, E. et al. Cytotoxicity evaluation of a new resin-based hybrid root canal sealer: an *in vitro* study. **J Endod**, v.40, p.124-128, 2014.

D'SOUZA, R.; BROWN, J.R.; NEWLAND, J.R.; LEVY, B.M.; LACHMAN, L.B. Detection and characterization of interleukin-1 in human dental pulps. **Archives of Oral Biology**, v. 34, n. 5, p. 307-313, 1989.

DA FONSECA, T. S. et al. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. **Int Endod J**, v, 49, n. 2, p. 145-153, Feb. 2016.

DALTOÉ, M. O. et al. Expression of Mineralization Markers during Pulp Response to Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. **J Endod**, v. 42, n. 4, p. 596-603, Apr. 2016.

DE MENEZES, JV; et al. *In vitro* toxicity of MTA compared with other primary teeth pulpotomy agents. **J Clin Pediatr Dent**, v.33, n.3, p.217–21, 2009.

DOMINGUEZ, M. S. et al. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp – therapy materials. **J. Endod**, v. 29, n. 5, p. 324-333, May. 2003.

DUARTE, M.A. et al. Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers. **J Endod**, v.26, p.389-390, 2000.

ECONOMIDES, N. et al. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. **J Endod**, v. 21, n. 3, p. 122-127, Mar. 1995.

EIDELMAN, E.; HOLAN G.; FUKS A. Mineral trioxide aggregate vs formocresol in pulpotomized primary molars: a preliminary report. **Pediatr Dent**, v. 23, n. 1, p. 15-18, Jan-Feb. 2002.

ELSALHY, M.; AZIZIEH, F.; RAGHPATHY, R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. **Int Endod J**, v.46, p.573-580, 2013.

ERDEN, A.P. et al. Success rates of mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol pulpotomies: a 24-month study. **Pediatr Dent**, v.33, p.165-170, 2011.

FALLAHINEJAD, G. et al. Comparison of pulpotomy with formocresol and MTA in primary molars: a systematic review and meta- analysis. **Iran Endod J**, v.3, n.3 , p. 45–49, 2008.



ESPALADORI et al. Perfuração experimental de furca tratada com agregado trióxido mineral e selênio: resposta imune. **Braz Oral Res**, v.32, p.103. 2018.

FELMAN, D.; PARASHOS, P. Coronal tooth discoloration and white mineral trioxide aggregate. **J. Endod**, v. 39, n. 4, p. 484-487. Apr. 2013.

FERREIRA, D.C. et al. Cytokine production from human primary teeth pulp fibroblasts stimulated by different pulpotomy agents. **J Dent Child**, v.76, n.3, p. 194-198. Dec. 2009.

FRANZ, S. et al. Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials**, v. 32, n. 28, p. 6692-6709, Oct. 2011.

FUKS, A.B. Ferric sulfate versus dilute formocresol in pulpotomized primary molars: long-term follow up. **Pediatr Dent**, v.19, p.327-330, 1997.

FUNTEAS, U. R.; WALLACE, J. A.; FOCHTMAN, E. W. A comparative analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Aust Endod J**, v. 29, n. 1, p. 43-44, Apr. 2003.

GANDOLFI, M.G. et al. Calcium silicate/calcium phosphate biphasic cements for vital pulp therapy: chemical-physical properties and human pulp cells response. **Clin Oral Investig**, v.19, p.2075–2089, 2015.

GEMMELL, E.; SEYMOUR, G.J. Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor-production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. **J Periodontal Res**, v. 28, n. 2, p.122-129, 1993.

GEURTSEN, W. Biocompatibility of root canal filling materials. **Aust Endod J**, v.27, p.12-21, 2001.

GOMES-FILHO, J.E. et al. Glycol methacrylate: an alternative method for embedding subcutaneous implants. **J Endod**, v. 27, n. 4, p. 266-268, 2001.

\_\_\_\_\_. Biocompatibility and biomineralization assessment of mineral trioxide aggregate flow. **Clin Oral Investig**, v.23, n.1, p. 169-177, Jan. 2019.

GOMES, B.P. et al. Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol Immunol.**, v.19, n.2, p.71-76, Apr. 2004.

HAGHGOO, R.; AHMADVAND, M. Evaluation of pulpal response of deciduous teeth after direct pulp capping with bioactive glass and mineral trioxide aggregate. **Contemp. Clin. Dent**, v. 7, n. 3, p. 332-335, Aug. 2016.

HAGLUNG, R. et al. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod**, v. 95, n. 6, p. 739-45, Jun. 2003.

HAHN, C.L.; LIEWEHR, F.R. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. **J Endod**, v.33, n.7, p.773-781, Jul. 2007.

HAMMAD, H. M.; HAMADAH, M. A.; AL-OMARI, W. M. Histological evaluation of rat tissue response to GMTA, Retroplast, and Geristore retrograde filling materials. **Aus Endod J**, v. 37, n. 1, p. 18-25, Apr. 2011.

HAUMAN, C.H.; LOVE, R.M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. **Int Endod J**, v.36, p.147-160, 2003.

HAVALE, R.; INDUSHEKAR, K.; SUDHA, P. Clinical and radiographic evaluation of pulpotomies in primary molars with formocresol, glutaraldehyde and ferric sulphate. **Oral Health Dent Manag**, v.12, p.24-31 2013.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunology**, v.115, p.1–20, 2005.

HILTON, T.J. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. **Oper Dent**, v.34, p.615–25, 2009.

HOLAN, G.; EIDELMAN, E.; FUKS, A. B. Long-term evaluation of pulpotomy in primary molars using mineral trioxide aggregate or formocresol. **Pediatr. Dent**, v. 27, n. 2, p. 129-135, Mar- Apr. 2005.

HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide. **J Endod**, v.25, p.161- 166, 1999.

HOLLAND, R.; DE SOUZA, V. Conservative treatment of dental pulp. **Ars. Curandi. Odontol**, v. 2, n.2, p. 3-4, 1975.

HOSOYA, S.; MATSUSHIMA, K. Stimulation of interleukin-1 $\beta$  production of human dental pulp cells by porphyromonas endodontalis lipopolysaccharide. **J Endod**, v. 23, n. 1, p. 39-42, 1997.

HRABÁK, A.; BAJOR, T.; CSUKA, I. The effect of various inflammatory agents on the phagocytosis and cytokine profile of mouse and rat macrophages. **Inflamm Res**, v. 57, n. 2, p. 75-83, 2008.

JUNQUEIRA, M. A. et al. Clinical, Radiographic and Histological Evaluation of Primary Teeth Pulpotomy Using MTA And Ferric Sulfate. **Braz Dent J**. v.29, n.2, p.159–165, 2018.

KARABUCAK, B. et al. Vital pulp therapy with mineral trioxide aggregate. **Dent. Traumatol**, v. 21, n. 4, p. 240-243, Aug. 2005.

KOH, E.T. et al. Cellular response to mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 24, p. 543-7, 1998.

KOH, E.T. et al. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. **J Biomed Mater Res**, v.37, p. 432-439, 1997.

KOULAOUZIDOU, E. A. et al. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three fibroblastic cell lines. **J Endod**, v. 31, n. 1, p. 44-46, Jan. 2005.

KRAMER, P.R. et al. Capping a Pulpotomy with Calcium Aluminosilicate Cement: Comparison to Mineral Trioxide Aggregates. **J Endod**, v. 40, n. 9, p. 1429-1434, 2014.

LIMA, R. V. et al. Pulp repair after pulpotomy using different pulp capping agents: a comparative histologic analysis. **Pediatr. Dent**, v. 33, n. 1, p. 14-18, Jan.- Feb. 2011.

LAURENT, P.; CAMPS, J.; ABOUT, I. Biodentine(TM) induces TGF- $\beta$ 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. **Int. Endod. J**, v. 45, n. 5, p. 438-448, May. 2012.

LEE, H. e.t al. Comparative Study of Pulpal Responses to Pulpotomy with ProRoot MTA, RetroMTA, and TheraCal in Dogs' Teeth. **J Endod**, v. 41, n. 8, p. 1317-1324, 2015.

LERTCHIRAKARN, V.; BIRNER, R.; MESSER, H.H. Effects of interleukin-1 beta on human pulpal fibroblast proliferation and collagen synthesis. **J Endod**, v. 24, n. 6, p. 409-413, 1998.

LIN, P. Y. et al. Primary molar pulpotomy: a systematic review and network metaanalysis. **J. Dent**, v. 42, n. 9, p. 1060-1077, 2014.

LU, H.X. et al. Effect of IL-1ra on human dental pulp cells and pulpal inflammation. **Int Endod J**, v. 35, n. 10, p. 807-811, 2002.

MAIN, C. et al. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a longterm study. **J. Endod**, v. 30, n. 2, p. 80-3, Feb. 2004.

MALKONDU, Ö.; KARAPINAR, K.M.; KAZAZOGLU, E.A. Review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. **Biomed Res Int**, v. 204, p. 160951, 2014.

MARCIANO, M. A.; DUARTE, M. A.; CAMILLERI, J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. **Clin Oral Investig**, v. 19, n. 9, p. 2201-2209. Dec. 2015.

MARCIANO, M.A. et al. Physical, chemical, and biological properties of white MTA with additions of AlF<sub>3</sub>. **Clin Oral Investig**, v. 23, n. 1, p. 33-34, 2019.

MARGUNATO, S. et al. In vitro evaluation of ProRoot MTA, Biodentine, and MM-MTA on human alveolar bone marrow stem cells in terms of biocompatibility and mineralization. **J Endod**, v. 41, p.1646–52, 2015.

MAROTO, M. et al. Dentin bridge formation after mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomies in primary teeth. **Am. J. Dent**, v. 18, n. 3, p. 151-154, Jun. 2005.

MARTINS, C. M. et al. Hypertension Undermines Mineralization-inducing Capacity of and Tissue Response to Mineral Trioxide Aggregate Endodontic Cement. **J. Endod**, v. 42, n. 4, p. 604-609, Apr. 2016.

MASSI, S. et al. PH, calcium ion release and setting time of an experimental MTA-based root canal sealer. **J. Endod**, v. 37, n. 6, p. 844-846, 2011.

MENEZES, R. et al. MTA repair of a supracrestal perforation: a case report. **J Endod**, v. 31, n. 3, p. 212-214, Mar. 2005.

MENEZES, R. et al. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and white portland cements as wound dressings. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod**, v. 98, n. 3, p. 376-379, Sep. 2004.

MIN, K.S. et al. Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. **J Endod**, v. 34, p.666–670. 2008.

MIRANDA, R. B.; MIRANDA, M. B. Tratamento de perfuração radicular – Relato de um caso clínico. **JBE**, v. 5, n. 21/22, p. 422-425, Dec. 2005.

MOHAMMADI, Z; DUMMER, PM. Properties and applications of calcium hydroxide in Endodontics and dental traumatology. **Int Endod J**, v. 44, p. 697-730, 2011.

MORETTI, A. B. S. et al. The effectiveness of MTA, calcium hydroxide and formocresol for pulpotomies in primary teeth. **Int. Endod. J**, v. 41, n. 7, p. 547-555, Jul. 2008.

MORI, G.G. et al. Morphometric and microscopic evaluation of the effect of a solution of alendronate as an intracanal therapeutic agent in rat teeth submitted to late reimplantation. **Dent Traumatol**, v. 23, p. 218-221, 2007.

\_\_\_\_\_. Biocompatibility evaluation of alendronate paste in rat's subcutaneous tissue. **Dent Traumatol**, v. 25, p. 209-212, 2009.

NEAMATOLLAHI, H.; TAJIK, A. Comparison of clinical and radiographic success rates of pulpotomy in primary molars using Formocresol, Ferric Sulfate and Mineral Trioxide Aggregate (MTA). **J. Dentistry**, v. 3, n. 1, p. 6-14, 2006.

NIBALI, L. et al. Interleukin-6 in oral diseases: a review. **Oral Dis**, v. 18, n. 3, p. 236-246, 2012.

NIRANJANI, K. et al. Clinical evaluation of success of primary teeth pulpotomy using mineral trioxide aggregate(®), laser and biodentine (TM)- an in vivo study. **J. Clin. Diagn. Res**, v. 9, n. 4, p. 35-37, 2015.

NISHIMOTO, N. Interleukin-6 as a therapeutic target in candidate inflammatory diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 87, p. 483–7, 2010.

NOOROLLAHIAN, H. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp medicaments for pulpotomies in primary molars. **Br Dent J**, v. 204, v. 11, p. 20, 2008.

NYSKA, A. et al. Histopathology of biodegradable polymers: challenges in interpretation and the use of a novel compact MRI for biocompatibility. **Polym Adv Technol**, v. 24, p. 461-467, 2014.

OHKURA, N. et al. Effects of pulpotomy using mineral trioxide aggregate on prostaglandin transporter and receptors in rat molars. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 6870, 2017.

OLATOSI, O. O.; SOTE, E. O.; ORENUGA O. O. Effect of mineral trioxide aggregate and formocresol pulpotomy on vital primary teeth: a clinical and radiographic study. **Niger J Clin Pract**, v. 18. n. 2, p. 292-296. Mar-Apr. 2015.

ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, M.S. Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: **Cultura Médica**, p. 538, 2006.

OSORIO, R. M. et al. Cytotoxicity of endodontic materials. **J. Endod**, v. 24, n. 2, p. 91-6, Feb. 1998.

OHKURA, N. et al. Effects of pulpotomy using mineral trioxide aggregate on prostaglandin transporter and receptors in rat molars. **Sci Rep**, v. 31, n. 1, p. 6870, 2017.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. **J. Endod**, v. 36, n. 1, p. 16-27, Jan. 2010.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M.; DUMMER, P.M.H. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part I: vital pulp therapy. **Int Endod J**, v. 51, n. 2, p. 177-205, 2018.

PFEFFER, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 14, p. 185-91, 2003.

PIRES, ALR; BIERHALZ, ACK; MORAES AM. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Quim. Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2016.

RANLY, D.M. Pulpotomy therapy in primary teeth: new modalities for old rationales. **Pediatr Dent**, v. 16, p. 403-409, 1994.

ROGERO, S.O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SAMYUKTHA, V. et al. Cytotoxicity evaluation of root repair materials in human-cultured periodontal ligament fibroblasts. **J Conserv Dent**, v. 17, p. 467-470, 2014.

SRINIVASAN, D.; JAYANTHI, M. Comparative evaluation of formocresol and mineral trioxide aggregate as pulpotomy agents in deciduous teeth. **Indian. J. Dent. Res**, v. 22, n. 3; p. 385-390, May- Jun. 2011.

SAIDON, J. et al. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 95, n. 4, p. 483-9, Apr. 2003.

SAKAI, V. T. et al. Pulpotomy of human primary molars with MTA and Portland cement: a randomised controlled trial. **Brit. Dent. J**, v. 207, n. 3, p. 128-129, 2009.

SALAKO, N. et al. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate and formocresol as pulpotomy agents in rat molars. **Dent. Traumatol**, v. 19, n. 6, p. 314-320, Dec. 2003.

SANTOS, G.G.; MARINHO, S.M.O.C.; MIGUEL, F.B. Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso. **Rev Ciênc Méd Biol**, v. 12, n. 3, p. 367-373, 2013.

SCELZA, M.Z. et al. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. **Int Endod J**, v. 45, p. 12-18, 2012.

SCHWARZE, T. et al. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. **J Endod**, v. 28, p. 784-786, 2002.

SEHNEM, D.P. et al. Métodos alternativos para avaliação da citotoxicidade de biomateriais. **Rev Rede de Cuidados em Saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-12, 2012.

SHAYEGAN, A.; PETEIN, M.; ABBEELE, A.V. Beta-tricalcium phosphate, white mineral trioxide aggregate, white Portland cement, ferric sulfate, and formocresol used as pulpotomy agents in primary pig teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 105, p. 536-542, 2008.

SILVA, E.J. et al. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. **Int Endod J**, v. 45, p. 49-56, 2012.



\_\_\_\_\_. Evaluation of cytotoxicity and physicochemical properties of calcium silicate-based endodontic sealer MTA Fillapex. **J Endod**, v. 39, p. 274-277, 2013.

SILVA, M. J. B.; VIEIRA, L. Q.; SOBRINHO, A. P. R. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 105, n. 5, p.70–76, 2008.

SILVA, E.J. et al. Response of mice connective tissue to three different endodontic materials. **Microsc Res Tech**, v. 76, n. 3, p. 311-315, 2013.

SILVEIRA, C.M. et al. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. **Braz Dent J**, v. 22, p. 21-27, 2011.

SONMEZ, D.; SARI, S.; ÇETINBAS, T. A comparison of four pulpotomy techniques in primary molars: a long-term follow-up. **J Endod**, v. 34, p. 950-955, 2008.

STANFORD, J.W. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. London: Fédération **Dent Int**, v. 36, n. 1, p. 45-48. Mar. 1980.

STASHENKO, P. et al. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. **J Immunol**, v. 138, p. 1464-1468, 1987.

TORABINEJAD, M.; PARIROKH, M.; DUMMER, P.M.H. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview - part II: other clinical applications and complications. **Int J Endod**, v. 51, n. 3, p. 284-317, Mar. 2018.

TORABINEJAD, M. et al. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **J Endod**, v. 21, n. 7, p. 349-53, 1995.

TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **J. Endod**, v. 25, n. 3, p. 197-205, Mar. 1999.

TORNECK, C.D. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 21, p. 379–87, 1996.

TRICHÊS, K.M. et al. Connective tissue reaction of rats to a new zinc-oxide-eugenol endodontic sealer. **Microsc Res Tech**, v. 76, p. 1292-1296, 2013.

TUNA, D.; OLMEZ, A. Clinical long-term evaluation of MTA as a direct pulp capping material in primary teeth. **Int Endod J**, v. 41, p. 273–278, 2008.

VIOLA, N.V. et al. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 7, p. 1773–81, out., 2012.

WALKER, L. A. et al. Current Trends in Pulp Therapy: A Survey Analyzing Pulpotomy Techniques Taught in Pediatric Dental Residency Programs. **J. Dent. Child**, v. 80, n. 1, p. 31-35, Jan. - Apr. 2013.

WENDT, S. L.; ZIEMIECKI, T. L.; SPÄNGBERG, L. S. Indirect cytotoxic evaluation of a dental materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 75, p. 353-6, 1993.

YALTIRIK, M. et al. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. **J Endod**, v. 30, p. 95-99, 2004.

YILDIZ, E.; TOSUN, G. Evaluation of formocresol, calcium hydroxide, ferric sulfate, and MTA primary molar pulpotomies. **Eur. J. Dent.**, v. 8, n. 2, p. 234-240, Apr. 2014.

**ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisas**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 692/2015, sob responsabilidade de Naiana Viana Viola Nicoli, referente ao projeto "Avaliação da resposta tecidual e mineralização de dois materiais experimentais a base de MTA para terapia endodôntica em dentes deciduos", está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFAL).

Alfenas, 11 de janeiro de 2016.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Estela Regina de Oliveira

Presidente CEUA/UNIFAL