

HEBERTT GONZAGA DOS SANTOS CHAVES

**RESPOSTA PULPAR EM MOLARES DE CAMUNDONGOS APÓS
CAPEAMENTO PULPAR DIRETO COM NOVAS FORMULAÇÕES
DE BIOVIDROS**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2022**

Hebertt Gonzaga dos Santos Chaves

**RESPOSTA PULPAR EM MOLARES DE CAMUNDONGOS APÓS
CAPEAMENTO PULPAR DIRETO COM NOVAS FORMULAÇÕES
DE BIOVIDROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Endodontia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Francine Benetti

Belo Horizonte
2022

Ficha Catalográfica

C512r Chaves, Hebertt Gonzaga dos Santos.
2022 Resposta pulpar em molares de camundongos após
T capeamento pulpar direto com novas formulações de biovidros
/ Hebertt Gonzaga dos Santos Chaves. -- 2022.

65 f. : il.

Orientadora: Francine Benetti.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Capeamento da polpa dentária. 2. Polpa dentária. 3. Pulpotomia. 4. Materiais biocompatíveis. 5. Hidróxido de cálcio. I. Benetti, Francine. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

RESPOSTA PULPAR EM MOLARES DE CAMUNDONGOS APÓS CAPEAMENTO PULPAR DIRETO COM NOVAS
FORMULAÇÕES DE BIOVIDROS

HEBERTT GONZAGA DOS SANTOS CHAVES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração ENDODONTIA.

Aprovada em 15 de julho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Francine Benetti - Orientador
UFMG

Prof(a). Soraia Macari
UFMG

Prof(a). Paulo Carvalho Tobias Duarte
Universidade Estadual de Feira de Santana



Documento assinado eletronicamente por **Francine Benetti, Professora do Magistério Superior**, em 15/07/2022, às 11:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Soraia Macari, Professora do Magistério Superior**, em 15/07/2022, às 11:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Documento assinado eletronicamente por **Paulo Carvalho Tobias Duarte, Usuário Externo**, em



15/07/2022, às 11:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1598930** e o código CRC **A04F1DEE**.

Dedico este trabalho aos meus pais. A presença e amor incondicional de vocês na minha vida é a prova de que os esforços que vocês fizeram pela minha educação não foram em vão e valeram a pena.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ter colocado numa família que sempre me deu tudo que precisei para chegar até aqui, com força, saúde, sabedoria e humildade, por ter me colocado na direção certa, mesmo que difícil, me permitindo vivenciar momentos surpreendentes, dignos de sua glória e orgulho para a minha família e entes queridos. Mãe e pai, Ana Divina dos Santos Chaves e José Gonzaga de Oliveira Chaves, a vossa dedicação de anos das vossas vidas para trabalhar, investir e incentivar a minha educação me encorajam a evoluir sempre, obrigado por se disporem a dar todo suporte, na construção da minha carreira. Esse trabalho também é de vocês. Meus irmãos Harlan Gonzaga dos Santos Chaves e Jackson Gonzaga dos Santos Chaves, vossa disponibilidade para me escutar e me animar em momentos difíceis e para me parabenizar em cada progresso compartilhado, serviu de impulso e inspiração. À minha tia Lorencia da Conceição que por tantas vezes se fez presente nessa trajetória.

Aos queridos afilhados (e sobrinhos) Felipe Augusto de Souza Chaves e Ana Luiza Machado Chaves e sobrinhos Arthur Henrique de Souza Chaves, Vinícius Rosa de Farias Chaves e Victor Hugo de Farias Chaves, obrigado por tantas vezes terem entendido a minha ausência em momentos cruciais na formação de vocês. Meu amor por vocês é incondicional.

Muito obrigado aos membros do Programa de Pós-graduação em Odontologia pelo suporte, em especial aos professores do programa em Endodontia da UFMG. Seus ensinamentos foram muitos e certamente contribuíram positivamente para a minha formação. Ao secretário Victor Felipe, pelo pronto atendimento sempre que solicitado.

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Francine Benetti, pela contribuição para o meu desenvolvimento como pessoa e como pesquisador, possibilitando a realização desta conquista. Este trabalho não seria possível sem sua ajuda, cuja dedicação e conhecimento foram fundamentais para a conclusão deste projeto. Minha eterna gratidão.

Meu agradecimento especial ao Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita por sempre ter se colocado à disposição, por toda ajuda e empenho para a realização desse trabalho. O senhor tem um lugar reservado em minhas orações.

Ao grupo de pesquisa ao qual faço parte, obrigado pelo companheirismo e por ouvirem minhas alegrias, tristezas, angústias, frustrações e um pouco de Endodontia, em especial à minha primeira “orientada” Barbara Figueiredo que com sua dedicação, força de vontade e proatividade impulsionaram o desenvolvimento desse trabalho. Obrigado por deixar eu fazer parte da sua formação e obrigado por deixar eu aprender com você o verdadeiro papel de “orientador”. Saiba que você tem um futuro lindo pela frente.

Aos meus colegas de turma, em especial a Carolina Andrade Maia e Isabella Figueiredo Assis Macedo com quem convivi intensamente durante os últimos dois anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer não só como pessoa, mas também como profissional.

Aos amigos que fiz na UFMG, em especial aos alunos que conheci nas monitorias de Endodontia e que se tornaram verdadeiros amigos, transformando essa caminhada mais leve, em especial, Luísa Duarte, Raphael Magalhaes e Vinícius Magalhães e aos amigos da pós-graduação ao qual tive a honra de compartilhar tantos momentos, em especial a Gabriele Andrade Maia.

Às amigas da especialização em Endodontia, Bruna Vieira, Fabiola Andrade, Franciele Moreira, Joice Nascimento, Lara Mariane e Natália Dias que mais que amigas, se tornaram irmãs. Foi lindo aprender e compartilhar com vocês cada momento vivido nesta etapa. Vocês sempre estarão em minha memória, como uma parte tão linda e especial que vivi na construção da minha carreira. Serei eternamente grato pelos maravilhosos momentos que passamos juntos. Jamais esquecerei dos choros, das angústias, dos desabafos e dos infundáveis risos seja no grupo do WhatsApp, seja pelos corredores da clí. Eu amo vocês!

Às amigas de vida Camila Possal e Mariana Arêdes palavras me faltam neste momento para descrever todo o sentimento que tenho ao escrever esse agradecimento. Vocês que me acompanham desde a Graduação, se fizeram presente na especialização e agora em mais um momento tão importante da minha carreira, o mestrado em Endodontia. Vocês mais que ninguém sabem como isso é importante para mim. Obrigado, por terem me escutado, me aconselhado e por terem deixado eu compartilhar cada conquista e aprendizado com vocês. Serei eternamente grato por isso. Eu amo vocês minhas queridas.

Às queridas Cristina Teixeira, Fátima Nunes, Naiani Tartarine, Nalanda Cristina e Thais Almeida, obrigado pela ajuda, pelo incentivo e motivação nas horas de desespero. Vocês fizeram parte de um momento muito importante da construção da minha formação. Meu eterno agradecimento. Saibam que jamais irei esquecer o apoio que vocês me deram.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante todo o meu mestrado.

“Aprender é a única coisa de que a mente não se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

Quando a polpa dentária é exposta ao meio bucal, cria-se uma ferida no tecido pulpar, cujo tratamento deve ser imediatamente instituído através da limpeza e desinfecção da área, seguida da cobertura pulpar com um material bioativo. O objetivo desse trabalho foi avaliar a resposta do tecido pulpar frente aos biovidros F18 e F18 dopado com cobalto (F18Co) em comparação ao hidróxido de cálcio (HC), após capeamento pulpar direto. Para tanto, 48 camundongos Balb/C machos (8 semanas) tiveram os primeiros molares superiores direito e esquerdo divididos aleatoriamente em grupos: F18, F18Co, HC e controle. Os molares dos grupos experimentais tiveram as polpas coronárias expostas e receberam os materiais, e foram selados com ionômero de vidro. O grupo controle não recebeu nenhuma intervenção. Após 7 e 15 dias, os animais (n = 6) foram eutanasiados e os espécimes processados para avaliação do processo inflamatório e da desorganização tecidual, por meio da coloração de Hematoxilina-Eosina, e da expressão de citocinas, por meio da técnica de PCR em tempo real, onde as interleucinas (IL)-1 β , IL-6 e IL-10 foram avaliadas. Aos 7 e 15 dias, houve inflamação leve a moderada no grupo HC, e principalmente moderada a severa em F18 e F18Co, porém, a diferença significativa foi observada apenas entre o grupo controle, sem inflamação, e os grupos F18 e F18Co (p < 0,05). Em relação à desorganização tecidual, aos 7 dias, observou-se desorganização moderada para o HC e para a maioria dos espécimes F18 e F18Co; aos 15 dias, houve desorganização leve a moderada para HC e moderada a severa para F18 e F18Co; a diferença foi observada entre os grupos controle e F18 e F18Co (p < 0,05), em ambos os períodos de análise. Observou-se a formação de dentina terciária apenas aos 15 dias em todos os grupos experimentais, entretanto, mais intensamente no grupo do HC. Aos 7 dias, não houve diferença significativa entre os grupos quanto às expressões de IL-6 e IL-10. Em relação à expressão de IL-1 β , foi possível observar um aumento significativo nos grupos HC e F18. Já aos 15 dias, houve maior expressão de IL-6 nos grupos F18 e F18Co em relação ao controle; aumento significativo na expressão de IL-1 β foi observado neste período nos grupos F18 e F18Co em relação aos grupos HC e controle. Não houve expressão significativa da IL-10 nos diferentes grupos. Conclui-se que os biovidros F18 e F18Co podem ter um desempenho inferior ao HC quando utilizados em contato direto com o tecido pulpar.

Palavras-chave: Biovidros. Capeamento pulpar direto. Polpa dentária. Pulpotomia. Terapia vital pulpar.

ABSTRACT

Pulp Response in mice molars after direct pulp capping with new bioglasses formulations.

When the dental pulp is exposed to the oral environment, a wound is created in the pulp tissue, whose treatment must be immediately instituted by cleaning and disinfecting the area, followed by pulp coverage with a bioactive material. The objective of this study was to evaluate the response of pulp tissue to bioglasses F18 and F18 doped with cobalt (F18Co) compared to calcium hydroxide (CH), after direct pulp capping. For that, 48 male Balb/C mice (8 weeks old) had their right and left maxillary first molars randomly divided into groups: F18, F18Co, CH and control. The molars of the experimental groups had the coronal pulps exposed and received the materials, and were sealed with glass ionomer. The control group received no intervention. After 7 and 15 days, the animals ($n = 6$) were euthanized and the specimens processed to evaluate the inflammatory process and tissue disorganization, using Hematoxylin-Eosin staining, and cytokine expression, using the PCR technique in real time, where interleukins (IL)-1 β , IL-6 and IL-10 were evaluated. At 7 and 15 days, there was mild to moderate inflammation in the CH group, and mainly moderate to severe in F18 and F18Co, however, a significant difference was observed only between the control group, without inflammation, and the F18 and F18Co groups ($P < 0.05$). Regarding tissue disorganization, at 7 days, moderate disorganization was observed for the CH and for most specimens F18 and F18Co; at 15 days, there was mild to moderate disorganization for CH and moderate to severe for F18 and F18Co; the difference was observed between the control and F18 and F18Co groups ($P < 0.05$), in both analysis periods. Tertiary dentin formation was observed only at 15 days in all experimental groups, however, more intensely in the CH group. At 7 days, there was no significant difference between the groups in terms of IL-6 and IL-10 expressions. Regarding the expression of IL-1 β , was possible to observe a significant increase in the CH and F18 groups. At 15 days, there was greater expression of IL-6 in groups F18 and F18Co compared to control; a significant increase in IL-1 β expression was observed in this period in the F18 and F18Co groups compared to the CH and control groups. There was no significant expression of IL-10 in the different groups. It is concluded that the bioglasses F18 and F18Co may have a lower performance than CH when used in direct contact with the pulp tissue.

Keywords: Bioglasses. Pulp capping. Dental pulp capping. Pulpotomy. Pulp vital therapy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o material avaliado.....	22
Tabela 2 – Escores atribuídos à intensidade da inflamação e desorganização tecidual	27
Tabela 3 – Sequência dos iniciadores de citocinas.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaO	Óxido de Cálcio
CEBIO	Centro de Bioterismo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CT	Ciclo de limite (do inglês <i>Threshold cycle</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
F18	Biovidro F18
F18Co	Biovidro F18 Dopado com Cobalto
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
HC	Hidróxido de Cálcio
HE	Hematoxilina-Eosina
IL	Interleucina
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-1 β	Interleucina-1beta
IL-6	Interleucina-6
Na ₂ O	Óxido de Sódio
P ₂ O ₅	Pentóxido de Fósforo
pH	Potencial Hidrogeniônico
qPCR	PCR Quantitativo em Tempo Real
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SiO ₂	Óxido de Silício
TPV	Terapia Pulpar Vital
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
β -ME	β -mercaptoetanol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Especificos	20
3. METODOLOGIA EXPANDIDA	21
3.1 Preparo das pastas experimentais	21
3.2 Estudo experimental em modelo animal.....	21
3.2.1 Animais	21
3.2.2 Fármacos empregados	21
3.2.2 Divisão dos grupos.....	22
3.2.2 Procedimentos operatórios	22
3.2.2 Eutanásia e procedimento laboratorial	25
3.2.2 Forma de análise dos resultados	27
3.2.2 Avaliação histológica.....	27
3.2.2 Identificação das citocinas	28
3.3 Análise estatística	31
4. ARTIGO	32
5. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54
Anexo – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais	65

1 INTRODUÇÃO

A odontologia minimamente invasiva visa promover a preservação da estrutura dentária, em um esforço para evitar danos ao complexo dentino-pulpar (DA ROSA *et al.*, 2018). A preservação da vitalidade pulpar representa a manutenção de todas as funções do elemento dentário, assim como seu completo desenvolvimento (HANNA, ALFAYATE & PRICHARD, 2020), visto que a polpa dentária é responsável pela função sensorial e nutritiva, bem como a inervação, defesa e desenvolvimento do dente (MODENA *et al.*, 2009).

A função primordial da polpa é a formação de tecido dentinário, que começa quando as células mesenquimais periféricas se diferenciam em odontoblastos e iniciam a deposição de matriz de colágeno em uma sequência de deposição/mineralização, que é reduzida com a completa formação do dente (CUSHLEY *et al.*, 2021). Após a formação inicial do dente, a polpa continua fisiologicamente a produzir dentina devido ao envelhecimento dentário, a dentina secundária, enquanto a dentina terciária pode também ser produzida, em resposta a agentes agressores que podem levar à inflamação do tecido pulpar (MODENA *et al.*, 2009; TZIAFAS, 1994).

A principal causa da inflamação pulpar é a cárie dentária, uma infecção progressiva da dentina, que pode conduzir à inflamação e, se não tratada, levar à necrose pulpar (COHENCA, PARANJPE & BERG, 2013). A polpa também pode sofrer agressões químicas ou mecânicas, resultando em exposições pulpares que geram quadros graves de dor e infecção (PARISAY, GHODDUSI & FORGHANI, 2015).

As exposições pulpares podem ocorrer em circunstâncias diversas, sendo as causas mais comuns os traumatismos dentários coronários, as lesões de cárie avançadas em dentina ou acidentes operatórios (iatrogenia) durante o preparo de cavidade, troca de restaurações ou remoção não seletiva ou total do tecido cariado (ANDREI *et al.*, 2021; BJØRNDAL *et al.*, 2010; KOMABAYASHI 2016). Recentemente, a Sociedade Europeia de Endodontia considerou a técnica de remoção não seletiva ou total da dentina, um "sobretreatamento", sendo esta abordagem atualmente contraindicada, a menos que o órgão pulpar já tenha sido exposto (ESE, 2019).

Diante condições de inflamação pulpar, as modalidades de terapia pulpar vital (TPV) são consideradas como terapias minimamente invasivas voltadas a preservar a vitalidade pulpar e manter a funcionalidade do dente (MACHADO *et al.*, 2020; PARHIZKAR & ASGARY, 2021; TAHA & AL-KHATIB, 2022).

As TPV são consideradas importantes abordagens conservadoras comparadas às técnicas convencionais de terapia endodôntica, pois: (1) promovem a endodontia regenerativa; (2) preservam a estrutura e função dentária; (3) oferecem maior resistência ao dente contra as forças mastigatórias em comparação com dentes tratados endodonticamente; e (4) mantêm o processo fisiológico da esfoliação, quando em dentes decíduos (ASGARY *et al.*, 2020; DA ROSA *et al.*, 2018; DUNCAN, 2022; MESCHI, PATEL & RUPAREL, 2020).

Entre as TPVs preconizadas para o tratamento da polpa dentária exposta, três procedimentos são indicados em ordem crescente quanto à invasão tecidual: (1) capeamento pulpar direto, que envolve nenhuma remoção de tecido pulpar; (2) pulpotomia parcial, que preconiza a excisão de pequena parte do tecido pulpar coronário; e (3) pulpotomia total, onde a excisão de toda a polpa coronária é realizada, deixando-se apenas a polpa radicular (GAVIÑO-ORDUÑA *et al.*, 2021; LEONG & YAP, 2021).

O capeamento pulpar direto pode ser definido como um procedimento clínico que visa estimular o potencial dentinogênico do tecido pulpar, após lesões cariosas, traumas biológicos, físicos ou mecânicos, em um ambiente favorável, para induzir à deposição de dentina terciária no local da exposição, formando a ponte ou barreira dentinária (BJØRNDAL *et al.*, 2010; BJØRNDAL *et al.*, 2017; BJØRNDAL *et al.*, 2019; BRODÉN *et al.*, 2016; IGNA, 2021; SCHROEDER, 1985).

A formação de novo tecido dentinário em resposta a esses estímulos é possível se o ambiente for apropriado e livre de bactérias (GAVIÑO-ORDUÑA *et al.*, 2021).

A pulpotomia parcial envolve a remoção de 2 a 3 mm da polpa coronária inflamada abaixo da exposição, seguida da colocação de um agente capeador adequado sobre a polpa dentária (TAHA & KHAZALI, 2017). Este procedimento apresenta vantagens em comparação ao capeamento pulpar direto por remover

parte da polpa dentária exposta infectada, o que aumentaria a taxa de sucesso do tratamento (KANG *et al.*, 2017; TAHA & AL-KHATIB, 2022).

Já a pulpotomia total é uma técnica de terapia vital onde toda a polpa coronária é removida cirurgicamente para manter a vitalidade no remanescente pulpar, a polpa radicular (SANTOS *et al.*, 2021). Por várias décadas, prevaleceu a visão generalizada de que a pulpotomia total não deveria ser indicada como método de tratamento definitivo em dentes permanentes maduros (ZANINI *et al.*, 2019), e hoje, com a evolução do conhecimento, os paradigmas estão mudando e a pulpotomia total em dentes permanentes vem sendo adotada como opção de tratamento menos invasiva e definitiva (TAHA & KHAZALI, 2017; ZANINI *et al.*, 2019).

Nas TPVs, um biomaterial é acomodado no ponto de exposição pulpar, na tentativa de modular o processo inflamatório instalado (GIRAUD *et al.*, 2019). O tecido pulpar é capaz de tolerar grande variedade de materiais reparadores, se as bactérias e suas toxinas forem eliminadas (CHEN e DONG, 2022; HILTON, 2009). Contudo, o material a ser utilizado para capear o tecido pulpar, em qualquer uma das 3 técnicas mencionadas acima, tem como objetivo induzir a formação de tecido mineralizado e manter a vitalidade do dente (DELFINO *et al.*, 2010; HASHEMINIA, 2010). Por essa razão, a seleção do material utilizado para esse procedimento influencia no prognóstico do tratamento (COHENCA, PARANJPE & BERG, 2013).

A capacidade de promover a obliteração da perfuração dentinária, tem o intuito de proteger o tecido pulpar vital de nova invasão bacteriana e da toxicidade de materiais dentários restauradores, imediatamente após o capeamento pulpar e a longo prazo (ANDREI *et al.*, 2021; FARGES *et al.*, 2015). Se a terapia pulpar direta for bem-sucedida, a vitalidade pulpar será mantida, prolongando a vida do dente na cavidade oral com sua fisiologia e mecanismos de defesa preservados (ANDREI *et al.*, 2021; TRAN *et al.*, 2019).

A TPV é praticada há mais de 200 anos, onde o primeiro procedimento descrito foi a aplicação de uma folha de chumbo em uma polpa dentária exposta, realizada por Pfaff, em 1756 (HE & YU, 2022; MARQUES, WESSELINK & SHEMESH, 2015; SAGHIRI *et al.*, 2016). Cerca de 100 anos depois, materiais contendo hidróxido de cálcio (HC) foram descritos pela primeira vez para o tratamento da polpa dentária exposta (BERGENHOLTZ *et al.*, 2013; DA ROSA

et al., 2018; MENTE *et al.*, 2010). No entanto, seu uso ganhou importância somente após os estudos de Hermann, em 1930, e desde então, tem sido um dos materiais mais utilizados na TPV (BERGENHOLTZ *et al.*, 2013; MENTE *et al.*, 2010).

O HC é considerado um dos materiais mais adequados para ser colocado em contato direto com o tecido pulpar, e manter a vitalidade deste, devido à sua capacidade de liberar íons hidroxila e íons cálcio, após sua dissociação ao entrar em contato com o tecido (PAULA *et al.*, 2019). Esse biomaterial é um dos mais estudados e documentados em estudos laboratoriais e clínicos, apresentando resultados satisfatórios (PAULA *et al.*, 2019). Além disso, a reação dos íons cálcio do material com o dióxido de carbono do tecido resulta em partículas de carbonato de cálcio, que servem como matriz para posterior mineralização tecidual (BENETTI *et al.*, 2019; HOLLAND *et al.*, 1977).

A propriedade de induzir a formação de tecido mineralizado confere ao biomaterial sua bioatividade (RENNO *et al.*, 2013), e o torna favorável para o uso na endodontia, onde almeja-se o reparo do tecido pulpar, e formação de dentina terciária (BENETTI *et al.*, 2020; DE ARAUJO LOPES *et al.*, 2020; KERMENI *et al.*, 2020). No entanto, a alta solubilidade, a falta de adesão e as baixas propriedades físico-mecânicas tornaram-se questões relevantes. Conseqüentemente, a busca por um material ideal leva a busca de outros biomateriais (COHENCA, PARANJPE & BERG, 2013).

Outros materiais também conhecidos pela bioatividade são os biovidros, que possuem elevada atividade osteoindutora e osteocondutora (BENETTI *et al.*, 2020; DE ARAUJO LOPES *et al.*, 2020; HENCH 1991; OSORIO *et al.*, 2012; JONES, 2013; WANG *et al.*, 2016).

Os biovidros foram desenvolvidos pelo professor Larry L. Hench, em 1969. Foram sintetizados vidros com composições à base de sílica, pentóxido de fósforo, óxido de cálcio e óxido de sódio (HENCH & JONES, 2008). Esses materiais foram desenvolvidos para utilização como implantes sujeitos ou não a carregamento, como recobrimentos bioativos sobre implantes metálicos e grânulos bioativos (ZHENG *et al.*, 2021). O Bioglass 45S5, o primeiro biovidro desenvolvido para uso na área da saúde, e um dos biovidros mais estudados, é bioativo, ou seja, capaz de se ligar quimicamente ao tecido ósseo, e sugere-se

que seja bioreabsorvível (HENCH & JONES, 2008; LIN *et al.*, 2016; OONISHI *et al.*, 1999; STÄHLI *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2021).

O Bioglass 45S5 contém cerca de 40-55% de SiO₂, 12-25% de CaO, 19-25% de Na₂O e 6% de P₂O₅ e apresenta uma reatividade de superfície específica que aumenta a interação com o tecido circundante devido a ação de aditivos, primariamente óxidos alcalinos (BAINO, 2018; BRAUER, 2015; KOKUBO, KIM, & KAWASHITA, 2003). Este sólido amorfo não é intrinsecamente adesivo, mas é capaz de formar uma ligação coesiva com ambos os tecidos duro e mole quando exposto a apropriado ambiente *in vivo* ou *in vitro*, como fluido corporal simulado ou tampão trihidroximetilaminometano, para o desenvolvimento de uma camada superficial de apatita de carbonato pela liberação de espécies iônicas do material em grandes quantidades (PINTADO-PALOMINO 2015; SHAPOFF, ALEXANDER & CLARK, 1997; TIRAPELLI 2011).

O biovidro foi capaz de regular a proliferação e diferenciação osteoblástica (POLAK *et al.*, 2001), e se espera o mesmo com os odontoblastos, visto as semelhanças morfológicas e funcionais entre estas células (BENETTI *et al.*, 2019a). Para formar um biovidro, a concentração de dióxido de silício é reduzida, aumentando sua solubilidade e dissociação iônica. Assim, ocorre uma alta concentração de sódio, mantendo o potencial hidrogeniônico (pH) neutro ou levemente alcalino, com formação de camadas bioativas, e permitindo a ação antimicrobiana (DE ARAUJO LOPES *et al.*, 2020; GERHARDT & BOCCACCINI, 2010). Ainda, há evidências crescentes dos efeitos positivos do vidro bioativo na vascularização dos tecidos (GORUSTOVICH *et al.*, 2010; POLAK *et al.*, 2001; SKALLEVOLD *et al.*, 2019; WASHIO *et al.*, 2015).

Pesquisadores do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV, UFSCar, São Carlos, Brasil) desenvolveram uma composição de biovidro altamente reativo que não cristaliza durante o processamento, o F18 (GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2017a). Entre os reagentes utilizados para a síntese do material, cita-se o carbonato de sódio (Na₂CO₃), potássio (K₂CO₃) e cálcio (CaCO₃), pentóxido de fósforo (P₂O₅), óxido de magnésio (MgO) e zinco (ZnO) e dióxido de silício (SiO₂) (SOUZA *et al.*, 2015).

O F18 mostrou biocompatibilidade quando testado em tíbia e tecido subcutâneo de ratos (DE ARAUJO LOPES *et al.*, 2020; GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2015) e foi desenvolvido com o objetivo de regenerar tecidos moles,

ampliando suas indicações (GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2015; 2017b). Estudos mostraram que o F18 é capaz de estimular a proliferação de fibroblastos, além de ser potencialmente biodegradável (GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2017a; 2017b). Assim, destaca-se o potencial deste biomaterial para atuar no reparo do tecido pulpar, como se almeja em procedimentos de pulpotomia ou capeamento pulpar direto.

A estrutura deste biovidro permite uma grande flexibilidade em sua composição, sendo possível a incorporação de concentrações de diferentes íons com atividades fisiológicas e propriedades terapêuticas, que são liberados durante o processo de dissolução do material (BAINO, 2018; BRAUER, 2015). Cada componente adicionado à estrutura do biovidro possui uma funcionalidade específica, podendo melhorar o seu desempenho. Por exemplo, prata possui atividade antibacteriana (PIRES, 2017), enquanto o estrôncio pode regular a reabsorção óssea (NARUPHONTJIRAKUL, PORTER & JONES, 2017). A liberação de lítio tem se mostrado eficaz na regeneração de cartilagens (PIRES, 2017), e a angiogênese é estimulada quando o cobre ou cobalto são liberados de vidros bioativos (ROMERO-SÁNCHEZ *et al.*, 2018), influenciando a formação de novos vasos sanguíneos, tendo importante papel na regeneração de tecidos. Dessa forma, dopamos o biovidro F18 com cobalto, no intuito de estimular a angiogênese tecidual (BENETTI, 2019).

Materiais capeadores promovem recrutamento de leucócitos a partir dos vasos sanguíneos, induzindo inicialmente um processo inflamatório nos tecidos adjacentes (BRAGA DINIZ *et al.*, 2019), estimulando também a produção de citocinas moduladoras da inflamação (CAIRES *et al.*, 2019). Citocinas são moléculas produzidas por diferentes tipos celulares, envolvidas na regulação dos processos de proliferação e diferenciação celular e incluem interleucinas, interferons, fatores estimuladores de colônia e alguns fatores de crescimento (DE BRITO *et al.*, 2015).

Os níveis de expressão de citocinas inflamatórias são importantes índices de inflamação pulpar (AUBEUX *et al.*, 2021; KAUR *et al.*, 2021). Dentre as interleucinas (IL), a IL-1, mais especificamente a IL-1 β , é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos ativados, e induz o influxo e ativação de neutrófilos, ativação de células T, produção de outras citocinas, ativação de células B e produção de anticorpos (NAKAHARA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2009;

PARIS *et al.*, 2009; TANCHAROEN *et al.*, 2014). Também desempenha um papel na angiogênese, trabalhando sinergicamente com o fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-6 (BRIZUELA *et al.*, 2020; HE *et al.*, 2017; MARINHO *et al.*, 2015).

A IL-6 é uma citocina sintetizada principalmente por macrófagos e monócitos em locais de inflamação, que contribui para a defesa do hospedeiro na resposta imune de fase aguda (KAUR *et al.*, 2021). A IL-6 induz proteínas de fase aguda, como proteína C reativa e amilóide A sérica (BRIZUELA *et al.*, 2020). Também regula a resposta imune adquirida, como o desenvolvimento de células T (AUBEUX *et al.*, 2021; KAUR *et al.*, 2021). Já a IL-10 é uma citocina regulatória, considerada anti-inflamatória, devido sua capacidade de inibir macrófagos, células Th¹ e células dendríticas ativadas (ELHAMOULY *et al.*, 2021). Assim, possui importante papel no controle de respostas envolvendo imunidade natural mediada por células (ELHAMOULY *et al.*, 2021).

Ainda não há estudos que avaliaram a condição histológica do tecido pulpar e a expressão destas citocinas, após pulpotomia ou capeamento pulpar direto com os biomateriais aqui identificados. Análises histológicas e métodos como o *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ou Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real são consideradas adequadas para determinar a condição do tecido pulpar após contato com diferentes materiais capeadores (LOURENÇO-NETO *et al.*, 2016).

Desta forma, o objetivo desse estudo é avaliar a resposta do tecido pulpar de camundongos, assim como a expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, e IL-10, após capeamento pulpar direto com o biovidro F18 e biovidro F18 dopado com cobalto (F18Co). O HC será utilizado para comparação. Será adotada a hipótese nula do estudo, em que não há diferença na resposta pulpar a partir do biovidro dopado ou não com o cobalto, e do hidróxido de cálcio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desse estudo foi avaliar a resposta tecidual pulpar de molares de camundongos após capeamento pulpar direto com biovidros, em comparação ao hidróxido de cálcio.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar o infiltrado inflamatório e a desorganização no tecido pulpar após capeamento pulpar direto com os biomateriais, através da coloração hematoxilina-eosina (HE);
- Analisar a expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, e IL-10, através do PCR em tempo real.

3 METODOLOGIA EXPANDIDA

3.1 Preparo das pastas a partir dos biomateriais

Foram utilizadas pastas experimentais à base de F18, F18Co, e HC, produzidas a partir da mistura do pó desses materiais com água destilada, ambos pesados e preparados na proporção de 2:1 de pó para água.

3.2 Estudo experimental em modelo animal

3.2.1 Animais

Foram utilizados 48 camundongos machos (Balb/C), pesando aproximadamente 20 gramas, com idade aproximada de 8 semanas (SONG *et al.*, 2017) provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG (Belo Horizonte, MG, Brasil). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22°C e 24°C, com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas (seis camundongos por gaiola). Cada comedouro e bebedouro foi cheio com ração e água filtrada *ad libitum*, respectivamente. Após os procedimentos operatórios, os animais receberam alimentação pastosa por um período de 2 dias. Higienizações periódicas das gaiolas foram realizadas, com troca e limpeza dos comedouros e bebedouros.

Os procedimentos experimentais respeitaram os princípios éticos adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e o projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo CEUA nº 08/2020; ANEXO A).

3.2.2 Fármacos empregados

Para anestesia, os animais receberam via injeção intramuscular, um anestésico à base de cloridrato de Cetamina 10% (80 mg/Kg; Dopalen, Vetbrands – Divisão de Saúde Animal, Jacareí, SP, Brasil) e um sedativo à base de cloridrato de Xilazina 2% (10 mg/Kg; Anasedan, Agribands do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil).

3.2.3 Divisão dos grupos

Os primeiros molares superiores direito e esquerdo de 48 camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, de acordo com os materiais a serem testados, e podem ser visualizados na Tabela 1. O cálculo amostral foi calculado a partir de estudo anterior (TAKEI *et al.*, 2014). Considerando um erro alfa de 0,05% e poder de amostra de 90%, um total de 6 animais por grupo foi considerado necessário para este trabalho, assim como ocorreu em estudos anteriores (KIM *et al.*, 2018; LONG *et al.*, 2017; OKAMOTO *et al.*, 2019; TAKAHASHI *et al.*, 2019; YAEMKLEEBBUA *et al.*, 2019).

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais de acordo com o material avaliado

Grupos	Material reparador	Períodos de Eutanásia	n/período
Controle	-----	7 e 15 dias	6
HC	Pasta de Hidróxido de Cálcio	7 e 15 dias	6
F18	Pasta de Biovidro F18	7 e 15 dias	6
F18Co	Pasta de Biovidro F18 dopado com Cobalto	7 e 15 dias	6

Legenda: HC: hidróxido de cálcio; F18: biovidro F18; F18Co: biovidro F18 dopado com cobalto. Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

3.2.4 Procedimentos operatórios

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal (FIGURA 1), e foram imobilizados em uma mesa operatória que foi construída e padronizada

especialmente para trabalhar em dentes de camundongos de modo que permitisse a manutenção da boca aberta. O animal foi colocado na mesa de procedimento em posição supina e contido com elástico ortodôntico (MORELLI®, Sorocaba, SP, Brasil).

Inicialmente, os dentes foram isolados com barreira gengival resinosa (Top Dam; FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil), a fim de se evitar a penetração de fluídos salivares e gengivais. Em seguida, o dente isolado foi descontaminado com algodão umedecido em Digluconato de Clorexidina 0,12% (Periogard/Colgate Palmolive Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

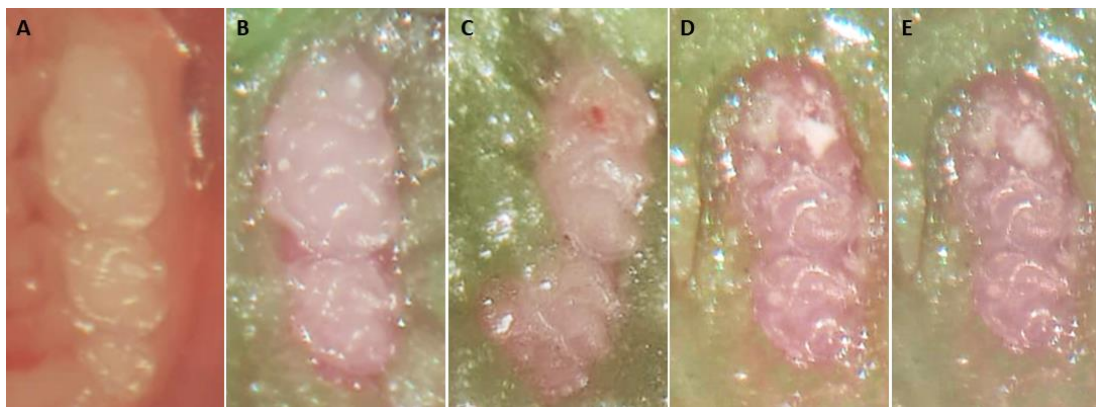
O protocolo seguido foi descrito anteriormente por Song *et al.* (2017). Todos os procedimentos foram realizados em bancada de laboratório com materiais esterilizados e com auxílio de um microscópio operatório (Alliance, São Paulo, SP, Brasil), com aumento de 40x (BRACKS *et al.*, 2019), como mostrado na FIGURA 2.

Figura 1 - Aplicação de solução anestésica e sedativo via intraperitoneal no camundongo.



Fonte: Do autor, 2022.

Figura 2 - Imagens representativas do procedimento operatório de capeamento pulpar em camundongos. (A) Dente hígido sem isolamento; (B) Dente hígido isolado com barreira gengival; (C) Exposição da polpa coronária; (D) Capeamento pulpar com biomaterial; e (E) Vedamento com ionômero de vidro.



Fonte: Do autor, 2022.

Para a abertura coronária foi utilizada broca LN (Dentsply Maillefer, Distrito Industrial - São José, SC, Brasil) em baixa rotação, sob irrigação constante com solução fisiológica 0,9% (Eurofarma, São Paulo, SP, Brasil), até remoção do esmalte dentário de forma a conseguir uma Classe I na face oclusal do dente (Figura 2). Em seguida, utilizando uma lima endodôntica do tipo K#15 (VDW GmbH, Munique, Alemanha), foi realizada perfuração cuidadosa da dentina, até exposição da polpa coronária (SONG *et al.*, 2017). Seguidamente, a região exposta foi lavada com solução fisiológica 0,9% e secadas até conseguir a hemostasia com bolinha de algodão estéril. Durante este ato, cuidado especial foi tomado para que raspas de dentina não fossem condensadas para a polpa dentária.

Após, os materiais F18, F18Co, e HC, foram colocados em contato com a polpa dentária com auxílio de condensadores duplo nº 1-2 (Odous de Deus, Belo Horizonte, MG, Brasil), ou cones de papel absorvente DiadentCell Pack (Diamond Dental Industrial Co. Ltd, Coreia do Sul). Por fim, a cavidade foi selada com cimento de ionômero de vidro fotopolimerizável (Riva Light Cure – SDI - SDI BRASIL INDUSTRIA E COMERCIO LTDA, São Paulo, SP, Brasil) (AAE, 2018; GALLER *et al.*, 2016) e acompanhados por 7 e 15 dias. Dipirona sódica (150

mg/Kg) foi aplicada nos animais, via subcutânea, para a analgesia pós-procedimento operatório (FIGURA 3).

Figura 3 - Inoculação via subcutânea de Dipirona Sódica no dorso do camundongo.



Fonte: Do autor, 2022.

3.2.5 Eutanásia e procedimento laboratorial

Decorrido os períodos pré-determinados de 7 e 15 dias (HAN, CHEN & ZHANG, 2017; SUEYAMA *et al.*, 2017), os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica. Após, foi removida toda a pele correspondente à face do animal e com dois cortes realizados com tesoura (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil) no ângulo da boca, foi realizada a separação da mandíbula e maxila. Empregando uma lâmina intercambiável nº 15 (Lamedid Comercial e Serviços LTDA, Barueri, SP, Brasil), montada em cabo de bisturi (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil), foi realizada uma incisão em profundidade ao nível do plano sagital mediano, separando a maxila direita da esquerda. Empregando-se novamente uma tesoura, foi realizado outro corte de modo a tangenciar a borda da maxila, removendo os tecidos em excesso, possibilitando a obtenção das hemimaxilas com os primeiros molares superiores, objeto do estudo.

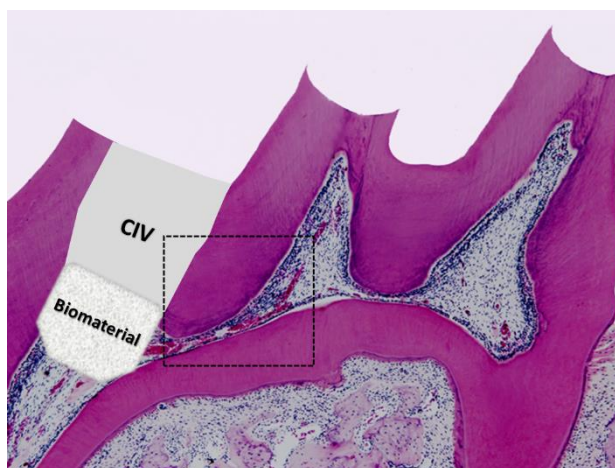
As peças de metade dos animais foram utilizadas para processamento histológico, sendo então, imediatamente colocadas em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução de formaldeído a 4%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 18 horas e depois foram lavadas em água

corrente por um período de 12 horas, para a remoção de toda solução de fixação. As peças referentes à outra metade dos animais, foram congeladas, para posterior análise de PCR em tempo real.

Então, as peças do processamento histológico foram desmineralizadas em solução de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) neutro, a 10%, por um período aproximado de 6 semanas com períodos de troca a cada quatro dias, até atingir desmineralização adequada. Posteriormente, as peças foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais dos molares superiores e estruturas de suporte em seu sentido longitudinal, de vestibular para lingual.

Após inclusão as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 5 μm de espessura, realizados em micrótomo (Leica - RM 2045, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha). Para fins de padronização, o corte foi selecionado quando a raiz mesial pudesse ser visualizada em seu sentido longitudinal pleno (FIGURA 4; BENETTI *et al.*, 2018a).

Figura 4 – Lamina histológica ressaltando a padronização utilizada.



Fonte: Do autor, 2022.

As carcaças dos animais foram armazenadas em sacos plásticos brancos e acondicionadas em freezer até o descarte definido pelo Plano de Gerenciamento de Resíduos da UFMG.

3.2.6 Forma de análise dos resultados

3.2.6.1 Avaliação histológica

Os cortes histológicos advindo dos molares superiores direito e esquerdo foram submetidos à técnica de coloração Hematoxilina-eosina (HE).

As seções histológicas foram analisadas com auxílio de um microscópio óptico (400x, AxioLab A1 Plus - Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha), e com o software de imagem AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha).

O processo inflamatório e a desorganização celular foram analisados de forma semelhante a estudos anteriores (BENETTI *et al.*, 2017; 2018), considerando a intensidade e distribuição no tecido pulpar, em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes. Os escores atribuídos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Escores atribuídos à intensidade da inflamação e desorganização tecidual

Escores	Intensidade da Inflamação	Desorganização tecidual
0	Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível	Tecido pulpar em normalidade
1	Infiltrado inflamatório discreto (menos de 25 células por campo)	Desorganização da camada odontoblástica, mas polpa coronária em normalidade
2	Infiltrado inflamatório moderado (entre 25 e 125 células por campo)	Desorganização da camada odontoblástica e de parte da polpa coronária
3	Infiltrado inflamatório severo (mais que 125 células por campo)	Total desorganização da morfologia pulpar
4	Necrose	Necrose

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

3.2.6.2 Identificação das citocinas por PCR em tempo real.

Para detecção das citocinas, foi utilizado o método de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Para o preparo destas peças, após a eutanásia dos animais, as maxilas foram removidas e cuidadosamente dissecadas. O osso alveolar foi reduzido para possibilitar a limitação máxima possível da região contendo o primeiro molar, de forma intacta, utilizando-se uma tesoura afiada.

Para realização do qPCR, foi utilizado o protocolo do fabricante NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. Para a realização da homogeneização, as amostras foram trituradas no Homogeneizador de Tecido OmniTH (OMNI International, Kennesaw GA, USA). Em seguida foi adicionado 350 µL de tampão de RA1 e 3,5 µL de β-mercaptoetanol (β-ME) ao tecido triturado. Foi utilizado um filtro NucleoSpin® e um tubo de coleta (2 mL) para a limpeza do líquido e redução da viscosidade do lisado. O material foi colocado em uma centrífuga Z 327K (HERMLE Labor Technik GmbH Siemensstr, Wehingen, Alemanha) por 1 minuto a 11.000 x g para a completa homogeneização do tecido. O filtro então foi descartado e adicionado 350 µL de etanol (70%) ao lisado homogeneizado.

Utilizando-se um novo filtro NucleoSpin® e um novo tubo de coleta (2 mL), foi adicionado o líquido pipetando o lisado para cima e para baixo de 2 a 3 vezes; em seguida o material foi centrifugado por 30 segundos a 11.000 x g e colocado em um novo tubo de coleta de 2 mL.

Foi adicionado 350 µL de tampão de dessalinização de membrana e novamente centrifugado a 11.000 x g por 1 minuto para secagem da membrana. Com a mistura de reação de DNase em um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL estéril, foi adicionado 10 µL de rDNase reconstruída a 95 µL de tampão de reação para rDNase. Em seguida o tubo foi levado na centrífuga para uma nova homogeneização da mistura.

Para lavagem e secagem da membrana de sílica foi adicionado 200 µL de tampão de RAW2 à coluna de ácido ribonucleico (RNA) NucleoSpin® e centrifugado por 30 segundos a 11.000 x g e novamente colocado em um novo tubo de coleta de 2 mL. Em seguida foi adicionado 600 µL de RNA NucleoSpin® e centrifugado por 30 segundos a 11.000 x g. O fluxo foi descartado e o lisado colocado em um novo tubo de coleta.

Adicionou-se mais 250 μL de tampão de RA3 à coluna de RNA NucleoSpin[®], seguido de uma nova centrifugação de 2 minutos por 11.000 x g para secagem completa da membrana. O RNA foi eluído em 60 μL de H₂O livre de RNase e novamente centrifugado a 11.000 x g por 1 minuto.

3.2.6.2.1 Quantificação do mRNA

Para que as amostras pudessem ser lidas no espectrofotômetro (NanoDrop[®] ND-1000, USA), o mRNA foi diluído em água destilada nas proporções 1:100 e 1:500. O substrato formado foi colocado em cubetas de quartzo com comprimento de onda de 260/280 OD. A quantificação foi obtida utilizando-se a fórmula: $[\text{mRNA-mg/ml}] = \text{OD } 260 \times \text{diluição } 40\text{x}$.

3.2.6.2.2 Preparo de cDNA por Transcrição Reversa

Para a síntese do cDNA, utilizou-se o kit SuperScript[®] III Reverse Transcriptase (Life Technologies[®], USA) seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizados 2000 ng de RNA para a síntese de cDNA.

Para uma reação de 20 μL :

5x iScript Reaction Mix.....	4 μL
iScript Reverse Transcriptase	1 μL
RNA.....	Variável
Água nuclease-free	Variável

O cálculo da quantidade de μL utilizado de RNA foi realizado a partir da concentração obtida no NanoDrop[®]. A reação foi submetida a uma temperatura de 25°C por um período de 5 minutos, 46°C por 90 minutos e 70°C por 15 minutos. O cDNA produzido foi diluído em solução 1:10 e armazenado a uma temperatura de -20° C.

3.2.6.2.3 Quantificação do qPCR

Para a validação dos resultados de PCR em tempo real, fez-se necessário a determinação de um controle endógeno, que serviu como padrão normalizador para a análise das variações de expressão dos genes testados. Dentre os genes o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi o normalizador escolhido.

3.2.6.2.4 Quantificação das citocinas

Foi realizada a quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, e IL-10, por PCR em tempo real. O nível de expressão desses genes foi determinado utilizando-se 5 μ L de SYBR[®] Green qPCR SuperMix (Invitrogen[™], USA), 5 μ M de cada iniciador e 2 μ L de cDNA diluído 1:10 em um volume final de 10 μ L.

Para uma reação de 10ul:

SYBR.....	5 μ L
Primer Forward (diluído 1:20).....	1 μ L
Primer Reverse (diluído 1:20).....	1 μ L
Água nuclease-free	2 μ L

Foi realizado um MIX e distribuído em 9 μ L em cada tudo. Foi acrescentado 1 μ L de cDNA (diluído em 1:10) no tubo. Em seguida foi realizada a diluição do primer 100 ul para 5uM (1:20)

As reações foram realizadas utilizando o sistema. O protocolo foi realizado no termociclador Rotor-Gene 5 plex HRM (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de amplificação. O processo de desnaturação inicial ocorreu em uma temperatura de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. Em todas as reações realizadas havia um controle negativo, constituído por 5 μ L de SYBR Green SuperMix e 5 mM de cada iniciador.

As sequências dos iniciadores utilizados podem ser vistas na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores de citocinas

PRIMER	SEQUÊNCIA (5' - 3')	PESO
IL-1 β	Forward: GCCTCGTGCTGTCGGACCCATAT Reverse: TCCTTTGAGGCCCAAGGCCACA	143bp
IL-6	Forward: CAACGATGATGCACTTGCAG Reverse: GAAATTGGGGTAGGAAGGAC	275bp
IL-10	Forward: ACTGGCTGGAGTGAAGACCA Reverse: AAGGCTTGGCAACCCAAGTAA	213bp
GAPDH	Forward: CGACCACTTTGTCAAGCTCA Reverse: GAGGGTCTCTCTTCTCCTCT	150bp

Fonte: Elaborada pelo autor, 2022.

A quantidade relativa dos produtos de PCR gerados para cada grupo de iniciadores foi determinada baseado no ciclo de limite (CT), do inglês *Threshold cycle* e na eficiência de amplificação. Os CTs obtidos para os genes foram normalizados subtraindo-se o valor do CT obtido para o gene de referência GAPDH para cada amostra. Com esse valor, agora chamado de Δ CT, calculou-se o $\Delta\Delta$ CT, que corresponde ao Δ CT amostra – $2^{\Delta\Delta$ CT do calibrador.

Os resultados foram obtidos no programa Bio-Rad SFX Manager Software (Bio-Rad Laboratories, California, USA) e analisados em programa estatístico, como descrito no item 3.3. Todas as amplificações foram seguidas de uma curva de dissociação, chamada “Curva de Melting”, na qual foi avaliado se não houve formação de produtos inespecíficos, comprovando a especificidade da reação.

3.3 Análise estatística

A análise estatística foi conduzida utilizando-se o programa SigmaPlot® (Systat Software Inc., for Windows, version 12.0). Os dados obtidos com as análises foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Para todos os testes foi considerado $p < 0,05$.

4 ARTIGO

O artigo “**Tissue response and expression of interleukins (IL)-1 β , IL-6, IL-10 in mouse molars after pulp capping with bioglasses**” foi submetido ao periódico *International Endodontic Journal* (Qualis A1, Fator de Impacto = 5,165).

Abstract

Aim To evaluate the biological response of the pulp tissue to F18 and F18 doped with cobalt (F18Co) bioglasses compared to calcium hydroxide (CH) after direct pulp capping.

Methodology A total of 48 8-weeks-old male Balb/C mouse had the right and left maxillary first molars randomly divided into groups: F18, F18Co, CH, and control. The molars of experimental groups had the coronal pulps exposed and received the materials, and were sealed with glass ionomer. The control group received no intervention. After 7 and 15 days, the animals (n=6) were euthanized and the specimens were processed for evaluation of the tissue disorganization and inflammatory process by means of Haematoxylin-Eosin staining and of cytokines by means of the real time PCR technique, where interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-10 were evaluated.

Results At 7 and 15 days, there was mild to moderate inflammation in the CH group, and mainly moderate to severe in F18 and F18Co, however, the difference was only observed between the control group, without inflammation, and the F18 and F18Co groups ($P < 0.05$); regarding tissue disorganization, at 7 days, moderate disorganization was observed for the HC and for most of the F18 and F18Co specimens; at 15 days, there was mild to moderate disorganization for CH, and moderate to severe for F18 and F18Co; the difference was observed between the control and F18 and F18Co groups ($P < 0.05$). Tertiary dentin was observed only at 15 days. At 7 days, there was no significant difference among groups regarding IL-6 and IL-10 expressions. Regarding IL-1 β expression, it is possible to observe a significant increase in the CH and F18 groups. At 15 days, there was higher IL-6 expression in the F18 and F18Co groups compared to control. Significant increase in the expression of IL-1 β was observed in this period in the F18 and F18Co groups compared to CH and control groups. Regarding IL-10, no significant expression was observed between the groups.

Conclusion F18 and F18Co bioglasses may have a lower performance than CH when used in direct contact with the pulp tissue.

Keywords: Pulp capping, biomaterials, dental pulp capping, pulpotomy, pulp response, glass-ceramic, animal model, endodontics.

Introduction

For many years, it had been commonly thought that mature permanent teeth with signs and symptoms of irreversible pulpitis (IP) should be managed with root canal treatment (RCT) or surgical extraction (Zafar *et al.* 2020, Asgary *et al.* 2022). Case–control/longitudinal studies have shown up to a 98% survival rate with RCT (Asgary *et al.* 2022); however, epidemiological/cross-sectional studies have revealed a lower percentage of this treatment success (34–76%), which could be due to the poor quality of treatment completed (Asgary *et al.* 2018, Iyer *et al.* 2021).

Endodontology has recently shifted its focus to the preservation of vital pulpal tissues which would shorten the course of treatment and improve the long-term prognosis for tooth retention/function (Wolters *et al.* 2017, Hanna *et al.* 2020, Asgary *et al.* 2022). In comparison to surgical extraction, RCT is a more-biological and less-invasive treatment; however, in comparison with vital pulp therapy (VPT), it is a less-biological and more-invasive, complex, and more expensive treatment modality (Yazdani *et al.* 2014).

As a minimally invasive approach, VPT includes stepwise excavation of decayed tissues, direct/indirect pulp capping, partial/full pulpotomy, and partial pulpectomy (Asgary *et al.* 2016, Eggmann *et al.* 2022). According to American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD, 2021) VPT is defined as a treatment which aims to preserve and maintain pulp tissue that has been compromised but not destroyed by caries, trauma, or restorative procedures in a healthy state. This is particularly important in the young adult tooth with incomplete apical root development (Morotomi *et al.* 2019). It has been recommended that VPT should be performed only in young patients because of the high healing capacity of pulp tissue compared to older patients (Ward *et al.* 2002, Ghodduzi *et al.* 2014, Morotomi *et al.* 2019).

Since the evidence regarding the effect of the patients' age and the status of the root apex on the outcome of VPT did not indicate that this treatment could not be performed successfully in older patients, and based on the premise of innate capacity of pulp tissue for repair in the absence of microbial contamination, preservation of the pulpally involved permanent tooth is also considered (Aguilar *et al.* 2011, Lin *et al.* 2021).

Dental capping agents are materials used as a protective layer to the exposed pulp of the tooth to allow the tissue to recover and maintain its normal function and vitality (Parhizkar & Asgary 2021). Ideally, these materials should not only be inert, in the sense that they should not be toxic to pulp cells, but should be “bioactive” to the tissues,

stimulating the migration, proliferation and differentiation of the cells (Pedano *et al.*, 2020, Rodríguez-Lozano *et al.* 2022).

Calcium hydroxide (CH) has been used to direct pulp capping materials for several decades (Hilton 2009, Poggio *et al.* 2015). CH has a high pH of approximately 12, which provides excellent antibacterial properties (Hilton 2009, Poggio *et al.* 2015, Morotomi *et al.* 2019). Additionally, this high pH induces thin layer of tissue necrosis and after, mineralization immediately beneath the material (Chen *et al.* 2013, Morotomi *et al.* 2019).

Bioactive glasses, one of the bioceramics comprised of silica (SiO_2), sodium oxide (Na_2O), calcium oxide (CaO), and phosphorus pentoxide (P_2O_5), are well-studied biomaterials (Hench 2006). These biomaterials show a clinical ability to bond with bone through the formation of a hydroxyapatite layer on the surface (Kokubo *et al.* 1990, Kokubo & Takadama 2006, Morotomi *et al.* 2019). Thus, the use of bioactive glass was proposed to improve osseointegration (Baiano *et al.* 2018) and new areas of research involving this material have emerged (Kargozar *et al.* 2018).

A new highly reactive bioglass formulation that does not crystallize during processing has been developed and named F18 (Gabbai-Armelin *et al.* 2015, Souza *et al.* 2015; 2017a; 2017b). This material was developed with the objective of regenerating soft tissues (Gabbai-Armelin *et al.* 2015; 2017b), stimulates the proliferation of fibroblasts and is potentially biodegradable (Gabbai-Armelin *et al.* 2017a; 2017b). Thus, its potential to act in the repair of pulp tissue stands out. In a previous study, we observed that pastes from F18 showed biocompatibility, osteogenesis induction, and antimicrobial activity comparable to CH paste (De Araujo Lopes *et al.* 2020).

However, there are still no studies that evaluated the histological condition of pulp tissue after pulpotomy or direct capping with these bioglass. It is known that the addition of cobalt ions to the vitreous bioparticles induces tissue hypoxia and stimulates angiogenesis (Littmann *et al.* 2018). Therefore, we propose to doping the F18 bioglass with cobalt ions. Histological analysis and of the cytokine expression are considered adequate to determine the condition of the pulp tissue after contact with different capping materials (Lourenço-Neto *et al.*, 2016). Thus, this study evaluated the biological response of the pulp tissue to F18 and F18 doped with cobalt (F18Co) bioglasses compared to CH after direct pulp capping in mouse. The null hypothesis was adopted, that there would be no difference between the pulp response to different materials.

Materials and Methods

Experimental model

A total of 48 male mouse (Balb/C), weighing approximately 20 g each (age of 8 weeks), were used. The sample size calculation was based on a previous study (Takei *et al.* 2014). Considering an alpha error of 0.05% and sample power of 90%, a total of 6 animals per group was considered necessary for this study, as in other previous studies (Long *et al.* 2017, Kim *et al.* 2018, Okamoto *et al.* 2019, Takahashi *et al.* 2019, Yaemkleebua *et al.* 2019).

The animals were kept in an environment with a temperature between 22°C and 24°C, a controlled light cycle (12 hours light and 12 hours dark) and were in collective cages (six mice per cage). Each feeder and drinker were filled with feed and filtered water *ad libitum*. The study was approved by the local Animal Research Ethics Committee (CEUA 08/2020) and conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA).

Pulp exposure and direct pulp capping

The animals were anesthetized with 2% xylazine (10 mg/kg; Anasedan, Agribands do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brazil) and 10% ketamine (80 mg/kg; Dopalen, Vetbrands – Division of Animal Health, Jacareí, SP, Brazil), intraperitoneally. So, the two upper first molars (right and left) of each animal were randomly divided into 4 groups (n = 6): F18, F18Co, HC and a control group (no intervention). Prior to coronary access, the first molars of experimental groups were disinfected with 0.12% Chlorhexidine Digluconate (Periogard/Colgate Palmolive Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brazil).

Using a microscope (Alliance, São Paulo, SP, Brazil), access to the pulp chamber was performed with an LN drill (Dentsply Maillefer, Distrito Industrial - São José, SC, Brazil) at low speed, under constant irrigation with 0.9% saline solution (Eurofarma, São Paulo, SP, Brazil). Then, using a K#15 endodontic file (VDW GmbH, Munich, Germany), careful drilling of the dentin was performed until the coronal pulp was exposed (Song *et al.*, 2017). Irrigation was performed with sterile saline solution. Bleeding was controlled with saline irrigation using sterile cotton balls. The, the pulp tissue received one of the materials (F18, F18Co, or HC) according to groups, and were sealed with glass ionomer (Riva Light Cure – SDI - SDI BRASIL INDUSTRIA E COMERCIO LTDA, São Paulo, SP, Brasil). The control group received no intervention.

Sample preparation and histological analysis

After periods of 7 and 15 days (Han *et al.* 2016, Tohma *et al.* 2020), the animals were euthanized by anaesthetic solution overdose. The right and left jaws were separated, and half of the hemimaxillae of each group, after removing the surrounding tissue, were stored and frozen in a freezer at -70°C (Ultra Freezer, Trammit Medical, Belo Horizonte, MG, Brazil) for further analysis of cytokine expression. The other half was dissected, fixed in a solution of 4% buffered formaldehyde for 24 h, and then decalcified in 10% acid ethylenediaminetetraacetic (EDTA) solution for approximately 30 days.

For histological processing, the jaws were dehydrated, embedded in paraffin. Serial histological sections (5 µm) were cut in the mesiosagittal plane and were selected from the point where the mesial root of the first molar was seen in all its longitudinal extension. Then, the histological sections were stained with haematoxylin-eosin (HE). The analyses were performed under light microscopy (400× magnification; DM4000 B; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) by a single calibrated and blinded operator to the groups. In order to apply the scores and standardize the area to be evaluated, the region of pulp tissue immediately closest to the region where the material came in contact was analysed, this being the pulp referring to the middle third of the coronal pulp, in the mesiodistal direction. Then, the pulp tissue was analysed and scored according to the histopathological parameters involving inflammatory infiltrate (0, inflammatory cells absent or negligible in number; 1, mild inflammatory infiltrate [<25 cells per field]; 2, moderate inflammatory infiltrate [between 25 and 125 cells per field]; 3, severe inflammatory infiltrate [>125 cells per field]; and 4, tissue necrosis) and pulp tissue disorganization (0, normal pulp tissue; 1, disorganization of the odontoblastic layer, but normal coronary pulp; 2, disorganization of the odontoblast layer and part of the coronary pulp; 3, total disorganization of pulp morphology; 4, tissue necrosis) (Benetti *et al.* 2017a; 2017b).

Gene expression by real-time PCR

Total RNA from each sample was obtained from first molar in reduced hemimaxillae using the ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System (Promega, Durham, NC, USA) according to the manufacturer's recommendations, and the RNA obtained was quantified on NanoDrop. Reverse transcription of RNA was performed using the SuperScript[®] III Reverse Transcriptase kit (Life Technologies[®], California, USA) according to the manufacturer's protocol. The resulting cDNAs were amplified by PCR

with SYBR[®] Green qPCR SuperMix solution (Invitrogen[™], Massachusetts, USA). Fold increase for each sample were calculated using $\Delta\Delta C_t$ method, with the endogenous gene for normalization glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The primers used were:

- GAPDH: *forward* 5'CGACCACTTTGTCAAGCTCA3', *reverse* 5' GAGGGTCTCTCTCTTCCTCT 3',
- IL-1 β : *forward* 5' GCCTCGTGCTGTCTGGACCCATAT 3', *reverse* 5' TCCTTTGAGGCCCAAGGCCACA';
- IL-6: *forward* 5' CAA CGA TGA TGC ACT TGC AG3', *reverse* 5' GAA ATT GGG GTA GGA AGG AC 3';
- IL-10: *forward* 5' ACTGGCTGGAGTGAAGACCA 3', *reverse* 5' AAGGCTTGGCAACCCAAGTAA 3'.

Statistical analysis

Statistical Package for SigmaPlot (version 12.0, Systat Software Inc.) software program was used for the statistical analysis. The data were analysed using the Kruskal-Wallis followed Dunn statistical tests. Statistical significance was set at $P < 0.05$ for all analyses.

Results

Inflammatory infiltrate and tissue disorganization

Representative images of the histological analysis can be seen in Figure 1, and the results are showed in Table 1. At 7 days in the CH group, it is possible to observe moderate inflammation that affects the entire coronary pulp, with a slight presence of polymorphous cells and leukocytes. In the F18 and F18Co groups, it is also possible to notice the presence of a moderate to severe inflammation that affects the coronary pulp. Regarding tissue disorganization, moderate disorganization was observed for the CH. In groups F18 and F18Co it is possible to observe a disorganization of the odontoblastic layer and part of the coronal pulp until a total disorganization of the pulp morphology.

At 15 days, in the CH group, it is possible to observe a mild to moderate inflammation, while in the F18 and F18Co groups, the presence of moderate to severe inflammation is still observed, however, the difference was only observed between the control group, without inflammation, and groups F18 and F18Co ($P < 0.05$). At 15 days, there was mild to moderate disorganization for CH and moderate to severe

disorganization for F18 and F18Co; the difference was observed between the control and F18 and F18Co groups ($P < 0.05$). Tertiary dentin was observed only at 15 days.

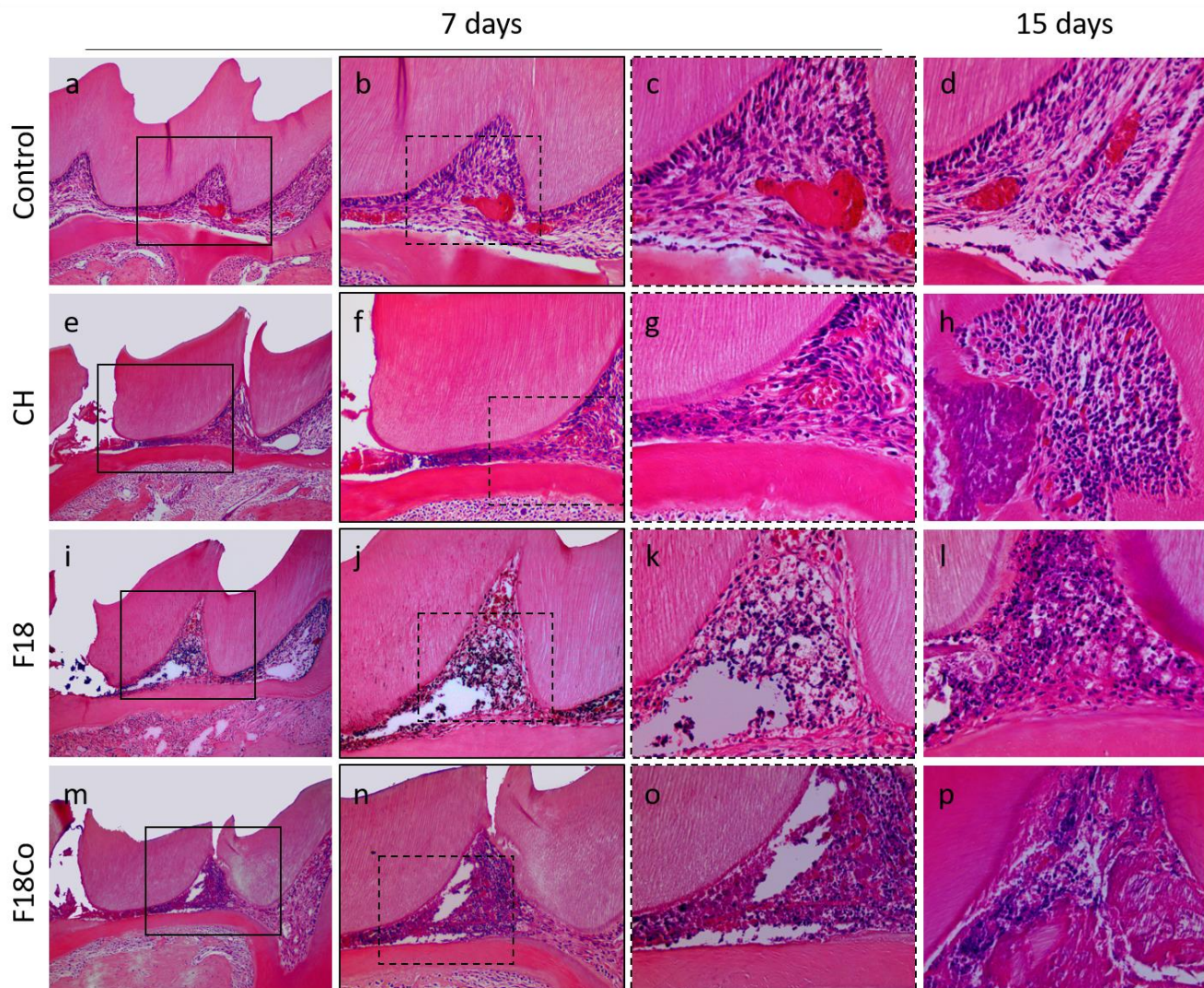


Figure 1. Representative images of pulp tissue reactions (a-p): Inflammatory response. (a-d): normal pulp tissue, absence of inflammatory cells and well-defined tissue organization, (e-h): at 7 and 15 days, in (e) it is possible to observe the region where the pulp exposure was performed and the insertion of the repair material, in (f, g) it is possible to observe the presence of inflammatory cells and disorganization of the odontoblastic layer, absence of odontoblasts around the dentin, in addition to the presence of blood vessels and pulp tissue with characteristics close to normal, in (h) it is possible to observe the presence of tertiary dentin, in addition to odontoblast-like cells around the dentin; at 7 days and 15 days in (i-p), a greater change in the pulp tissue is visibly observed when compared to the CH group, there is still a greater increase in the number of inflammatory cells and greater disorganization of the pulp tissue, it is also noted, presence of blood vessels and the presence of some odontoblasts around the dentin. In (l,p) the presence of cells is observed, however, not so organized when observed in the CH group, the presence of blood vessels is also noted in both bioglass groups.

Table 1. Histologic evaluation for each parameter in experimental groups at 7 and 15 days

*Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s test; **different letters in the same line indicate a statistically

Scores for each parameter		7 days (n = 6)				15 days (n = 6)			
		Control	CH	F18	F18Co	Control	CH	F18	F18Co
Extension	0	6/6	0/6	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6	0/6
inflammatory infiltrate	1	0/6	2/6	1/6	0/6	0/6	3/6	0/6	0/6
	2	0/6	4/6	3/6	3/6	0/6	3/6	3/6	3/6
	3	0/6	0/6	2/6	3/6	0/6	0/6	3/6	3/6
	4	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Median*		0 ^a	2 ^{ab}	2 ^b	2,5 ^b	0 ^a	1,5 ^{ab}	2,5 ^b	2,5 ^b
<i>P</i> value**		< 0.001				< 0.001			
Tissue disorganization	0	6/6	0/6	0/0	0/0	6/6	0/6	0/6	0/6
	1	0/6	0/6	0/0	0/0	0/6	3/6	0/6	0/6
	2	0/6	6/6	4/6	3/6	0/6	3/6	3/6	3/6
	3	0/6	0/6	2/6	2/6	0/6	0/6	3/6	3/6
	4	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Median*		0 ^a	2 ^{ab}	2 ^b	2,5 ^b	0 ^a	1,5 ^{ab}	2,5 ^b	2,5 ^b
<i>P</i> value**		< 0.001				< 0.001			

significant difference (significance was set at $P < 0.05$).

CH: calcium hydroxide; F18Co: F18 bioglass dopad with cobalt.

Evaluation of cytokines

The results regarding the analysis of cytokine expression can be seen in Figure 2. At 7 days, it is possible to observe that there was no significant difference between the IL-6 and IL-10 expressions in the groups, while the expression of IL-1 β was significantly higher in the CH and F18 groups compared to control; the CH was the group that showed the highest IL-1 β expression, followed by the F18 and F18Co groups.

At 15 days, a significant higher IL-6 expression was observed between the F18 and F18Co groups compared to control. Regarding the expression of IL-1 β , it is possible to observe a significant reduction in the CH group when compared to F18 and F18Co groups, that also showed higher IL-1 β expression compared to control. No significant difference is observed between the materials regarding IL-10 expression.

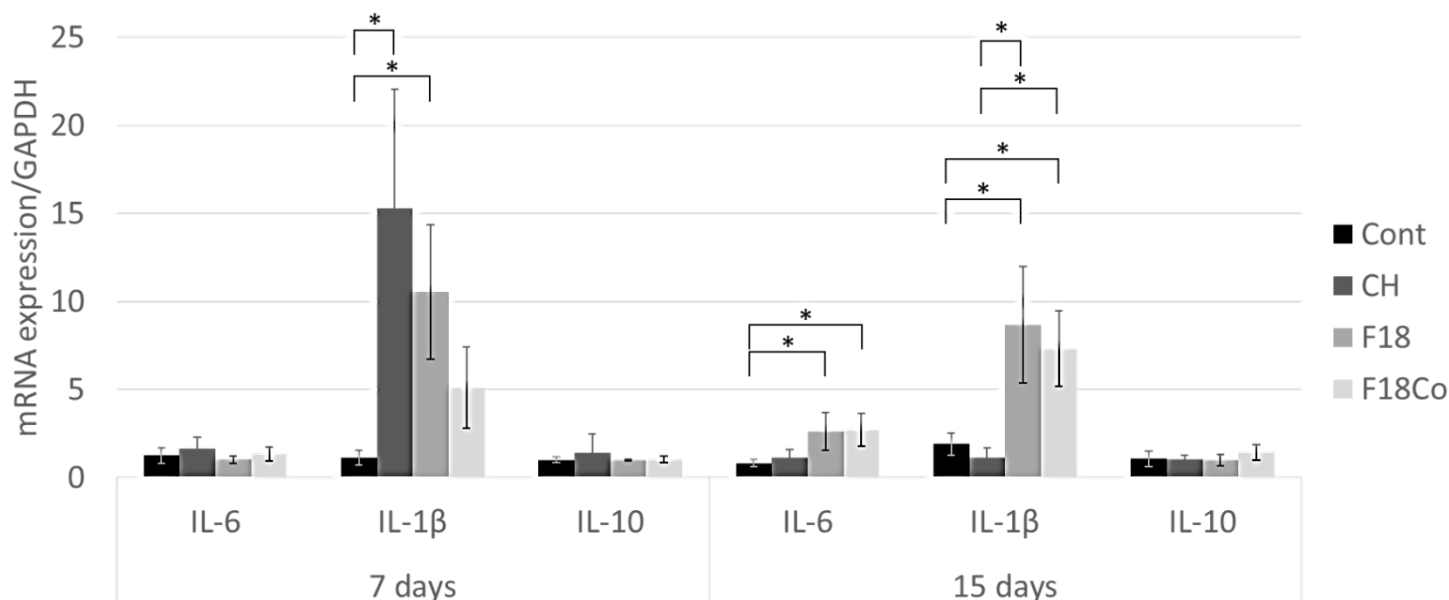


Figure 2. Representative graph of cytokine expression. At 7 days, there was no significant difference between groups in terms of IL-6 and IL-10 expressions. Regarding the expression of IL-1 β , it is possible to observe a significant increase in the HC and F18 groups. At 15 days, there was greater expression of IL-6 in groups F18 and F18Co compared to control; A significant increase in IL-1 β expression was observed in this period in the F18 and F18Co groups compared to the HC and control groups. There was no significant expression of IL-10 in the different groups.

Discussion

This study evaluated the pulp tissue response to F18 and F18Co bioglass pastes after direct pulp capping in mouse molars, compared to CH paste. Overall, it was possible to observe less inflammation and disorganization in the CH group compared to the other materials, although no significant difference was found between the materials groups. However, the difference was observed between the control group with the F18 and F18Co groups. The expression of IL-1 β was higher in CH and F18 groups at initial periods; however, the IL-6 and IL-1 β expression were significantly higher at 15 days only in F18 and F18Co groups. There was no significant expression of IL-10 at any period of analysis. Thus, the null hypothesis was rejected regarding to histological data and IL-6 and IL-1 β expression, but was accepted regarding to IL-10 data.

It is known that mineral trioxide aggregate (MTA) is considered the gold standard material for pulpotomy and direct pulp capping (Marciano *et al.* 2019). Its indication is based on its adequate physicochemical and biological properties, such as good sealing capacity, hydroxyapatite formation, favourable biocompatibility (Caicedo *et al.* 2006,

Moretti *et al.* 2008, Sakai *et al.* 2009, Chen & Sug 2017), and induction of hard tissue formation when in contact with tissues (Kogan *et al.* 2006, Lopes *et al.* 2019).

However, MTA is not reabsorbed, so it remains in the place where it was inserted, and does not allow the region where tissue was lost to be replaced by new tissue. Studies have shown that F18 is capable of stimulating fibroblast proliferation, in addition to being potentially biodegradable (Gabbai-Armelin *et al.* 2017a, 2017b). De Araujo-Lopes *et al.* (2020) presented the first study that evaluated bioglasses (as well as F18) as paste in endodontics, demonstrating that F18 has the ability to induce greater expression of osteopontin (OPN) than CH. F18 is highly bioactive and is able to form a layer of hydroxycarbonate apatite when in contact with pulp exposure, that is, it has a higher mineralization capacity when compared to CH. Previous data revealed that F18, in powder and fibre forms, were efficient against gram-positive and gram-negative strains (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* and *P. aeruginosa*) (Souza *et al.* 2017). Thus, the potential of this biomaterial to act in the repair of pulp tissue, as desired in pulpotomy or direct pulp capping procedures, is highlighted.

The CH is the material that most resembles bioglass for comparison. When CH is placed on the pulp tissue, a repair process occurs, characterized by the formation of a dentinal bridge, protecting the exposed tissue (Holland *et al.* 1998, Sangwan *et al.* 2013, Yamada *et al.* 2021). Komabayashi *et al.* (2016) stated that the effect of CH is the result of the chemical injury caused by the release of hydroxyl ions when in direct contact with the pulp tissue, where it is possible to observe slight inflammation caused by superficial necrosis at different times of analysis (14 and 21 days). In previous studies that also evaluated CH as a capping material, the presence of more intense inflammation of this material was demonstrated when compared to the material considered gold standard (Nair *et al.* 2008, Tran *et al.* 2012, Morotomi *et al.* 2019, Parhizkar & Asgary 2021).

The inflammatory infiltrate could be analysed by HE staining, since it allows the visualization of the inflammatory cells present at the site and tissue disorganization, corroborating the methodology of previous studies (Bueno *et al.* 2019, Benetti *et al.* 2021). This is the first recent study that compared CH with bioglass in contact with the pulp tissue. The histological data showed a lesser pulp inflammation and tissue disorganization, when in contact with CH. In relation to bioglasses, the pulp tissue showed some cellular disorganization even at 15 days, and more accentuated inflammation, regardless of the presence of cobalt ion in the bioglass. Although all materials allowed the formation of tertiary dentin at 15 days, this was observed in contact

with the material mainly in the CH group, and only in a few specimens in the bioglass groups. However, this may indicate that a later analysis period could show a greater amount of dentin bridging with the bioglass, which still needs to be evaluated.

Furthermore, the differences found in the histological results considering the CH group and the F18 and F18Co groups may be due to the particle size of the materials. While CH has particles around 2.5 μm , bioglasses were prepared with particles below 10 μm . Thus, there would be larger particles of bioglasses in contact with the tissue, compared to CH. In this way, smaller particles of bioglass powders should be obtained, to observe if there are better results.

Another factor that may indicate the difference in the results found is the fact that bioglasses are reabsorbed over a longer period of time, while CH can be easily carried away by tissue fluids. The use of CH showed gradual dissolution which can lead to the formation of dead space and microleakage (Posser *et al.* 1982, Komabayashi *et al.* 2016, Chen & Sug 2017). A previous study that evaluated F18 fibres in the subcutaneous tissue of rats observed that at 15 days, F18 had been partially reabsorbed, however, the reabsorption was greater at 30 and 60 days, while there were still particles of the biomaterial in these periods (Gabbai-Armelin *et al.* 2015). In addition, ions cobalt has the ability to induce the formation new vessels, from the process of angiogenesis (Romero-Sánchez *et al.*, 2018). However, this study did not perform histological analysis to verify the formation of new blood vessels.

Cytokine analysis may be a good prognostic marker in teeth after pulp capping (Pezelj-Ribaric *et al.* 2002). This study also evaluated pro- (IL-6 and IL-1 β) and anti-inflammatory (IL-10) interleukins in pulp tissue after contact with the materials. Among the interleukins, IL-6 is an important regulator of inflammation and its levels are increased in inflammatory processes (Lopes *et al.* 2019). It is a multifunctional inflammatory cytokine synthesized in response to trauma or infection, which can activate specific cells, thus playing an important role in the inflammatory reaction and bone resorption (Oliveira *et al.* 2017, Edanami *et al.* 2021), which can be considered a potent mediator of the inflammatory response and a marker of inflammation (Lourenço Neto *et al.* 2016, Sivadas *et al.* 2017). A previous study found elevated IL-6 immunolabeling in early periods (from 24 to 72 hours) (Lopes *et al.* 2019), which did not occur in our study. The increased IL-6 expression in the present study at 15 days may indicate that inflammation is still present in this period, with no reduction in it. This increase in IL-6 was not observed in the CH group. This can also be explained by the fact that the model

used in this study did not have a previous induction of inflammation, before the application of the capping material.

Regarding IL-1 β , this cytokine was increased in a late period (at 60 days) in a previous study, with all capping materials evaluated, including MTA (Kramer *et al.* 2014). These data disagree with the present study, where the expression of this cytokine was increased in F18 and CH in the initial period (15 days), but was significantly reduced later for CH. At 15 days, it was also increased for the F18Co group. This may be another indication of the reduction of inflammation over time after capping with CH, and highlights once again the need to assess the pulp response more deeply and cautiously to bioglasses.

As it is an anti-inflammatory cytokine, an increase in IL-10 could be expected in the present study, when performing pulp capping with bioactive materials. However, previous study has shown that IL-10 was found mainly at the beginning of pulp inflammation, when it was considered reversible (ElSalhy *et al.* 2013). In this study, IL-10 was not significantly found in any period of analysis, which disagrees with another study, where there was an increase in IL-10 after contact of bioceramic materials with pulp cells (Celik *et al.* 2020). However, the difference in the experimental models used is highlighted.

A limitation of this study was to perform pulp capping in an animal model of healthy pulp, without inflammation. Clinically, pulpotomy and pulp capping are indicated for teeth with inflamed pulp when it comes to carious lesions in the young population. However, traumatic dental injuries involving the pulp are quite common and often lead to pulp exposure (Matoug-Elwerfelli *et al.* 2022), sometimes treated without contamination, but it is important for studies like this to perform an inflammation model before pulpotomy.

Murine models have many advantages: they are small animals, readily available, inexpensive compared to other animals, easy to handle, and facilitate studies on a larger number of animals (allowing to obtain more reproducible results) (Aubeux *et al.* 2021), in addition to being carried out in accordance with ethical principles. However, in our study we observed some limitations, such as the little pulp content that is in contact with the material tested, which ends up impairing the histological analysis. The animal model is superior than cell culture, however, it cannot be extrapolated to the clinician. Therefore, it is necessary to consider the possibility that a given murine model response may not occur exactly the same way in humans, necessitating studies with larger animal models.

Conclusion

It is concluded that F18 and F18Co bioglass pastes may have a lower performance than HC paste when used in direct contact with the pulp tissue.

Acknowledgement

This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (88887.596028/2020-00) and Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Conflict of interest

The authors have stated explicitly that there are no conflicts of interest in connection with this article.

References

- Aguilar, P., Linsuwanont, P. (2011) Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *Journal of Endodontics*, 37, 581-587.
- American Academy of Pediatric Dentistry. (2021) Pulp therapy for primary and immature permanent teeth. The Reference Manual of Pediatric Dentistry. Chicago, Ill.: *American Academy of Pediatric Dentistry*, 399-407.
- Asgary, S., Eghbal, M.J., Shahravan, A., Saberi, E., Baghban, A.A., Parhizkar, A. (2022) Outcomes of root canal therapy or full pulpotomy using two endodontic biomaterials in mature permanent teeth: a randomized controlled trial. *Clinical oral investigations*, 26, 3287–3297.
- Asgary, S., Hassanizadeh, R., Torabzadeh, H., Eghbal, M.J. (2018) Treatment outcomes of 4 vital pulp therapies in mature molars. *Journal of Endodontics*, 44, 529-535.
- Asgary, S., Nourzadeh, M., Eghbal, M.J. (2016) Miniature pulpotomy of symptomatic mature permanent teeth: a report of two cases. *Iranian Endodontic Journal*, 11, 75–78.
- Aubeux, D., Renard, E., Pérez, F., Tessier, S., Geoffroy, V., Gaudin, A. (2021) Review of Animal Models to Study Pulp Inflammation. *Frontiers in Dental Medicine*, 2, 1-11.
- Baino, F., Hamzehlou, S., Kargozar, S. (2018) Bioactive Glasses: Where Are We and Where Are We Going? *Journal of Functional Biomaterials*, 9, 25.
- Benetti, F., Gomes-Filho, J.E., de Azevedo-Queiroz, I.O., Carminatti, M., Conti, L.C., Dos Reis-Prado, A.H., de Oliveira, S., Ervolino, E., Dezan-Júnior, E., Cintra, L. (2021) Biological assessment of a new ready-to-use hydraulic sealer. *Restorative dentistry & endodontics*, 46, 1-12.
- Bueno, C.R.E., Vasques, A.M.V., Cury, M.T.S., Sivieri-Araújo, G., Jacinto, R.C., Gomes-Filho, J.E., Cintra, L., Dezan-Júnior, E. (2019) Biocompatibility and biomineralization assessment of mineral trioxide aggregate flow. *Clinical oral investigations*, 23, 169-177.
- Caicedo, R., Abbott, P.V., Alongi, D.J., Alarcon, M.Y. (2006) Clinical, radiographic and histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulpotomies of primary teeth. *Australian Endodontic Journal*, 51, 297-305.

Çelik, N., Işcan Yapar, M., Taghizadehghalehjoughi, A., & Nalıcı, K. A. (2020). Influence of resveratrol application with pulp-capping materials on the genetic expression levels of stem cells. *International Endodontic Journal*, 53, 1253-1263.

Camilleri, J., Pitt, F.T.R. (2006) Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *International Endodontic Journal*, 39, 747-754.

Chen, L., Shen, H., Suh, B.I. (2013) Bioactive dental restorative materials: a review. *American Journal of Dentistry*, 26, 219-227.

Chen, L., Suh, B.I. (2017) Cytotoxicity and biocompatibility of resin-free and resin-modified direct pulp capping materials: a state-of-the-art review. *Dental Materials Journal*, 36, 1-7.

Cox, C.E., White, K.C., Ramus, D.L., Farmer, J.B., Snuggs, H. M. (1992) Reparative dentin: factors affecting its deposition. *Quintessence International*, 23, 257-270.

De Araújo Lopes, J.M., Benetti, F., Rezende, G.C., Souza, M.T., Conti, L.C., Ervolino, E., Jacinto, R.C., Zanotto, E.D., Cintra, L.T.A. (2020) Biocompatibility, induction of mineralization and antimicrobial activity of experimental intracanal pastes based on glass and glass-ceramic materials. *International Endodontic Journal*, 53, 1494-1505.

Eggmann, F., Gasser, T.J.W., Hecker, H., Amato, M., Weiger, R., Zaugg, L.K. (2022) Partial pulpotomy without age restriction: a retrospective assessment of permanent teeth with carious pulp exposure. *Clinical Oral Investigations*, 26, 365-373.

ElSalhy, M., Azizieh, F., Raghupathy, R. (2013) Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. *International Endodontic Journal*, 46, 573-580.

Faraco, I.M. Jr., Holland, R. (2001) Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dental traumatology: official publication of International Association for Dental Traumatology*, 17, 163-166.

Gabbai-Armelin, P.R., Renno, A.C., Crovace, M.C., Magri, A.M., Zanotto, E.D., Peitl, O., Leeuwenburgh, S.C., Jansen, J.A., Van den Beucken, J.J. Putty-like bone fillers based on CaP ceramics or Biosilicate[®] combined with carboxymethylcellulose: Characterization, optimization, and evaluation. *Journal of Biomaterials Applications*, 32, 276-288.

Gabbai-Armelin, P.R., Souza, M.T., Kido, H.W., Tim, C.R., Bossini, P.S., Fernandes, K.R., Magri, A.M., Parizotto, N.A., Fernandes, K.P., Mesquita-Ferrari, R.A.,

Ribeiro, D.A., Zanotto, E.D., Peitl, O., Renno, A.C. Characterization and biocompatibility of a fibrous glassy scaffold. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11, 1141-1151.

Gabbai-Armelin, P.R., Souza, M.T., Kido, H.W., Tim, C.R., Bossini, P.S., Magri, A.M., Fernandes, K.R., Pastor, F.A., Zanotto, E.D., Parizotto, N.A., Peitl, O., Renno, A.C. (2015) Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. *Journal of Materials Science M*, 26, 177.

Ghoddusi, J., Forghani, M., Parisay, I. (2014) New approaches in vital pulp therapy in permanent teeth. *Iranian Endodontic Journal*, 9, 15-22.

Han, N., Chen, Z., & Zhang, Q. (2016). Expression of KLF5 in odontoblastic differentiation of dental pulp cells during in vitro odontoblastic induction and in vivo dental repair. *International Endodontic Journal*, 50, 676-684.

Hanna, S.N., Perez, A.R., Prichard, J. (2020) Vital Pulp Therapy an Insight Over the Available Literature and Future Expectations. *European Endodontic Journal*, 5, 46-53.

Hench, L.L. (2006) The story of Bioglass®. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17, 967-978.

Higuchi, H., Kobayashi, A., Ikeda, K., Hatayama, K., Yanagisawa, S., Kato, K. (2017) Efficacy of β -tricalcium phosphate graft into the bone defects after bone-patellar tendon-bone anterior cruciate ligament reconstruction. *Journal of Knee Surgery*, 30, 467-473.

Hilton, T.J. (2009) Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. *Operative Dentistry*, 34, 615-625.

Holland, R., Otoboni Filho, J.A., de Souza, V., Nery, M.J., Bernabé, P.F., Dezan Júnior, E. (1998) Calcium hydroxide and corticosteroid antibiotic associations as dressing in cases of biopulpectomy. A comparative study in dog's teeth. *Brazilian Dental Journal*, 9, 67-76.

Iyer, J.V., Kanodia, S.K., Parmar, G.J., Parmar, A.P., Asthana, G., Dhanak, N.R. (2021) Comparative evaluation of different direct pulp capping agents in carious tooth: An in vivo study. *Journal of Conservative Dentistry*, 24, 283-287.

Kargozar, S., Montazerian, M., Hamzehlou, S., Kim, H.W., Baino, F. (2018) Mesoporous bioactive glasses: Promising platforms for antibacterial strategies. *Acta Biomaterialia Journal*, 81, 1-19.

Kim, D.H., Jang, J.H., Lee, B.N., Chang, H.S., Hwang, I.N., Oh, W.M., Kim, S.H., Min, K.S., Koh, J.T., Hwang, Y.C. (2018) Anti-inflammatory and Mineralization Effects of ProRoot MTA and Endocem MTA in Studies of Human and Rat Dental Pulps In Vitro and In Vivo. *Journal of Endodontics*, 44, 1534-1541.

Kogan, P., He, J., Glickman, G.N., Watanabe, I. (2006) The effects of various additives on setting properties of MTA. *Journal of Endodontics*, 32, 569-572.

Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., Yamamuro, T. (1990) Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24, 721-734.

Kokubo, T., Takadama, H. (2006) How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Biomaterials*, 27, 2907-2915.

Komabayashi, T., Zhu, Q., Eberhart, R., Imai, Y. (2016) Current status of direct pulp-capping materials for permanent teeth. *Dental Materials Journal*, 35, 1-12.

Kramer, P.R., Woodmansey, K.F., White, R., Primus, C.M., Opperman, L.A. (2014) Capping a pulpotomy with calcium aluminosilicate cement: comparison to mineral trioxide aggregates. *Journal of Endodontics*, 40, 429-34.

Littmann, E., Autefage, H., Solanki, A.K., Kallepitis, C., Jones, J.R., Alini, M., Peroglio, M., Stevens, M.M. (2018) Cobalt-containing bioactive glasses reduce human mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation despite HIF-1 α stabilisation. *Journal of the European Ceramic Society*, 38, 877-886.

Lin, G.S.S., Yew, Y.Q., Lee, H.Y., Low, T., Pillai, M.P.M., Laer, T.S., Wafa, S.W.W.S.S.T. (2022) Is pulpotomy a promising modality in treating permanent teeth? An umbrella review. *Odontology*, 110, 393-409.

Long, Y., Liu, S., Zhu, L., Liang, Q., Chen, X., Dong, Y. (2017) Evaluation of Pulp Response to Novel Bioactive Glass Pulp Capping Materials. *Journal of Endodontics*, 43, 1647-1650.

Lopes, C.S., Junqueira, M.A., Cosme-Silva, L., Pegoraro, C.O.R., Garbelini, C.C.D., Oliveira, T.M., Sakai, V.T. (2019) Initial inflammatory response after the pulpotomy of rat molars with MTA or ferric sulfate. *Journal of Applied Oral Science*, 27, 1-11.

Lourenço Neto, N., Marques, N.C., Fernandes, A.P., Rodini, C.O., Sakai, V.T., Abdo, R.C., Machado, M.A., Santos, C.F., Oliveira, T.M. (2016) Immunolocalization of dentin matrix protein-1 in human primary teeth treated with different pulp capping materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 104, 165-169.

Marciano, M.A., Camilleri, J., Lucateli, R.L., Costa, R.M., Matsumoto, M.A., Duarte, M.A. (2019) Physical, chemical, and biological properties of white MTA with additions of AlF₃. *Clinical Oral Investigations*, 23, 33-41.

Matoug-Elwerfelli, M., ElSheshtawy, A.S., Duggal, M., Tong, H.J., Nazzal, H. (2022) Vital pulp treatment for traumatized permanent teeth: A systematic review. *International of Endodontics*, 55, 613-629.

Moretti, A.B., Sakai, V.T., Oliveira, T.M., Fornetti, A.P., Santos, C.F., Machado, M.A., Abdo, R.C. (2008) The effectiveness of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide and formocresol for pulpotomies in primary teeth. *International Endodontics Journal*, 41, 547-555.

Morotomi, T., Washio, A., Kitamura, C. (2019) Current and future options for dental pulp therapy. *Japanese Dental Science Review*, 55, 5-11.

Nair, P.N.R., Duncan, H.F., Pitt, T.R.F., Luder, H.U. (2008) Histological, ultrastructural on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *International Endodontics Journal*, 41, 422-444.

Nie, S.C., Yang, K., Luan, N.N., Lian, X.L., Dai, X.H., Liang, S.X., Yan, Y.B. (2022) Unveiling the Differences in Biological Properties of Dental Pulp Stem Cells from Normal and Inflamed Pulp: A Comprehensive Comparative Study. *Medical Science Monitor*, 28, 1-19.

Okamoto, M., Takahashi, Y., Komichi, S., Ali, M., Watanabe, M., Hayashi, M. (2019) Effect of tissue inhibitor of metalloprotease 1 on human pulp cells in vitro and rat pulp tissue in vivo. *International Endodontics Journal*, 2, 1051-1062.

Oliveira, P.A., de Pizzol-Júnior, J.P., Longhini, R., Sasso-Cerri, E., Cerri, P.S. (2017) Cimetidine Reduces Interleukin-6, Matrix Metalloproteinases-1 and -9 Immunoexpression in the Gingival Mucosa of Rat Molars With Induced Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 88, 100-111.

Parhizkar, A., Asgary, S. (2021) Local drug delivery systems for vital pulp therapy: a new hope. *International Journal of Biomaterials*, 1-9.

Pedano, M.S., Li, X., Yoshihara, K., Landuyt, K.V., Van Meerbeek, B. (2020) Cytotoxicity and Bioactivity of Dental Pulp-Capping Agents towards Human Tooth-Pulp Cells: A Systematic Review of In-Vitro Studies and Meta-Analysis of Randomized and Controlled Clinical Trials. *Materials (Basel)*, 13, 1-42.

Pereira, R.D.S., Menezes, J.D., Bonardi, J.P., Griza, G.L., Okamoto, R., Hochuli-Vieira, E. (2017) Histomorphometric and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF of Biogran™ and autogenous bone graft in human maxillary sinus bone augmentation: a prospective and randomized study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 19, 867-875.

Pezelj-Ribaric, S., Anic, I., Brekalo, I., Miletic, I., Hasan, M., SimunovicSoskic, M. (2002) Detection of tumor necrosis factor α in Normal and inflamed human dental pulps. *Archives of Medical Research*, 33, 482-484.

Poggio, C., Ceci, M., Dagna, A., Beltrami, R., Colombo, M., Chiesa, M. (2015) In vitro cytotoxicity evaluation of different pulp capping materials: a comparative study. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 66, 181-188.

Prosser, H.J., Groffman, D.M., Wilson, A.D. (1982) The effect of composition on the erosion properties of calcium hydroxide cements. *Journal of Dental Research*, 61, 1431-1435.

Rodríguez-Lozano, F.J., Lozano, A., López-García, S., García-Bernal, D., Sanz, J.L., Guerrero-Gironés, J., Llena, C., Forner, L., Melo, M. (2022) Biomineralization potential and biological properties of a new tantalum oxide (Ta₂O₅)-containing calcium silicate cement. *Clinical Oral Investigations*, 26, 1427-1441.

Romero-Sánchez, L.B., Marí-Beffa, M., Carrillo, P., Medina, M.Á., Díaz-Cuenca, A. (2018) Copper-containing mesoporous bioactive glass promotes angiogenesis in an in vivo zebrafish model. *Acta Biomaterialia Journal*, 68, 272-285.

Sakai, V.T., Moretti, A.B., Oliveira, T.M., Fornetti, A.P., Santos, C.F., Machado, M.A., Abdo, R.C. (2009) Pulpotomy of human primary molars with MTA and Portland cement: a randomised controlled trial. *Brazilian Dental Journal*, 207, E5.

Sangwan, P., Sangwan, A., Duhan, J., Rohilla, A. (2013) Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. *International Endodontic Journal*, 46, 3-19.

Sivadas, S., Rao, A., Natarajan, S., Shenoy, R., Srikrishna, S.B. (2017) Pulpal Response to Ferric Sulfate and Diode Laser When Used as Pulpotomy Agent: An In vivo Study. *Journal of Medical Research*, 11, 1-5.

Song, M., Kim, S., Kim, T., Park, S., Shin, K.H., Kang, M., Park, N.H., Kim, R. (2017) Development of a Direct Pulp-capping Model for the Evaluation of Pulpal Wound Healing and Reparative Dentin Formation in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 119, 1-7.

Souza, M.T., Campanini, L.A., Chinaglia, C.R., Peitl, O., Zanotto, E.D., Souza, C.W.O. (2017a) Broad-spectrum bactericidal activity of a new bioactive grafting material (F18) against clinically important bacterial strains. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50, 6, 730-733.

Souza, M.T., Peitl, O., Zanotto, E.D. (2015) Vitreous Composition, Bioactive Vitreous Fibres and Fabrics and Articles. *WO 201 502 151 9 A1*. Patent.

Souza, M.T., Renno, A.C., Peitl, O., Zanotto, E.D. (2017b) New highly bioactive crystallization-resistant glass for tissue engineering applications. *Translational Materials Research*, 4, 1-14.

Takahashi, Y., Okamoto, M., Komichi, S., Imazato, S., Nakatsuka, T., Sakamoto, S., Kimoto, K., Hayashi, M. (2019) Application of a direct pulp capping cement containing S-PRG filler. *Clinical Oral Investigations*, 23, 1723-1731.

Takei, E., Shigetani, Y., Yoshiba, K., Hinata, G., Yoshiba, N., Okiji, T. (2014) Initial transient accumulation of M2 macrophage-associated molecule-expressing cells after pulpotomy with mineral trioxide aggregate in rat molars. *Journal of Endodontics*, 40, 1983-1988.

Tohma, A., Ohkura, N., Yoshiba, K., Takeuchi, R., Yoshiba, N., Edanami, N., Noiri, Y. (2019). Glucose Transporter 2 and 4 Are Involved in Glucose Supply during Pulpal Wound Healing after Pulpotomy with Mineral Trioxide Aggregate in Rat Molars. *Journal of Endodontics*, 46, 81-88.

Torabinejad, M., Parirokh, M. (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-part II: leakage and biocompatibility investigations. *Journal of Endodontics*, 36, 190-202.

Tran, X.V., Gorin, C., Willig, C., Baroukh, B., Pellat, B., Decup, F., Opsahl, V.S., Chaussain, C., Boukpepsi, T. (2012) Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *Journal of Dental Research*, 91, 1166-1171.

Ward, J. (2002) Vital pulp therapy in cariously exposed permanent teeth and its limitations. *Australian Endodontic Journal*, 28, 29-37.

Wolters, W.J., Duncan, H.F., Tomson, P.L., Karim, I.E., McKenna, G., Dorri, M., Stangvaltaite, L., Van der Sluis, L.W.M. (2017) Minimally invasive endodontics: a new diagnostic system for assessing pulpitis and subsequent treatment needs. *International Endodontics Journal*, 50, 825-829.

Yaemkleebua, K., Osathanon, T., Nowwarote, N., Limjeerajarus, C.N., Sukarawan, W. (2019) Analysis of hard tissue regeneration and Wnt signalling in dental

pulp tissues after direct pulp capping with different materials. *International Endodontics Journal*, 52, 1605-1616.

Yamada, M., Nagayama, M., Miyamoto, Y., Kawano, S., Takitani, Y., Tanaka, M., Ehara, M., Nakao, J., Ochiai, T., Shibukawa, Y., Yoshida, T. (2021) Mineral trioxide aggregate (MTA) upregulates the expression of dmp1 in direct pulp capping in the rat molar. *Materials (Basel)*, 18, 4640.

Yazdani, S., Jadidfard, M.P., Tahani, B., Kazemian, A., Dianat, O., Alim Marvasti, L. (2014) Health technology assessment of CEM pulpotomy in permanent molars with irreversible pulpitis. *Iranian Endodontic Journal*, 9, 23-29.

Zafar, K., Nazeer, M.R., Ghafoor, R., Khan, F.R. (2020) Success of pulpotomy in mature permanent teeth with irreversible pulpitis: a systematic review. *Journal of Conservative Dentistry*, 23, 121-125.

5 CONCLUSÃO

O capeamento pulpar direto é um tratamento da polpa vital exposta com um biomaterial, para proteger o tecido, induzir a formação de dentina terciária, e manter a polpa vital. Os materiais de capeamento pulpar mais comumente utilizados em clínica são HC e Agregado de Trióxido Mineral (MTA, do inglês *Mineral Trioxide Aggregate*), ou outros materiais biocerâmicos com mecanismo de ação semelhante. No entanto, ambos os materiais apresentam deficiências e/ou desvantagens, não havendo ainda um material capeador ideal.

Este foi o primeiro estudo recente a avaliar a resposta do tecido pulpar frente a formulações de pastas à base de biovidros, o F18 e F18Co. Os resultados demonstraram inflamação e desorganização tecidual mais acentuadas com os biovidros. Não houve diferença significativa com o HC, mas esta diferença foi presente ao se comparar os biovidros com o grupo controle.

Os biovidros são materiais reabsorvíveis ao longo do tempo, que podem ser substituídos pelos tecidos em contato, à medida que estes se regeneram. Fatores relacionados às características dos biovidros aqui utilizados, como tamanho de partículas e período de reabsorção, assim como fatores relacionados ao próprio estudo, como o tempo de análise mais curto (até 15 dias), podem ter influenciado estes resultados. Várias formulações de biovidro estão disponíveis, e outras formulações ainda precisam ser avaliadas.

Uma limitação a se considerar, é que o presente estudo utilizou um modelo animal de polpa sã, sem inflamação, apesar de clinicamente pulpotomia e capeamento pulpar serem indicados para dentes com polpa inflamada, quando se trata de lesão cáriosa na população jovem. Ainda, o tecido pulpar avaliado no modelo de camundongos possui uma área pequena, o que pode dificultar a análise dos resultados e limita o contato do material com a polpa dentária.

Estudos *in vivo* utilizando modelos murinos apresentam vantagens como facilidade no manuseio e transporte, custo acessível em comparação com outros animais, e facilidade de padronização e reprodução dos estudos. Contudo, é necessário que haja cautela para não extrapolar os resultados obtidos em modelo animal para a clínica, pois determinada resposta encontrada em murinos pode não ocorrer da mesma maneira no tecido pulpar em humanos.

REFERÊNCIAS

ASGARY, S. *et al.* Clinical applications of hydraulic calcium silicate-based biomaterials in paediatric endodontics. **Endodontic Practice Today**, v. 14, n. 3, p. 229-241, 2020.

American Association of Endodontists. **AAE Clinical Consideration for a Regenerative Procedure**. Chicago, 1 abr. 2018. Disponível em: <https://f3f142zs0k2w1kg84k5p9i1o-wpengine.netdna-ssl.com/specialty/wpcontent/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo_AsOfApril2018.pdf>. Acesso em: 02 mai. 2022.

ANDREI, M. *et al.* The effect of calcium-silicate cements on reparative dentinogenesis following direct pulp capping on animal models. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2725, 2021.

AUBEUX, D. *et al.* Review of Animal Models to Study Pulp Inflammation. **Frontiers in Dental Medicine**, v. 673552, 2021.

BAINO, F. Bioactive glasses - When glass science and technology meet regenerative medicine. **Ceramics International**, v. 44, n. 13, 2018.

BENETTI, F. *et al.* Biocompatibility, Biomineralization, and Maturation of Collagen by RTR[®], Bioglass and DM Bone[®] Materials. **Brazilian Dental Journal**, v. 31, n. 5, p. 477-484, 2020.

BENETTI, F. *et al.* Concentration-dependent effect of bleaching agents on the immunolabeling of interleukin-6, interleukin-17, and CD5-positive cells in the dental pulp. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 7, p. 789-799, 2018.

BENETTI, F. *et al.* Hydrogen peroxide induces cell proliferation and apoptosis in pulp of rats after dental bleaching in vivo. **Archives Oral Biology**, v. 81, p. 103-109, 2017.

BENETTI, F. *et al.* Presence of osteocalcin, osteopontin, and reactive oxygen species-positive cells in pulp tissue after dental bleaching. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 5, p. 665-675, 2019a.

- BENETTI, F. *et al.* Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containing calcium hydroxide. **Brazilian Oral Research**, v.33, n. 42, 2019.
- BERGENHOLTZ, G. *et al.* Treatment of pulps in teeth affected by deep caries - A systematic review of the literature. **Singapore Dental Journal**, v. 34, p. 1-12, 2013.
- BJØRNDAL, L. *et al.* Management of deep caries and the exposed pulp. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 7, p. 949-973, 2019.
- BJØRNDAL, L. *et al.* Randomized clinical trials on deep carious lesions: 5-year follow-up. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 7, p. 747-753, 2017.
- BJØRNDAL, L. *et al.* Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. Direct complete excavation, and direct pulp capping vs. Partial pulpotomy. **European Journal of Oral Sciences**, v. 118, n. 3, p. 290-7, 2010.
- BRACKS, I. V. *et al.* Effect of ethylenediaminetetraacetic acid irrigation on immune-inflammatory response in teeth submitted to regenerative endodontic therapy. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 10, p. 1457-1465, 2019.
- BRAGA DINIZ, J. M. *et al.* Immunological profile of periapical endodontic infection in patients undergoing hematopoietic transplantation. **Clinical oral investigations**, v.14, 2020.
- BRAUER, D. S. Bioactive Glasses-Structure and Properties. **Angewandte Chemie International**, v. 54, p. 4160-4181, 2015.
- BRIZUELA, C. *et al.* Inflammatory biomarkers in dentinal fluid as an approach to molecular diagnostics in pulpitis. **International Endodontic Journal**, v. 53, p. 1181-91, 2020.
- BRODÉN, J. *et al.* Direct pulp capping versus root canal treatment in young permanent vital teeth with pulp exposure due to caries. A systematic review. **American Journal of Dentistry**, v. 29, n. 4, p. 201-207, 2016.

- CAIRES, N. C. M. *et al.* Epidemiological analysis and need for endodontic treatment among the indigenous Sateré-Mawé and Tikuna. **Brazilian oral research**, v. 32, n. 19, 2018.
- CHEN, J. Q.; DONG, Y. M. Research progress in vital pulp therapy in mature permanent teeth with carious pulp exposure. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 57, n. 1, p. 95-100, 2022
- COHENCA, N.; PARANJPE, A.; BERG, J. Vital pulp therapy. **Dental Clinics of North America**, v. 57, n. 1, p. 59-73, 2013.
- CUSHLEY, S. *et al.* Efficacy of direct pulp capping for management of cariously exposed pulps in permanent teeth: a systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, v. 54, n. 4, p. 556-571, 2021.
- DA ROSA, W. L. O. *et al.* Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 106, n. 3, p. 1358-1368, 2018.
- DE ARAÚJO LOPES, J. M. *et al.* Biocompatibility, induction of mineralization and antimicrobial activity of experimental intracanal pastes based on glass and glass-ceramic materials. **International Endodontic Journal**, v. 53, n. 11, p. 1494-1505, 2020.
- DE BRITO, L. C. N. *et al.* Immunological profile of periapical endodontic infections from HIV- and HIV+ patients. **International Endodontic Journal**, n. 48, n. 6, p. 533-541, 2015.
- DELFINO, C. S. *et al.* Uso de novos materiais para o capeamento pulpar. **Cerâmica**, v. 56, p. 381-388, 2010.
- DUNCAN, H. F. Present status and future directions-Vital pulp treatment and pulp preservation strategies. **International Endodontic Journal**, v. 55, n. 3, p. 497-511, 2022.
- ELHAMOULY, Y. *et al.* Tailored 70S30C Bioactive glass induces severe inflammation as pulpotomy agent in primary teeth: an interim analysis of a

randomised controlled trial. **Clinical oral investigations**, v. 25, n. 6, p. 3775-3787, 2021.

European Society of Endodontology (ESE) developed by: Duncan HF, Galler KM, Tomson PL et al. European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. **International Endodontic Journal**, n. 52, v. 7, p. 923-934, 2019.

FARGES, J. C. *et al.* Dental pulp defence and repair mechanisms in dental caries. **Mediators of Inflammation**, p. 1-16, 2015.

GABBAI-ARMELIN, P. R. *et al.* Putty-like bone fillers based on CaP ceramics or Biosilicate[®] combined with carboxymethylcellulose: Characterization, optimization, and evaluation. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 32, n. 2, p. 276-288, 2017a.

GABBAI-ARMELIN, P. R. *et al.* Characterization and biocompatibility of a fibrous glassy scaffold. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 11, p. 1141-51, 2017b.

GABBAI-ARMELIN, P. R. *et al.* Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, p.177, 2015.

GALLER, K. M. *et al.* EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. **International Endodontic Journal**, v. 49, n. 6, p. 581-90, 2016.

GAVIÑO-ORDUÑA, J. F. *et al.* Crescimento dentinário após capeamento pulpar direto com as diferentes frações de plasma rico em fatores de crescimento (PRGF) vs. MTA: estudo experimental em modelo animal. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 15, p. 3432, 2021.

GERHARDT, L. C.; BOCCACCINI, A. R. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Materials (Basel)**, v.3, p. 3867-3910, 2010.

GIRAUD, T. *et al.* Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. **Dental Materials Journal**, v. 35, n. 1, p. 24-35, 2019.

GORUSTOVICH, A. A.; ROETHER, J. A.; BOCCACCINI, A. R. Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of *in vitro* and *in vivo* evidences. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 16, p. 199, 2010.

HAN, N.; CHEN, Z.; ZHANG, Q. Expression of KLF5 in odontoblastic differentiation of dental pulp cells during *in vitro* odontoblastic induction and *in vivo* dental repair. **International Endodontic Journal**, v. 50, n. 7, p. 676-684, 2017.

HANNA, S. N.; PEREZ, A. R.; PRICHARD, J. Vital Pulp Therapy an Insight Over the Available Literature and Future Expectations. **European Endodontic Journal**, v. 5, n. 1, p. 46-53, 2020.

HASHEMINIA, S. M. *et al.* A comparative study of three treatment methods of direct pulp capping in canine teeth of cats: a histologic evaluation. **Lasers in Medical Science**, v. 25, p. 9-15, 2010.

HE, W. X.; YU, Q. New advances in vital pulp therapy and pulp regeneration for the treatment of pulpitis: from basic to clinical application. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 57, n. 1, p. 16-22, 2022.

HE, Y. *et al.* Pulpal Tissue Inflammatory Reactions after Experimental Pulpal Exposure in Mice. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 1, p. 90-95, 2017.

HENCH, L. L.; JONES, J. R. **Biomaterials, artificial organs and tissue engineering**. Woodhead Publishing Limited, USA, 2008.

HENCH; WILSON, J. An introduction to bioceramics. **Singapore: World Scientific**, p. 386, 1991.

HILTON, T. J. Keys to Clinical Success with Pulp Capping: A Review of the Literature. **Operative Dentistry**, v. 34, n. 5, p. 615-625, 2009.

HOLLAND, R. *et al.* Reaction of human periapical tissue to pulp extirpation and immediate root canal filling with calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 3, p. 63-67, 1977.

IGNA, A. *et al.* Vital Pulp Therapy in Primary Dentition: Pulpotomy-A 100-Year Challenge. **Children (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 10, p. 841, 2021.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 4457-4486, 2013.

KANG, C. M. *et al.* A randomized controlled trial of various MTA materials for partial pulpotomy in permanent teeth. **Journal of Dentistry**, v. 60, p. 8-13, 2017.

KAUR, B. *et al.* A Mini Review: The Potential Biomarkers for Non-invasive Diagnosis of Pulpal Inflammation. **Frontiers in Dental Medicine**, v. 2, n. 718445, 2021.

KERMANI, F. *et al.* Strontium- and Cobalt-Doped Multicomponent Mesoporous Bioactive Glasses (MBGs) for Potential Use in Bone Tissue Engineering Applications. **Materials (Basel)**, v. 13, n. 6, p. 1348, 2020.

KIM, DH. *et al.* Anti-inflammatory and Mineralization Effects of ProRoot MTA and Endocem MTA in Studies of Human and Rat Dental Pulp *In Vitro* and *In Vivo*. **Journal of Endodontics**, v. 44, n. 10, p.1534-1541, 2018.

KOKUBO, T.; KIM, H. M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, p. 2161-2175, 2003.

KOMABAYASHI, T. *et al.* Current status of direct pulp-capping materials for permanent teeth. **Dental Materials Journal**, v. 35, n. 1, p. 1-12, 2016.

LEONG, D. J. X.; YAP, A. U. Vital pulp therapy in carious pulp-exposed permanent teeth: an umbrella review. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n. 12, p. 6743-6756, 2021.

LIN, Y. *et al.* Effect of copper-doped silicate 13-93 bioactive glass scaffolds on the response of MC3T3-E1 cells *in vitro* and on bone regeneration and

angiogenesis in rat calvarial defects *in vivo*. **Materials Science and Engineering**, v. 1, n. 67, p. 440-452, 2016.

LONG, Y. *et al.* Evaluation of Pulp Response to Novel Bioactive Glass Pulp Capping Materials. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 10, p. 1647-1650, 2017.

LOURENÇO-NETO, N. *et al.* Immunolocalization of dentin matrix protein-1 in human primary teeth treated with different pulp capping materials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 104, n. 1, p. 165-169, 2016.

MACHADO, M. A. A. M. *et al.* Pulp repair response after the use of a dentin-pulp biostimulation membrane (BBio) in primary teeth: study protocol for a randomized clinical trial. **Trials**, v. 22, n. 1 p. 874, 2020.

MARINHO, A. C. *et al.* Proinflammatory Activity of Primarily Infected Endodontic Content against Macrophages after Different Phases of the Root Canal Therapy. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 6, p. 817-23, 2015.

MARQUES, M.S.; WESSELINK, P. R.; SHEMESH, H. Outcome of direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: A prospective study. **Journal of Endodontics**, v. 41, p. 1026–1031, 2015.

MENTE, J. *et al.* Mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: An analysis of the clinical treatment outcome. **Journal of Endodontics**, v. 36, p. 806–813, 2010.

MESCHI, N.; PATEL, B.; RUPAREL, N. B. Material Pulp Cells and Tissue Interactions. **Journal of Endodontics**, v. 46, n. 9, p. 150-160, 2020.

MODENA, K. C. S. *et al.* Citotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. **Journal of Applied Oral Science**, v.17, n. 6, p. 544-54, 2009.

NAKAHARA, H. *et al.* Anti-interleukin-6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 48, p. 1521–9, 2003.

NARUPHONTJIRAKUL, P.; PORTER, A. E.; JONES, J. R. *In vitro* osteogenesis by intracellular uptake of strontium containing bioactive glass nanoparticles.

Acta Biomaterialia, 2017.

OKAMOTO M. *et al.* Effect of tissue inhibitor of metalloprotease 1 on human pulp cells *in vitro* and rat pulp tissue *in vivo*. **International Endodontic Journal**, v. 2, n. 7, p. 1051-1062, 2019.

OONISHI, H. *et al.* Comparative bone growth behaviour in granules of bioceramic materials of various sizes. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 44, n. 1, p. 31-43, 1999.

OSORIO, R. *et al.* Experimental resin cements containing bioactive fillers reduce matrix metalloproteinase-mediated dentin collagen degradation. **Journal of Endodontics**, v. 38, p. 1227-1232, 2012.

PARHIZKAR, A.; ASGARY, S. Local drug delivery systems for vital pulp therapy: a new hope. **International Journal of Biomaterials**, v. 15, n. 5584268, 2021.

PARIS, S. *et al.* Gene expression of human beta-defensins in healthy and inflamed human dental pulps. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 520-3, 2009.

PARISAY, I.; GHODDUSI, J.; FORGHANI, M. A review on vital pulp therapy in primary teeth. **Iranian Endodontic Journal**, v. 10, p. 6–15, 2015.

PAULA, A. *et al.* Evaluation of dentinogenesis inducer biomaterials: an *in vivo* study. **Journal of Applied Oral Science**, v. 28, 2019.

PINTADO-PALOMINO, K.; TIRAPELLI, C. The effect of home-use and in-office bleaching treatments combined with experimental desensitizing agents on enamel and dentin. **European Journal of Dentistry**, v. 9, p. 66-73, 2015.

PIRES, E. G., *et al.* Silver-doped 58S bioactive glass as an anti-Leishmania agent. **International Journal of Applied Glass Science**, v. 1, p. 52-61, 2017.

POLAK, J. M. *et al.* Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass(R) 45S5 dissolution. **Journal of Biomedical Science**, v. 55, p. 151, 2001.

RENNO, A. C. *et al.* Characterization and in vivo biological performance of biosilicate. **BioMed Research International**, p. 1-7, 2013.

ROMERO-SÁNCHEZ, L. B., *et al.* Copper-containing mesoporous bioactive glass promotes angiogenesis in an *in vivo* zebrafish model. **Acta Biomaterialia**, 2018.

SAGHIRI, M. A. *et al.* Effect of biomaterials on angiogenesis during vital pulp therapy. **Dental Materials Journal**, v. 35, p. 701-709, 2016.

SANTOS, J. M. *et al.* Vital pulp therapy in permanent mature posterior teeth with symptomatic irreversible pulpitis: a systematic review of treatment outcomes. **Medicina (Kaunas)**, v. 3, n. 57, p. 573, 2021.

SCHRODER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. **Journal of Dental Research**, v. 64, p. 541-548, 1985.

SHAPOFF, C. A.; ALEXANDER, D. C.; CLARK, A. E. Clinical use of a bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 18, n. 4, p. 352-354, 356, 358, 1997.

SILVA, A. C. *et al.* Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. **Journal of Applied Oral Science**, v. 17, p. 527-32, 2009.

SKALLEVOLD, H. E. *et al.* Bioactive Glass Applications in Dentistry. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 5960, 2019.

SONG, M. *et al.* Development of a Direct Pulp-capping Model for the Evaluation of Pulpal Wound Healing and Reparative Dentin Formation in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 119, n. 54973, 2017.

SOUZA, M.T.; PEITL, O.; ZANOTTO, E.D. Vitreous Composition, Bioactive Vitreous Fibres and Fabrics and Articles. 2015. WO 201 502 151 9 A1. Patent.

SOUZA, M. T. *et al.* Broad-spectrum bactericidal activity of a new bioactive grafting material (F18) against clinically important bacterial strains.

International Journal of Antimicrobial Agents, v. 50, n. 6, p. 730-733, 2017a.

SOUZA, M.T.; RENNO, A.C.; PEITL, O.; ZANOTTO, E.D. Resistant glass for tissue enginee - New highly bioactive crystallization ring applications.

Translational Materials Research, v. 4, n. 1, p. 1-37, 2017b.

STÄHLI, C. *et al.* Effect of ion release from Cu-doped 45S5 Bioglass® on 3D endothelial cell morphogenesis. **Acta Biomaterialia**, v. 19, p. 15-22, 2015.

SUEYAMA, Y. *et al.* Implantation of Endothelial Cells with Mesenchymal Stem Cells Accelerates Dental Pulp Tissue Regeneration/Healing in Pulpotomized Rat Molars. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 6, p. 943-948, 2017.

TAHA, N. A.; AL-KHATIB, H. 4-year follow-up of full pulpotomy in symptomatic mature permanent teeth with carious pulp exposure using a stainproof calcium silicate-based material. **Journal of Endodontics**, v. 48, n. 1, p. 87-95, 2022.

TAHA, N. A.; KHAZALI, M. A. Partial pulpotomy in mature permanent teeth with clinical signs indicative of irreversible pulpitis: a randomized clinical trial.

Journal of Endodontics, v. 43, n. 9, p. 1417-1421, 2017.

TAKAHASHI, Y. *et al.* Application of a direct pulp capping cement containing S-PRG filler. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 4, p. 1723-1731, 2019.

TAKEI, E. *et al.* Initial transient accumulation of M2 macrophage-associated molecule-expressing cells after pulpotomy with mineral trioxide aggregate in rat molars. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 12, p. 1983-8, 2014.

TANCHAROEN, S. *et al.* Overexpression of receptor for advanced glycation end products and high-mobility group box 1 in human dental pulp inflammation.

Mediators of Inflammation, p. 1-13, 2014.

TIRAPELLI, C.; PANZERI, H.; LARA, E. H. The effect of a novel crystallised bioactive glass-ceramic powder on dentine hypersensitivity: a long-term clinical study. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 38, p. 253-262, 2011.

TRAN, X. V. *et al.* Reparative mineralized tissue characterization after direct pulp capping with calcium-silicate-based cements. **Materials (Basel)**, v. 12, n. 13, p. 2102, 2019.

TZIAFAS, D. Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. **International Endodontics Journal**, v. 27, n. 2, p. 61-74, 1994.

WANG, S. *et al.* Characteristics and Effects on Dental Pulp Cells of a Polycaprolactone/Submicron Bioactive Glass Composite Scaffold. **Journal of Endodontics**, v. 42, p. 1070-1075, 2016.

WASHIO, A. *et al.* Physicochemical properties of newly developed bioactive glass cement and its effects on various cells. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 103, n. 2, p. 373-80, 2015.

YAEMKLEEBBUA, K. *et al.* Analysis of hard tissue regeneration and Wnt signalling in dental pulp tissues after direct pulp capping with different materials. **International Endodontics Journal**, v. 52, n. 11, p. 1605-1616, 2019.

ZANINI, M.; HENNEQUIN, M.; COURSON, P. Y. Which procedures and materials could be applied for full pulpotomy in permanent mature teeth? A systematic review. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 77, n. 7, p. 541-551, 2019.

ZHENG, X. *et al.* Hypoxia-mimicking 3D bioglass-nanoclay scaffolds promote endogenous bone regeneration. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 10, p. 3485-3495, 2021.

ANEXO

ANEXO - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Análise da resposta do tecido pulpar frente a pastas experimentais de materiais vitro-cerâmicos após capeamento pulpar direto", protocolo do CEUA: 8/2020 sob a responsabilidade de Francine Benetti que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 11/05/2020.

Vigência da Autorização	11/05/2020 a 10/05/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/C
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/C
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/C
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / Balb/C
Nº de animais	8
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais

Considerações posteriores:

11/05/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 11/05/2020. Validade: 11/05/2020 à 10/05/2025.
------------	--

Belo Horizonte, 08/11/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceu/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceu - ceua@prpq.ufmg.br