



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - NÍVEL: DOUTORADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA**

**EFEITO BIOLÓGICO DO BIODENTINE® E DO MTA SOBRE EXPOSIÇÃO DE  
TECIDO PULPAR E PERIODONTAL DA FURCA: ESTUDO EM RATOS**

**BIOLOGICAL EFFECT OF BIODENTINE® AND MTA ON RATS´ DENTAL PULP  
AND FURCAL PERIODONTAL TISSUES**

**MAGDA DE SOUSA REIS**

**PORTO ALEGRE, 2015**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - NÍVEL: DOUTORADO**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA**

**EFEITO BIOLÓGICO DO BIODENTINE® E DO MTA SOBRE EXPOSIÇÃO DE  
TECIDO PULPAR E PERIODONTAL DA FURCA: ESTUDO EM RATOS**

**Linha de pesquisa**

Etioopatogênese e tratamento das doenças periodontais e periapicais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, na área de concentração de Endodontia.

**MAGDA DE SOUSA REIS**

**Orientador: Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo**  
**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Kochenborger Scarparo**

**Porto Alegre, setembro de 2015**

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

R375e Reis, Magda de Sousa  
Efeito biológico do biodentine® e do MTA sobre exposição  
de tecido pulpar e periodontal da furca : estudo em ratos / Magda  
de Sousa Reis. — Porto Alegre, 2015.  
90 f. : il.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em  
Odontologia, Área de concentração em Endodontia, Faculdade  
de Odontologia, PUCRS, 2015.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo.  
Co-orientador: Profa. Dra. Roberta Kochenborger Scarparo.

1. Endodontia. 2. Cimentos Dentários. 3. Biodentine.  
4. Silicato Tricálcio. 5. Agregado Trióxido de Mineral (MTA).  
6. Perfurações de Furca (Odontologia). 7. Agentes de  
Capeamento da Polpa Dentária e Pulpectomia. 8. Ratos Wistar.  
I. Figueiredo, José Antonio Poli de. II. Scarparo, Roberta  
Kochenborger. III. Título.

CDD: 617.643

*Eu fico com a pureza da resposta das crianças*

*É a vida. É bonita e é bonita*

*Viver e não ter a vergonha de ser feliz*

*Cantar a beleza de ser um eterno aprendiz*

**Trechos de: O que é, o que é? - Gonzaguinha**

## **Dedicatória**

Aos que vivenciaram e me encorajaram nesta jornada.

Querido filho **Vitor Arthur Schmidt**, o tempo passou e você tornou-se exemplo vivo da construção do conhecimento passo a passo. Obrigada por suportar minhas ausências. Amo você!

Amado **João Pedro Schmidt**, meu grande companheiro de bons e maus momentos. Obrigada pela convivência harmoniosa mesmo diante de tanta ansiedade, e por me incentivar e lembrar o objetivo principal deste trabalho.

Minha amada mãe **Vilma**. Minha grande amiga e meu braço direito. Sua coragem e fé diante das dificuldades é exemplo de vida.

Querido pai **Agostinho**. Meu eterno incentivador, sua torcida foi importante mesmo que distante. “Minha herança” está garantida: tive acesso ao caminho do saber.

A **todos meus familiares e amigos**, pelo incentivo e compreensão inesgotáveis. Cada um, do seu jeito, contribuiu para que eu chegasse a este momento.

Recebam meu reconhecimento, gratidão e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Companheirismo e amizade são valores inestimáveis. Agradeço aos colegas da Endodontia, com quem compartilhei momentos importantes: **Carolina Cucco, Cauana Oliva Tavares, Gabriela Xavier Fagundes, Daiana Flores Gonçalves Giannastasio, Luiza Wessel, Grasiela Sabrina Longhi Grundling, Gustavo Golgo Kunert, Flávia Vilella Laurindo, Tiago André Fontoura de Melo, Helena Fetter Fellipini e Rafael Chies Hartmann.** Valeu estar com vocês. Obrigada pelo carinho.

A **todos os professores do Programa de Pós-Graduação da PUCRS** pelo estímulo a permanente formação científica calcada numa reflexão crítica. Através de vocês pude oxigenar minha prática docente na Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Recebam meu agradecimento a todos vocês, ao lembrar a simplicidade e a alegria da professora **Maria Martha Campos.**

Para desenvolver a pesquisa, foram necessárias muitas pessoas alocadas em diferentes espaços. Agradeço os vários professores do Curso de Odontologia da PUCRS por onde circulei em diversos momentos no transcorrer do doutoramento. De forma especial aos colegas e professores das disciplinas de Endodontia: **Maristela Gutierrez de Borba; Alexandre Correa Ghisi, Silvana Beltrami Gonçalves Waltrick, Nicole de Mello Rahde, Maximiliano Schunke Gomes e José Antônio Poli de Figueiredo.** Meu agradecimento à **profª Sandra Delgado Pagnocelli** e demais professores do Estágio em Clínica Integrada Infantil e Adolescente, por experienciar as atividades ali desenvolvidas. Minha lembrança e agradecimento às colegas **Fabiana Viera Vier-Pelisser, Renata Dornelles Morgental e Daiana Elisabeth Bottcher** pela convivência e contribuições para este trabalho.

Aos **funcionários, técnicos, bolsistas, mestrandos e doutorandos** vinculados ao **Instituto de Toxicologia e Farmacologia (INTOX) e Laboratório de Farmacologia Aplicada 01.** Todos muito prestativos ao dividir o ambiente de trabalho e auxiliar na aquisição, recepção e cuidados para o modelo experimental deste trabalho. Destaco entre eles: **Isaque de Sousa Maciel, Caroline Klein e Keisiane Mayra da Costa.** Muito obrigada pela confiança e desprendimento.

Ao longo do trabalho cultivei a paciência para acompanhar as mudanças dos ambientes do Biotério e do local de execução do experimento. A ansiedade foi

minimizada por entender fluxos burocráticos institucionais e por ser bem recebida por onde passei. Agradeço às **funcionárias do Biotério da PUCRS** pela dedicação e cuidado com os animais.

Por fim, reconheço e agradeço muitíssimo aos colegas que diretamente me auxiliaram durante o experimento em diferentes etapas: **Carolina Cucco, Gabriela Xavier Fagundes, Grasiela Sabrina Longhi Grundling, Cauana Oliva Tavares, Rafael Chies Hartmann** e à bolsista de iniciação científica **Juliana Bolzan**, agora colega cirurgiã-dentista.

Obrigada professora **Maria Ivete Bolzan** e equipe da radiologia (professor e funcionárias) do **Laboratório de Radiologia da PUCRS**, no auxílio direto na captura e processamento das imagens radiográficas.

Muito obrigada **Luciana Adolfo** Ferreira e professores responsáveis pelo **Laboratório de Patologia da PUCRS**. A disponibilidade e a divisão do espaço foram fundamentais para o acervo de imagens histológicas que compuseram este trabalho.

Agradeço a gentileza de **todos os funcionários dos diversos setores do Curso de Odontologia da PUCRS**. Vocês tornaram o meu dia-a-dia nesta instituição ainda mais leve. Ao **Programa de Pós-Graduação da PUCRS** pelo incentivo através da bolsa de estudo.

Meu agradecimento à **Universidade de Santa Cruz Do Sul (UNISC)**, pelo apoio e incentivo à minha formação. Ao **Laboratório de Histologia da UNISC**, pela recepção e acolhimento, em especial ao **Joel Ellwanger, Danieli Rosane Dalle mole** e à bolsista e estudante do curso de Odontologia da UNISC, **Manoela Gonçalves da Silva**, pelo processamento histológico e organização das amostras desta pesquisa. Ao cuidado de **Patrícia Molz e Vanessa Kannenberg** para os ajustes técnicos desta tese. Muito obrigada. A trajetória de vocês está marcada pelo profissionalismo, competência e com certeza muito sucesso.

A **todos meus colegas, professores do Departamento de Enfermagem e Odontologia**, em especial meus parceiros da Endodontia: **Márcia Helena Wagner, Ronise Ferreira Dotto e Daniel Renner**, pela torcida e companheirismo na divisão das atividades. Agradeço muito ao colega **Fernando Branco Barletta** pelo incentivo e motivação para a contínua formação da nossa equipe.

Obrigada queridas amigas (gurias) **Beatriz Baldo Marques, Gladis Benjamina Grazziotin e Renita Baldo Moraes**, pelo apoio reforçado e constante.

A **todos os estudantes e funcionários da Odontologia da UNISC**. Que a pesquisa seja também minha fonte de inspiração no processo de ensino e aprendizagem.

E assim, de Minas Gerais (MG) para o Rio Grande do Sul (RS), vou transitando do *uai* ao *tchê*. O RS se tornou meu lar e posso agora parafrasear os gaúchos Kleiton e Kledir: andei pelas ruas de um porto e experimentei novos ares. Porto Alegre é demais! **Obrigada meu Deus por mais esta experiência de vida.**



## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Agradeço ao meu orientador **José Antônio Poli de Figueiredo**, pela convivência fraterna e motivadora. Você é um eterno entusiasta do ensino e da Odontologia. Defensor do foco e da persistência. Sorriso nos lábios é o seu lema. Simples assim! Muitíssimo obrigada pela orientação e permanente disposição. Jamais esquecerei.

À minha co-orientadora **Roberta Kochenborger Scarparo**, obrigada pela dedicação, parceria, apoio científico e estímulo para aprender coisas novas. Foi um prazer vivenciar ao longo destes anos os enfrentamentos e desafios de sua vida profissional. Parabéns pelas conquistas.

Vocês compuseram uma interessante dupla para minha orientação. Muito obrigada pelo apoio quando precisei tomar importantes decisões que envolviam o valor das coisas e das pessoas.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	22
2.1 Geral.....	22
2.2 Específicos .....	22
<b>3 HIPÓTESE EXPERIMENTAL</b> .....	22
3.1 Hipótese de nulidade.....	22
<b>4 ARTIGO 01</b> .....	23
Rats' pulpal response after capping with conventional mineral trioxide aggregate (MTA) or a tricalcium silicate based-material (Biodentine™)	
<b>5 ARTIGO 02</b> .....	45
Rat's periodontal response after furcal perforation using conventional mineral trioxide aggregate (MTA) or a tricalcium silicate based-material (Biodentine™)	
<b>6 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	63
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
<b>ANEXOS</b> .....	83

*Há duas formas para viver a vida.  
Uma é acreditar que não existe milagre.  
Outra é acreditar que todas as coisas são um milagre.*

**Fernando Pessoa**

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar a resposta tecidual, após pulpotomias e perfurações de furca, utilizando agregado trióxido de mineral (MTA) e o material à base de silicato tricálcico (Biodentine<sup>®</sup>). Os primeiros molares inferiores de 140 ratos *Wistar* machos foram utilizados em dois tempos (14 e 21 dias) e divididos em grupos conforme o experimento e materiais utilizados (pulpotomia n=8 e perfuração de furca n=6). Nos dois experimentos, grupos capeados e selados com MTA e Biodentine<sup>®</sup> foram restaurados com amálgama de prata; um grupo adicional utilizou somente Biodentine<sup>®</sup> e o controle positivo recebeu guta-percha e restauração de amálgama; dentes intactos serviram de controle negativo. No experimento de pulpotomias, realizou-se exame macroscópico e radiográfico do selamento coronário e exame histológico dos eventos inflamatórios (intensidade e extensão), degenerativos e de formação de barreira mineralizada. No experimento de perfurações de furca, foram avaliados histologicamente os eventos inflamatórios (intensidade e extensão), de reabsorção óssea e reparo de cimento. Os dados foram comparados através da análise de variância (ANOVA) e *posthoc* de Tukey ( $p < .05$ ). Nas pulpotomias, o Biodentine<sup>®</sup> e MTA apresentaram resultados satisfatórios, com menor resposta inflamatória ( $p < .0001$ ) e pronunciada formação de barreira mineralizada ( $p < .0001$ ) comparada aos dentes do controle positivo. O Biodentine<sup>®</sup>, utilizado como restauração, manteve o selamento coronário em apenas 37.5% das amostras. Nas perfurações de furca, o Biodentine e MTA apresentaram resultados satisfatórios, caracterizados por uma resposta inflamatória mais suave em comparação ao controle positivo, independentemente do material utilizado para o selamento coronário e período experimental avaliado ( $p < .0001$ ). Todos os grupos testes mostraram menor reabsorção óssea do que o controle positivo após 21 dias ( $p < .05$ ), sendo esta diferença mais acentuada em dentes restaurados com amálgama de prata. A reparação de cimento ocorreu em 30% das amostras de MTA e Biodentine, e não foi detectada em qualquer amostra do grupo do controle positivo. Concluiu-se que houve respostas similares após o uso de Biodentine<sup>®</sup> e MTA no capeamento da polpa exposta e selamento de perfurações de furca. Por outro lado, o uso do Biodentine<sup>®</sup> como material restaurador provisório não promoveu selamento coronário eficiente. Embora sejam necessárias novas investigações, o Biodentine deve ser considerado como uma alternativa frente aos tratamentos propostos.

**Palavras-chave:** Biodentine, material à base de silicato tricálcico, agregado trióxido de mineral (MTA), materiais bioativos, materiais capeadores pulpare, terapia da polpa vital, perfurações de furca, reparo.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate dental pulp and furcal periodontal tissue responses to mineral trioxide aggregate (MTA) and to a calcium silicate-based material (Biodentine™). The lower first molars in hundred forty (140) male *Wistar* rats were divided into groups according to the experimental site and period (14 and 21 days) testing two materials (n=8 per group/period in pulpotomy and n=6 per group/period in furcal perforation). Groups capped and sealed with MTA or Biodentine™ were restored with silver amalgam; in an additional test group, teeth were capped and restored with Biodentine™. Teeth capped with gutta-percha and restored with silver amalgam served as a positive control and untouched teeth were negative control. Histological evaluation of pulp responses and macroscopic examination of coronal sealing were performed. Inflammation extension and intensity, degenerative events and formation of mineralized tissue barrier were assessed. In the experiment of furcal perforations, inflammation extension and intensity, bone resorption and cement formation were assessed histologically. All results underwent ANOVA and Tukey *post hoc* tests ( $p < .05$ ). In pulpotomy, Biodentine™ and MTA presented satisfactory results, which were characterized by a mild inflammatory response ( $p < .0001$ ) and more pronounced formation of mineralized barrier ( $p < .0001$ ) compared to teeth capped with gutta-percha. When used as a restorative material, Biodentine™ kept coronal sealing in only 37.5% of the samples. As to furcal perforations, Biodentine™ and MTA presented satisfactory results, which were characterized by a milder inflammatory response compared to the control, regardless of the material used for coronal sealing and of the experimental period evaluated ( $p < .0001$ ). All test groups showed less bone resorption than the positive control after 21 days ( $p < .05$ ), being this difference more pronounced in teeth restored with silver amalgam. Cement repair occurred in 30% of MTA and Biodentine™ samples, and was not detected in any specimen of the positive control group. In conclusion, Biodentine™ and MTA promoted similar responses when used to pulp capping and furcal perforation sealing. On the other hand, the use of Biodentine™ as temporary restorative material did not promote efficient coronal sealing. Although further investigations are required, Biodentine™ can be considered an alternative for pulpotomy and furcal perforation.

**Keywords.** Biodentine, Tricalcium silicate, Mineral trioxide aggregate (MTA), Bioactive materials, Endodontic materials, Pulp capping materials, Vital pulp therapy, Furcal perforation, repair.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<sup>™</sup> – Trademark

® – Marca registrada

**MTA** – Mineral Trioxide Aggregate

**EDTA** – ácido etileno-diamino-tetracético

**DPSCs** – Células-tronco da polpa dental

**TGF-B1** – Fator transformador de crescimento - Beta1

**cm** – centímetro

**g** – gramas

**HE** – Hematoxilina e Eosina

**kg** – quilograma

**mg** – miligrama

**µm** – micrômetro

**PUCRS** – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

**CEUA** – Comissão de ética para uso de animais

**RS** – Rio Grande do Sul



## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Aprovação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS .....	83
ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS .....	84
ANEXO C – Carta de submissão ao periódico Dental Materials .....	85
ANEXO D – Carta de submissão ao periódico Journal of Endodontics.....	86
ANEXO E – Imagens clínicas e radiográficas .....	87
ANEXO F – Imagens histológicas .....	88
ANEXO G - Imagens do Biodentine® e modo de preparo .....	90

## 1 INTRODUÇÃO

A ocorrência das exposições pulpares e perfurações endodônticas constituem desafios da endodontia, que busca preservação, reparação e regeneração dos tecidos envolvidos nestas situações. A investigação acerca de materiais e protocolos mais eficazes é foco de crescente interesse na endodontia.

Manter a fisiologia pulpar e preservar sua vitalidade garante longevidade ao elemento dentário e a saúde dos tecidos periapicais em qualquer idade (TZIAFAS, 2004; ASGARY et al., 2008). Além disso, terapias que mantêm a vitalidade pulpar são mais fáceis, rápidas e econômicas se comparadas a tratamentos convencionais. A remoção completa da polpa enfraquece a estrutura dentária, deixando-a mais suscetível a trincas e fraturas. Pode ainda ocorrer infiltração microbiana devido a falhas no selamento coronário ou, por deficiência da obturação dos canais radiculares. Tais complicações levam ao insucesso endodôntico ou perda do elemento dentário. Riscos semelhantes se aplicam aos dentes cuja integridade dos tecidos na área da furca esteja comprometida por perfurações de diferentes causas. Nestes casos, o selamento rápido com materiais que estimulem o reparo dos tecidos contribui para minimizar os danos e melhorar o prognóstico dos tratamentos (TZIAFAS et al., 2004; ASGARY et al., 2008; TROPE, 2008; AGUILAR & LINSUWANONT, 2011;).

Uma breve consideração sobre a constituição e as funções da polpa e do periodonto favorece o entendimento da dinâmica e da importância das terapias conservadoras da polpa e das perfurações de furca.

O tecido da polpa dentária é de origem mesenquimal. Nele se encontram células, substância fundamental amorfa, fibras, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos, distribuídos nas seguintes zonas: odontoblástica, acelular, rica em células e central. Estes componentes, através de um processo dinâmico e interligado, respondem pelas funções de nutrição, defesa, inervação e formação do dente. Comumente, os odontoblastos da periferia da polpa promovem a dentinogênese e, ao longo da vida clínica do dente, formam dentina terciária em defesa a estímulos diversos. Quando diante de uma rápida agressão bacteriana, que pode levar à morte de odontoblastos pré-existentes, as células indiferenciadas da polpa se transformam em odontoblastóides (odontoblastos de reposição) e promovem o reparo e a

mineralização (TZIAFAS, SMITH, LESOT, 2000; COOPER et al., 2010). A intensidade, tempo e frequência do agente irritante interferem na resposta pulpar, determinada pela sua capacidade de ativar e responder aos eventos inflamatórios e imunopatológicos que se instalam em sua defesa. Podem ocorrer desde uma simples deposição de dentina, modificações de natureza degenerativa e inflamatória, até a necrose pulpar (SELTZER, BENDER & ZIONTZ, 1963; COOPER et al., 2010).

Na terapia da polpa vital, busca-se induzir, por meio da aplicação de materiais biocompatíveis, a diferenciação de células produtoras de tecido calcificado, formando uma barreira mineralizada que protege a polpa de infiltrações microbianas (DAMMASCHKE, et al., 2010; PARANJPE et al., 2011; OBEID et al., 2013). Nesse aspecto, têm sido realizadas investigações acerca da capacidade de diversos materiais em promover o reparo e a regeneração dos tecidos do complexo dentino-pulpar (COOPER et al., 2010; PRATI & GANDOLFI, 2015).

O periodonto é formado por estruturas que participam da sustentação dos dentes na maxila e na mandíbula. Cimento, ligamento periodontal e osso alveolar diferenciam o periodonto de sustentação ou inserção, possibilitando a ancoragem estrutural e funcional entre o dente e o alvéolo. Enquanto a gengiva caracteriza o periodonto marginal ou de proteção. A gengiva recobre a crista do processo alveolar e estabelece a continuidade do epitélio da mucosa oral com o colo do dente através do epitélio juncional (SEO et al., 2004; NANJI & BOSSHARDT, 2006).

As células que compõem o periodonto de inserção incluem os fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas (SEO et al., 2004; NANJI & BOSSHARDT, 2006). Perfurações de furca agridem os tecidos do periodonto de inserção que podem provocar desde eventos inflamatórios em diferentes níveis até a perda óssea e o comprometimento do dente.

O selamento das perfurações também é importante para o sucesso do tratamento. As perfurações endodônticas advindas de processos reabsortivos, cariosos ou da associação de fatores de risco (localização do dente, anatomia dental e experiência do operador) geram um processo inflamatório de graus variáveis, dependendo da localização, da extensão do dano e do tempo decorrido da perfuração até o seu selamento (FUSS, 1995; YILDIRIM & DALCI, 2006; TSESIS et al., 2010). O prognóstico desses acidentes está diretamente relacionado também ao tratamento, materiais e técnicas adequadas. Quanto mais rápida a perfuração for selada, maior é a probabilidade de reparo, principalmente nas perfurações de furca,

quando a proximidade do sulco gengival com a coroa clínica permite uma irritação contínua. Nestes casos, reabsorções de cimento e osso dificultam o reparo e podem comprometer o prognóstico em longo prazo (SELTZER, SINAI, AUGUST, 1970).

Através do selamento das perfurações procura-se estimular a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal em cementoblastos e osteoblastos. Isso contribuirá para o vedamento da área afetada e o selamento biológico da perfuração (MAEDA et al., 2010)

As terapias de polpa vital e de perfurações endodônticas requerem materiais que apresentem baixa toxicidade, ausência de potencial carcinogênico e genotóxico, estabilidade dimensional e de selamento. Outras características clínicas importantes estão relacionadas à facilidade de manuseio e radiopacidade (PARIROKH & TORABINEJAD, 2010; DARVELL & WU, 2011; MENTE et al., 2014; PRATI & GANDOLFI, 2015). No caso das perfurações, o material selecionado não deve ser afetado pela presença de contaminação sanguínea. Além disso, é desejável que promova uma boa vedação contra bactérias e fluidos, endureça em ambiente úmido, e tenha suficiente força de compressão e dureza (SHOKOUHINEJAD et al., 2010; MA et al., 2011; HASHEM & WANEES, 2012; HAAPASALO et al., 2015; CAMILLERI, 2015a). Reunir várias destas particularidades num só material continua sendo o maior desafio.

Por várias décadas, o material que melhor satisfaz os requisitos de revestimento pulpar foi o pó de hidróxido de cálcio. Sua capacidade de manter a polpa vital sob uma barreira calcificada é defendida e confirmada em pesquisas (HOLLAND, 1971; ACCORINTE et al., 2008; DAMMASCHKE, et al., 2010; TABARSI et al., 2010; MENTE et al., 2014). Tal vantagem, associada ao fácil manuseio e à acessibilidade, faz o contraponto às diferentes críticas apontadas para este material, visto que sua composição misturada com água forma uma pasta que favorece sua desintegração com o tempo. As formulações em forma de cimento não são puras, e a liberação de íons hidroxila torna-se comprometida (TABARSI et al., 2010; ESKANDARIZADEH, et al., 2011; MENTE et al., 2014). Também para o selamento das perfurações endodônticas, diversos materiais foram sugeridos, entre eles amálgama, cimentos de óxido de zinco e eugenol, material restaurador intermediário (IRM), Super EBA, resina composta e, ionômeros de vidro comum ou modificado (DAOUDI & SAUNDERS, 2002; HAAPASALO et al., 2015). Diferentes investigações

têm o intuito de encontrar um material que apresente maior número de características positivas.

Em 1993, o Agregado Trióxido de Mineral (MTA) foi introduzido com objetivo de selar comunicações entre o sistema de canais e os tecidos periodontais de suporte, em especial as retro-obturações (LEE, MONSEF, TORABINEJAD, 1993). Ele é um pó hidrofílico, que consiste na mistura de silicato tricálcico, óxido tricálcio, óxido de silicato e aluminato tricálcio. A parte do pó do MTA é acondicionada em embalagens de um grama, acompanhado da parte líquida (água destilada). O MTA deve ser espatulado numa placa de vidro na proporção de pó/líquido de 3:1, até adquirir consistência arenosa. Para manter sua umidade durante o manuseio, é recomendado manter uma gaze umedecida sobre o cimento. Sua cor original é cinza, mas foi lançado em branco, pela exclusão dos componentes de ferro, o que forneceu um matiz mais parecido com a cor dos dentes.

As características positivas do MTA, como elevada biocompatibilidade; estímulo à neoformação de dentina, cemento e osso; atividade antimicrobiana; alta alcalinidade; tomada de presa na presença de umidade e, adequado selamento, levaram à utilização para as perfurações endodônticas, além dos tratamentos conservadores da polpa, tornando-o popular entre clínicos e especialistas em endodontia (PITT FORD et al., 1995; DAOUDI & SAUNDERS, 2002; HAKKI et al., 2009; PERINPANAYAGAM & AL-RABEAH, 2009; PARIROKH & TORABINEJAD, 2010a; DAMMASCHKE, et al., 2010; PARANJPE et al., 2011; MENTE et al., 2014). O MTA possui propriedades biológicas similares à pasta de hidróxido de cálcio, mas suas propriedades físicas são reconhecidamente superiores. Todavia, desvantagens, como dificuldade na manipulação e na aplicação, longo tempo de presa (3 a 4 horas), possibilidade de descoloração da estrutura dentária e custo elevado (DARWELL & WU, 2011; MA et al., 2011; VALLÉS et al., 2013; CAMILLERI et al., 2015a) têm estimulado à investigação de novos materiais para aplicação sobre a polpa e perfurações.

Biodentine<sup>®</sup> (Septodont, Sair Maur de Fossés, France) é um cimento de silicato tricálcico, que vem sendo utilizado desde 2009. O produto é indicado pelo fabricante para revestimento pulpar, selamento de perfurações e reabsorções, apicificação, obturações retrógradas e como material restaurador. Biodentine<sup>®</sup> é baseado em um policarboxilato modificado e pertence à mesma classe do MTA, mas com aparentes vantagens químicas, mecânicas e de manuseio. Sua forma de

apresentação é em pó (cápsula) e líquido (pipeta). A parte em pó, acondicionada em cápsula, é constituída principalmente por silicato tricálcico (tornando-o similar ao MTA). Também contém pequenas proporções de silicato dicálcico, carbonato de cálcio e óxido de zircônio, usado como radiopacificador. O líquido, mantido numa pipeta, é composto de água, polímero hidrossolúvel e cloreto de cálcio, que funciona como um agente acelerador de presa da mistura. A dispensação do Biodentine<sup>®</sup> é feita através de cinco (05) gotas do líquido sobre o pó. Em seguida, a cápsula é colocada num misturador (amalgamador) durante 30 segundos. A mistura obtida após o preparo apresenta brilho e consistência similar ao cimento de fosfato, fácil manuseio, rapidez no tempo de presa (12 minutos) e alta resistência em curto prazo (CAMILLERI, 2011; GRECH, MALLIA, CAMILLERI, 2013; CAMILLERI, SORRENTINO, DAMIDOT, 2013; RAJASEKHARAN et al., 2014).

A elevada pureza dos componentes do Biodentine<sup>®</sup>, associados à maior capacidade de absorção e concentração de íons de cálcio na dentina, menor tempo de presa, resistência à força de compressão e microdureza, são algumas das vantagens ressaltadas (GRECH, MALLIA, CAMILLERI, 2013; HAN & OKIJI, 2013). Os estudos acerca da sua citotoxicidade, atividade antimicrobiana, genotoxicidade e características físicas são favoráveis e o recomendam no tratamento de exposições pulpares (PENG et al., 2011; CAMILLERI, SORRENTINO, DAMIDOT, 2013; GRECH, MALLIA, CAMILLERI, 2013; CHANG et al., 2014; CORRAL NUNEZ et al., 2014; MORI et al., 2014). Também foi confirmada sua capacidade de induzir a aposição de dentina terciária reacional e reparadora, via estímulo da atividade odontoblástica, com influência positiva no reparo através da diferenciação das células pulpares (LAURENT, CAMPS, ABOUT, 2012; HAN & OKIJI, 2013; LUO et al., 2014) e da biomineralização em estudos *in vitro* e após capeamento pulpar direto (ZANINI et al., 2012; TRAN et al., 2012; HAN & OKIJI, 2013; NOWICKA et al., 2013). Avaliações recentes demonstraram bons resultados do Biodentine<sup>®</sup> na manutenção da estabilidade da coloração da estrutura dentária (VALLÉS, et al., 2015; KOHLI, et al., 2015). As propriedades físicas supracitadas foram referenciadas para que o Biodentine<sup>®</sup> fosse indicado como material restaurador (KOUBI et al., 2012; RASKIN, et al., 2012; KOUBI et al., 2013).

Apesar de bons indicativos do uso do Biodentine<sup>®</sup> na prática endodôntica, ainda são consideradas incipientes as evidências produzidas sobre sua potencialidade como revestimento biológico pulpar, periodontal e restaurador. Os

resultados da aplicação desse material sobre o tecido pulpar e sobre as áreas de perfuração merecem ser investigados, a fim de avaliar suas vantagens, limitações e segurança.

É reconhecido que materiais aplicados sobre o tecido pulpar e periodontal podem determinar reações que influenciam no tratamento e no prognóstico, alterando o processo de reparação tecidual. Tal fato justifica a importância de estudos de biocompatibilidade em modelos animais que contemplem a avaliação clínica, radiográfica e histológica da aplicação de biomateriais nestas situações. Existe, na atualidade, expectativa dos clínicos, que fazem tratamentos endodônticos e conservadores da polpa dentária, em relação ao Biodentine<sup>®</sup> e o desempenho deste produto como material de substituição da dentina e, ao mesmo tempo, restaurador. Essa última característica seria própria do Biodentine<sup>®</sup>, não sendo encontrada no MTA. No entanto, inúmeros são os materiais lançados no mercado odontológico com aludidas propriedades que acabam não se confirmando após extenso processo avaliativo sem interesses comerciais.

A avaliação das características químicas, físicas e biológicas de um novo material endodôntico fornece base científica para sua aplicação nas práticas terapêuticas, respaldando a eficácia clínica. Biologicamente, ainda que técnicas laboratoriais com culturas celulares avaliem diferentes aspectos dos biomateriais, é importante que haja a complementação por estudos *in vivo*. Frente ao exposto, a presente investigação teve por objetivo verificar a resposta tecidual ao Biodentine<sup>®</sup> em pulpotomias e perfurações de furca realizadas em molares de ratos, avaliando também sua capacidade restauradora como material de selamento coronário, comparando seus efeitos com aqueles observados para materiais com mais tempo de mercado, como MTA e restaurações convencionais com amálgama.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar, *in vivo*, o efeito biológico do cimento de silicato tricálcico (Biodentine<sup>®</sup>), sobre a exposição de polpa e os tecidos periodontais da furca de dentes de ratos, comparando ao cimento de agregado de trióxido mineral (MTA).

### 2.2 Específicos

- Comparar histologicamente a reação do tecido pulpar de dentes de ratos após exposição e aplicação de Biodentine<sup>®</sup> e MTA.
- Comparar histologicamente a reação dos tecidos periodontais da furca de dentes de ratos após perfuração e selamento com Biodentine<sup>®</sup> e MTA.
- Avaliar a capacidade de selamento do Biodentine<sup>®</sup> quando utilizado como material restaurador.

## 3 HIPÓTESE EXPERIMENTAL

### 3.1 Hipótese de nulidade

Em situações de exposição pulpar e perfurações radiculares de furca, não há diferença entre a reação produzida pela ação do Biodentine<sup>®</sup> nem do MTA sobre os tecidos avaliados, quando comparados aos seus controles sem tratamento.



#### 4 ARTIGO 01

**Rats' pulpal response after capping with conventional mineral trioxide aggregate (MTA) or a tricalcium silicate based-material (Biodentine™)**

Submetido ao periódico Dental Materials

Fator de impacto: 3,76

**Rats' pulpal response after capping with conventional mineral trioxide aggregate (MTA) or a tricalcium silicate based-material (Biodentine™).**

Magda S. Reis<sup>a,c</sup>, Roberta K. Scarparo<sup>b</sup>, Juliana T. Bolzan<sup>a</sup>, Liviu Steier<sup>d</sup>, José A. P. Figueiredo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Clinical Department, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Conservative Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Nursing and Dentistry, University of Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, RS, Brazil

<sup>d</sup> MSc, PhD in Endodontology Director, Dental Education Unit, University of Warwick , Warwick University Medical School, Coventry, United Kingdom

\*Corresponding author

Roberta Kochenborger Scarparo

Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2492

CEP 90035-003

Porto Alegre – RS – Brazil

Phone: 55 51 3308 5010

[robertascarparo@hotmail.com](mailto:robertascarparo@hotmail.com) / [roberta.scarparo@ufrgs.br](mailto:roberta.scarparo@ufrgs.br)

## Highlights

- Dental pulp responses to mineral trioxide aggregate (MTA) and to a calcium silicate-based material (Biodentine™) were compared in a rat experimental model.
- Biodentine™ showed favorable biological properties in vital pulp therapy, similar to MTA.
- Biodentine™ did not provide efficient coronal sealing as a temporary restorative material.

## **Rats' Pulpal response after capping with conventional mineral trioxide aggregate (MTA) or a tricalcium silicate based-material (Biodentine™).**

### **Abstract**

**Objectives.** The aim of this study was to evaluate pulpal responses to mineral trioxide aggregate (MTA) and to a calcium silicate-based material (Biodentine™).

**Methods.** Eighty (80) male *Wistar* rats were divided into five groups, according to the materials used for pulp capping and coronal sealing (n=8 per group/period). The lower first molars were mechanically exposed and capped with either MTA or Biodentine™, and restored with silver amalgam. In an additional test group, teeth were capped and restored with Biodentine™. Teeth capped with gutta-percha and restored with silver amalgam served as a positive control and untouched teeth were negative control. Histological evaluation of pulpal responses and macroscopic examination of coronal sealing were performed after experimental periods of 14 or 21 days. Inflammation extension and intensity, degenerative events and formation of mineralized tissue barrier were statistically analysed by ANOVA and Tukey *post hoc* tests ( $p < 0.05$ ).

**Results.** Biodentine™ and MTA presented satisfactory results, which were characterized by a milder inflammatory response ( $p < 0.0001$ ) and more pronounced formation of mineralized barrier ( $p < 0.0001$ ) compared to teeth capped with gutta-percha. When used as a restorative material, Biodentine™ kept coronal sealing in only 37.5% of the samples.

**Significance.** Biodentine™ showed favorable properties in vital pulp therapy, being similar to MTA. However, its use as temporary restorative material did not promote efficient coronal sealing.

**Keywords:** Biodentine, Tricalcium silicate-based material, Mineral trioxide aggregate (MTA), pulp capping materials, vital pulp therapy, Bioactive materials, Endodontic materials.

## 1. Introduction

Vital pulp therapy aims to induce, through the application of biocompatible materials, the differentiation of mineralized tissue producing cells [1-2] and the formation of a calcified barrier, thus protecting pulp from microleakage and favoring healing [3-4]. To achieve these goals, a number of properties, including low toxicity, dimensional stability, sealing ability, ease of handling, radiopacity and absence of carcinogenic and genotoxic potential, are required [5-8].

For decades, the capping material that best met these criteria was calcium hydroxide, which exerts biological activity through the dissociation of calcium and hydroxyl ions [7-9]. However, when used as a powder or mixed with aqueous vehicles, it presented poor stability, affecting sealing ability. Besides, cement formulations of calcium hydroxide are not pure, and the release of ions is compromised [7-8].

Mineral trioxide aggregate (MTA) was first suggested for sealing communications between the root canal system and periodontal tissues [10]. Latter, the material sealing ability, added to its biocompatibility, antibacterial activity and capacity in stimulating dentin neoformation justified its use in vital pulp therapy [2, 4-5, 9]. Nevertheless, disadvantages such as difficulties in handling, long setting time, high cost and tooth discoloration were pointed out [6, 11], encouraging the development of alternative materials.

Biodentine™ (Septodont, Saint Maur-des-Fossées, France) is a recent tricalcium silicate based material. According to the manufacturer, it presents a composition that resembles MTA, but exhibits further advantages regarding handling, chemical and mechanical properties. The higher purity of Biodentine, the ability to provide greater absorption, the concentration of calcium ions on dentin, the lower setting time, and the greater microhardness and resistance to compressive force are some of the advantages highlighted [12-13].

Added to its indications as a root-end filling material and for sealing root perforations and resorptions, Biodentine™ can be used and as a pulp capping material and for dental restoration [14]. Studies evaluating cytotoxicity, antimicrobial activity, genotoxicity and physical characteristics showed favorable outcomes [12, 15-17]. The ability of Biodentine™ in inducing odontoblast-like cells differentiation, and thus stimulating the formation of tertiary dentin, has been demonstrated [13, 18-19], which justify the perspective of using this material as a pulp capping agent [13, 20-

22]. Moreover, the physical properties of this material appear to be adequate in dental restorations [23-25].

The use of Biodentine™ in endodontic practice is still considered inceptive, and more clinical insights are needed to provide consistency to recent findings. Using biological test models may provide evidence to ensure that the material presents advantages related to other available alternatives for vital pulp therapy and coronal sealing. Thus, the present investigation aimed to evaluate, in Wistar rats, the pulpal tissue responses after capping procedures using Biodentine™ or MTA. Moreover, the ability of Biodentine™ in keeping coronal sealing when used as a temporary restoration will be tested and related to the histological findings.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Materials**

#### ***For the pulp capping***

- Mineral Trioxide aggregate – MTA – (Angelus, Londrina, PR, Brazil).
- Calcium Silicate Cement Biodentine - Biodentine™ - (Septodont, Saint Maur-des-Fosses, France).
- White Guta-Percha- Gutta- (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil).

#### ***In the sealing of cavities:***

- Silver Amalgam – SA - (DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Calcium Silicate Cement Biodentine - Biodentine™ - (Septodont, Saint Maur-des-Fosses, France).

All materials were used in accordance with the manufacturers' recommended time and instructions. A flowchart was provided with materials and techniques used within the study (Fig.1)

### **2.2. Experimental Design**

This study was approved by the local Animal Ethics Committee (Protocol: 12/00320). Eighty (80) male Wistar rats weighing approximately 250g were employed (n=8 per group/period).

The right lower first molars of the animals were mechanically exposed and pulp capped/sealed using the materials mentioned above. The negative group was accomplished by untouched healthy teeth. Prior to experimental procedures, the animals were anesthetized intraperitoneally with Ketamine (Dopalen, Ceva – Paulínea, SP – Brazil) and Xylazine (Rompum, Bayer – São Paulo – SP – Brazil) with 80 and 20mg/kg body weight, respectively [26]. Mouth opening was achieved by using a previously designed device, and the tissues were kept away with the aid of dental pliers [26].

Dental pulp exposures were performed in the center of occlusal surface, using a new round diamond bur (ISO # 1011 HL, KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) for each tooth, at high speed and under water cooling. The resulting cavities presented nearly the same size (about 1mm) of the bur tip. Pulp expositions were confirmed by visual examination and clinical inspection with Rhein probes (Odous de Deus, Belo Horizonte, Brazil). Bleeding was controlled through copious irrigation with distilled water and by using wet cotton pellets with light pressure.

After that, in samples of the test and positive control groups, teeth were capped and sealed, being manipulated as instructed by the manufacturers, as follows: MTA/silver amalgam (MTA/SA); Biodentine™/silver amalgam (Biodentine/SA); Biodentine™/Biodentine™ (Biodentine) and Gutta-percha/silver amalgam (Gutta/SA) (Fig.1).

Biodentine™ powder was added five drops of liquid provided in single dose units and mixing 30s at 4,000rpm with an amalgam mixing machine (Ultramat 2 - SDI, São Paulo, Brazil). The sachet containing MTA powder was added 1 drop of distilled water and mixing was performed on a glass slab and spatulation during 30s to obtain an arenous consistency. Silver amalgam was mixed during 15s in the same machine as for Biodentine™. Gutta-percha of control group was plasticized with heat.

After experimental periods of 14 and 21 days, the animals were euthanized by inhalation of isoflurane, and the jaws were dissected for photographic, radiographic and histological evaluation.

### **2.3. Photographic and radiographic analysis of coronal sealing**

The marginal sealing produced by silver amalgam and Biodentine™ was macroscopically evaluated through photographs and radiographies. After jaws dissection, the specimens were fixed in a table with utility wax stripes. Then, they

were photographed using a camera (Canon EOS 500 D – Rebel T1I Tóquio, Japão) adjusted to manual mode (1/200 and F/32 with 2s temporization) attached to a tripod distant 30cm from the sample. The camera was positioned in such a way that enabled the acquisition of images of the entire occlusal surface.

Radiographs were taken using an x-ray unit (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brazil) operated at 70 kVp. A size-2 phosphor plate (Gendex, Chicago, IL, USA), and an exposure time of 0.2 s was employed. Samples were positioned so as to achieve a perpendicular angle between the buccal surface of teeth and the x-ray exposure. A focal distance of 30 cm was established. A Digital x-ray system (Denoptix/Gendex, IL, USA) was used to capture images, which were scanned at 300 dpi resolution and saved in TIFF format.

Radiographic and photographic images were analyzed by a blinded calibrated examiner (ICC = 0.90), which classified the coronal sealing of each sample according to criteria described in Table 1.

#### **2.4. Histological processing and analysis**

After photographic and radiographic acquisitions, samples were fixed with 10% buffered paraformaldehyde for 24 hours. Then, the specimens were decalcified with 17% EDTA for 5 weeks. Finally, they were dehydrated in ascending concentrations of ethanol and embedded in paraffin. 5 µm-thick sections were obtained in a bucco-lingual direction and stained with hematoxylin and eosin (HE). For each sample, the three sections that better allowed the observation of pulp exposure area were selected for histological analysis. A capture system (Motic Plus Moticam- 5 megapixels) was used for images storage. A histological descriptive analysis of samples was performed. Additionally, samples were classified in scores by a blinded calibrated examiner (Kappa > 0.90 for all variables) according to inflammation extension and intensity and to pulp degenerative events (Table 2).

#### **2.5. Statistical analysis**

Comparisons of histological features among the groups were performed using 2-way analysis of variance followed by Tukey post-hoc test, using Graphpad Prism 6.0 Statistical Software (Graph Pad Software Inc. San Diego, CA). Differences were regarded when the  $p < .05$ .



### 3. Results

#### 3.1. Coronal sealing

Photographic and radiographic evaluation of coronal sealing showed that teeth restored with amalgam remained intact in 91.66% of samples. In contrast, only 18.75% of teeth sealed with Biodentine™ presented intact restoration or mild abrasion; 43.75% showed material degradation/fracture; and in 37.5%, the complete loss of restoration was noted after the experimental periods (Table 3 and Fig. 2G).

#### 3.2. Histological analysis

Histological analysis of pulp tissue reaction to the tested biomaterials (MTA and Biodentine™) showed significant differences regarding inflammatory events (intensity and extent) ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 2A), degenerative events ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , at 14 and 21 days respectively) (Fig. 3A) and formation of dentin bridge ( $p < 0.0001$ ) (Fig. 4A) compared to the positive control group (in which teeth were capped with gutta-percha). Samples of the negative control group (healthy teeth) served as a parameter of pulp tissue homeostasis and revealed absence of inflammation and degenerative events (Fig. 3B).

When gutta-percha was placed in contact with the dental pulp, severe inflammatory reaction, abscess formation and necrosis were observed, whereas most of the samples capped with the biomaterials showed a slight inflammatory infiltration, predominantly comprised of mononuclear cells (Fig. 2B-F).

Some samples in contact with MTA or Biodentine™ showed moderate inflammation with neutrophils and / or sparse eosinophils. When they occurred in the test groups, these reactions were frequently limited by a fibrous condensation, and remained restricted to the area of pulp exposure or next to the entrance of root canals. On the other hand, in the positive control group, inflammatory reaction reached the middle and apical third of root canals in approximately half of the samples (Fig. 2 B-F).

Regarding the occurrence of degenerative processes in response to the materials (MTA and Biodentine™), moderate fiber condensation, hyalinization areas and calcifications were observed at the pulp cervical third. Severe pulp degeneration was noted throughout the root canal length in the positive control group (Fig. 3B-F).

Dentin bridge formation (partial or complete) in the exposure site was observed in 14 and 21 days in all groups with one of the biomaterials (MTA/SA, Biodentine/SA and Biodentine) and none found at positive control samples (Fig. 4B-D).

#### **4. Discussion**

The present investigation verified that Biodentine™ and MTA present similar abilities in promoting hard tissue barrier, in producing acceptable levels of inflammatory response and in maintaining pulp vitality when used as capping agents. These outcomes are in accordance with other studies testing MTA in vital pulp therapy [4-6], and enabled the comparison of tissue responses of well-established and recently introduced materials. Moreover, the current study showed some difficulties regarding Biodentine™ ability to produce a long-term coronal seal when it is used as a restorative material.

The adequacy of using rat molars to evaluate the results of vital pulp therapy, as adopted herein, has been confirmed in several studies [27-28], considering similarities to human teeth regarding anatomical, physiological, biological and histological characteristics. Moreover, it allows the analysis of pulp and periapical tissue responses in shorter periods because rats present a faster metabolism in comparison to other animals [9, 26, 29-30]. As previously demonstrated [21, 29] and confirmed herein, post-experimental periods of 14 days are adequate to the evaluation of dental pulp inflammatory and degenerative responses to biomaterials, while 21-days experimental periods are usually suitable for observing the formation of hard tissue barrier, although some samples displayed hard tissue already at 14 days. Reports of longer periods to obtain the same outcomes are available in miniature swines, dogs and humans [20, 31-32].

The simultaneous occurrence of inflammatory and degenerative events after pulp exposition and placement of biomaterials was assessed through the comparison of pulp characteristics of negative control samples (healthy teeth), and confirms previous descriptions of this tissue reactions to external stimulus [3, 33]. The presence of inflammatory cells and abscess together with fibrous condensation, hyalinization and calcified areas, characterize pulp diseases as dynamic processes. Even though, inflammation intensity is often used as the only measure of damage, and comprehensive histological descriptions of pulp responses [28] are not covered in most of the studies on vital pulp therapy [20].

The positive control group showed the greatest occurrence of accentuated pulp degeneration and tissue necrosis. Most of the specimens in contact with MTA or Biodentine™ displayed a moderate fibrous condensation, as well as small areas of hyalinization and calcific degeneration. In some samples, there was extensive calcific degeneration or large areas of intrapulpal calcifications. Biodentine™ tended to favor the occurrence of pulp calcifications, although the differences related to the other groups were not statistically significant. Similarly, Tziafa et al. 2014 [32] observed higher occurrence of pulp ectopic calcification in samples treated with this material. MTA and Biodentine™ produced transient inflammatory reactions, which took place in a limited extent and in levels that positively influenced pulp repair and the formation of hard tissue barriers, differently from the positive control group. In agreement, Nowicka et al. 2013 [20] observed reduced inflammation and formation of dentin-like tissue barriers in long postoperative periods after using MTA or Biodentine™ as capping agents. In this regard, the understanding of a mild pulp inflammation as a part of the process that leads to stem cells proliferation and differentiation [3] was confirmed. The inflammation that precedes the formation of calcified barriers stimulate molecular signaling pathways of capable to induce dental pulp stem cells (DPSCs) proliferation and differentiation into odontoblast-like cells, leading to the synthesis and secretion of a dentin matrix and its mineralization [1-2, 22]. Thus, the formation hard tissue barriers in the test groups can be partially explained by the mineralization potential of MTA [4, 6-9] and Biodentine™ [14, 21, 31-32], which are started by these materials effects on pulp tissue. Moreover, a previous *in vitro* investigation revealed that, even when prepared in different concentrations, Biodentine™ is able to increase stem cells proliferation, migration and adhesion [18], which could have favored the biological responses observed herein. The ability of Biodentine™ in promoting pulp mineralization in shorter periods than other materials has been suggested in an entire human tooth culture model [19]. Dental pulp cells in contact with this material showed to promote transforming growth factor, beta1 (TGF-B1) release and the formation of mineralized foci in just 2 days, being an osteodentine appearance observed after 14 days.

In the current *in vivo* investigation, although Biodentine™ was able to favor the formation of hard tissue barriers, this outcome did not occur earlier than observed to MTA samples. Moreover, although osteodentine zones have been previously described as a characteristic of dental bridges induced by Biodentine™ [32], the same

was not confirmed in the current outcomes, mainly because the rat model does not allow observations at exactly the same sites to infer differences within dentin bridge characteristics. The results presented herein confirmed the potentialities of Biodentine™ in inducing mineralization [17, 19-22] and in maintaining pulp tissue health [31-32]. The loss of seal in some samples did not affect this potential. The lower pressure needed to insert Biodentine™ as a temporary restoration in rats may have influenced this outcome.

As well as in other investigations [20-21, 31] MTA and Biodentine™ capped samples promoted higher formation of incomplete and complete hard tissue barriers than the positive control group. It was notable, although not measured, that Biodentine™ induced more consistent and thicker bridges compared to MTA, which confirms findings from other studies [31-32].

The capacity of the restorative materials in keeping an efficient coronal seal is of paramount importance for avoiding infection and allowing vital pulp therapy success [7, 20, 28, 30]. As demonstrated in the present study, some samples sealed with Biodentine showed degradation or total loss of the restorative material in 21 days. Even though, in only one sample, the formation of mineralized tissue barrier did not occur, and the earlier establishment of the biological seal in most of the test groups samples may explain this outcome. Nevertheless, gaps in the coronal seal shall prevent long-term success of treatment, through reinfection and reestablishment of pulp disease, which would probably occur if longer experimental periods were included. Although the rat model produces higher masticatory stress that characterizes rodents [21], the erosion of Biodentine™ restorations can occur in human posterior teeth [23]. These findings, together with evidence of the material disintegration in the presence of blood or other fluids [34], contradict reports of resistance to compression [12, 15] and of the suitability of using Biodentine™ as a restorative material [24-25]. Thus, this application requires caution before deciding upon its clinical use.

The present results confirmed that Biodentine™ present interesting properties in vital pulp therapy, especially due to its potential to induce hard tissue barriers. Although biological advantages compared to MTA were not clearly evidenced, easier handling and the perspective of avoiding teeth discoloration [20, 23-24] are favorable to Biodentine™ application in dental practice. On the other hand, the material showed

limitations regarding coronal sealing ability, and should be associated with a more efficient restorative material to ensure long-term positive outcomes.

## **5 Conclusion**

Within the limitations of this study, it can be concluded that Biodentine™ presents favorable tissue response, comparable to MTA, when used as a dental pulp capping agent. However, its use as a restorative material was not advantageous.

## **Acknowledgments**

M.S.R. is a PhD student in Dentistry supported by Pro bolsa 2 (PUCRS). Thanks Ms. Joel Henrique Ellwanger for technical assistance. The authors deny any conflicts of interest related to this study.

## REFERENCES

- [1] Obeid M, Saber SEDM, Ismael AED, Hassanien E. Mesenchymal stem cells promote hard-tissue repair after direct pulp capping. *J Endod* 2013;39:626-31.
- [2] Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod* 2011;37:1691-5.
- [3] Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent* 2010;38:687-97.
- [4] Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater* 2015;31:351-70.
- [5] Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. *J Endod* 2010;36:16-27.
- [6] Darvell BW, Wu RCT. “MTA”—An Hydraulic Silicate Cement: Review update and setting reaction. *Dent Mater* 2011;27:407-22.
- [7] Mente J, Hufnagel S, Leo M, Michel A, Gehrig H, Panagidis D, et al. Treatment Outcome of Mineral Trioxide Aggregate or Calcium Hydroxide Direct Pulp Capping: Long-term Results. *J Endod* 2014;40:1746-51.
- [8] Tabarsi B, Parirokh M, Eghbal MJ, Haghdoost AA, Torabzadeh H, Asgary S. A comparative study of dental pulp response to several pulpotomy agents. *Int Endod J* 2010;43:565-71.
- [9] Dammaschke T, Stratmann U, Wolff P, Sagheri D, Schafer E. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an immunohistologic comparison with calcium hydroxide in rodents. *J Endod* 2010;36:814-9.
- [10] Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;19:541-4.
- [11] Kang S-H, Shin Y-S, Lee H-S, Kim S-O, Shin Y, Jung I-Y, et al. Color Changes of Teeth after Treatment with Various Mineral Trioxide Aggregate–based Materials: An Ex Vivo Study. *J Endod* 2015;41:737-41.
- [12] Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater* 2013;29:e20-8.
- [13] Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J* 2013;46:808-14.

- [14] Rajasekharan S, Martens LC, Cauwels RG, Verbeeck RM. Biodentine material characteristics and clinical applications: a review of the literature. *Eur Arch Paediatr Dent* 2014;15:147-58.
- [15] Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater* 2013;29:580-93.
- [16] Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. The effect of curing conditions on the physical properties of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Int Endod J* 2012;45:326-36.
- [17] Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *J Endod* 2014;40:1194-200.
- [18] Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He W-x. Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent* 2014;42:490-7.
- [19] Laurent P, Camps J, About I. Biodentine™ induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J* 2012;45:439-48.
- [20] Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2013;39:743-7.
- [21] Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res* 2012;91:1166-71.
- [22] Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine Induces Immortalized Murine Pulp Cell Differentiation into Odontoblast-like Cells and Stimulates Biomineralization. *J Endod* 2012;38:1220-6.
- [23] Koubi G, Colon P, Franquin JC, Hartmann A, Richard G, Faure MO, et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clin Oral Investig* 2013;17:243-9.
- [24] Raskin A, Eschrich G, Dejoux J, About I. In vitro microleakage of Biodentine as a dentin substitute compared to Fuji II LC in cervical lining restorations. *J Adhes Dent* 2012;14:535-42.

- [25] Koubi S, Elmerini H, Koubi G, Tassery H, Camps J. Quantitative evaluation by glucose diffusion of microleakage in aged calcium silicate-based open-sandwich restorations. *Int J Dent* 2012;2012:105863.
- [26] Scarparo RK, Dondoni L, Bottcher DE, Grecca FS, Rockenbach MI, Batista EL. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod* 2011;37:1069-73.
- [27] Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim* 2010;44:1-6.
- [28] Dondoni L, Scarparo RK, Kantarci A, Van Dyke TE, Figueiredo JAP, Batista EL. Effect of the pro-resolution lipid mediator Resolvin E1 (RvE1) on pulp tissues exposed to the oral environment. *Int Endod J* 2014;47:827-34.
- [29] Salako N, Joseph B, Ritwik P, Salonen J, John P, Junaid TA. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. *Dent Traumatol* 2003;19:314-20.
- [30] Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
- [31] De Rossi A, Silva LAB, Gatón-Hernández P, Sousa-Neto MD, Nelson-Filho P, Silva RAB, et al. Comparison of Pulpal Responses to Pulpotomy and Pulp Capping with Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate in Dogs. *J Endod* 2014;40:1362-9.
- [32] Tziafa C, Koliniotou-Koumpia E, Papadimitriou S, Tziafas D. Dentinogenic responses after direct pulp capping of miniature swine teeth with Biodentine. *J Endod* 2014;40:1967-71.
- [33] Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: Correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963;16:846-71.
- [34] Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J* 2013;46:632-41.



**Tables:****Table 1- Qualitative criteria for restoration following dental pulp capping**

<b>Restoration quality</b>	<b>Description</b>
<b>Intact</b>	Intact restorative material within cavity or slight recession
<b>Recessed</b>	Evident recession of dental material and restoration compromised by fracture
<b>Absent</b>	Restorative material not visible within cavity

**Table 2.** Scoring system for pulpal procedures and tissue response.

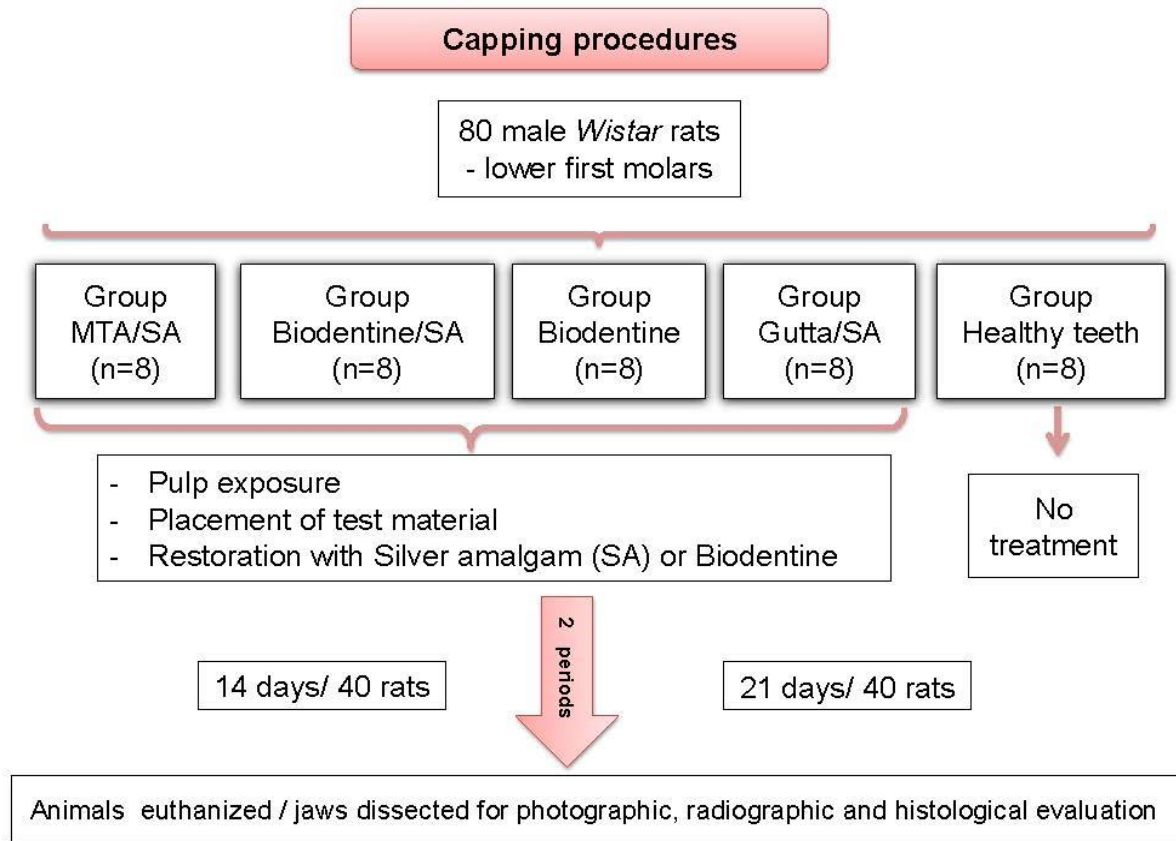
Scores	Inflammation pulp intensity
1	Absence of inflammation.
2	Mild inflammatory infiltration, predominantly mononuclear, restricted by fibercondensation; underlying tissue with sparse inflammatory cells.
3	Moderate inflammatory infiltrate, with infiltrates of mononuclear cells, or with sparse neutrophils and/or eosinophils, restricted by condensation fibers.
4	Moderate inflammatory infiltrate, with infiltrates of mononuclear cells, or with sparse neutrophils and/or eosinophils, not restricted by condensation fibers.
5	Severe inflammatory infiltrate, with tissue necrosis or abscess, with predominance of neutrophils and/or eosinophils, or a mononuclear infiltrate extending towards the whole pulp tissue.
Scores	Inflammation pulp (extension)
1	Absence of inflammation.
2	Inflammation restricted to area of exposed pulp.
3	Inflammation restricted the access of the root canals.
4	Inflammation affecting the cervical third of the root canals.
5	Inflammation affecting the middle and apical third.
Scores	Degenerative events
1	Slight fiber condensation; underlying tissue with slightly condensed extracellular matrix.
2	Moderate fiber condensation; underlying tissue with presence of slightly condensed extracellular matrix, displaying small areas of hyalinization.
3	Moderate fiber condensation; underlying tissue altered by condensed extracellular matrix (with small areas of hyalinization) and small clusters of calcium degeneration (not related to odontoblastic layer).
4	Extensive hyalinization areas and/or calcific degeneration towards pulp chamber and radicular pulp.
5	Total or partial pulp degradation
Scores	Dentin bridge
1	Complete dentin bridge formation (regular and thick) at the exposure area.
2	Incomplete dentin bridge formation (irregular or thin) at the exposure area.
3	Complete or incomplete dentin bridge together with osteodentin at the exposure area
4	Complete or incomplete dentin bridge together with osteodentin at the exposure area and invading root canal.
5	Absence of dentin bridge

**Table 3.** Evaluation of restorative material (Silver amalgam and Biodentine) following capping procedures.

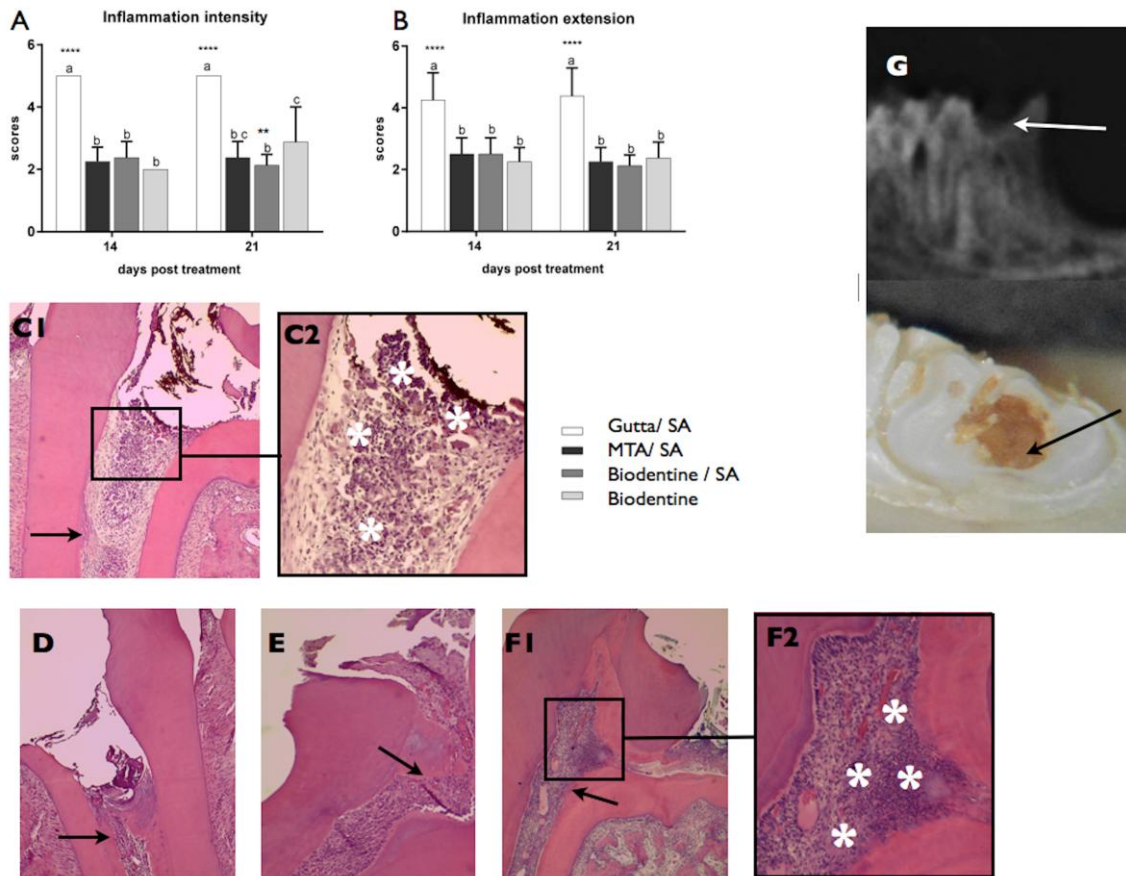
Restoration quality				
Periods	Groups (n=8)	Intact *	Recessed**	Absent***
14 days	Gutta/SA	6	2	-
	MTA/SA	8	-	-
	Biodentine/SA	8	-	-
	Biodentine	2	3	3
21 days	Gutta/SA	6	2	-
	MTA/SA	8	-	-
	Biodentine/SA	8	-	-
	Biodentine	1	4	3



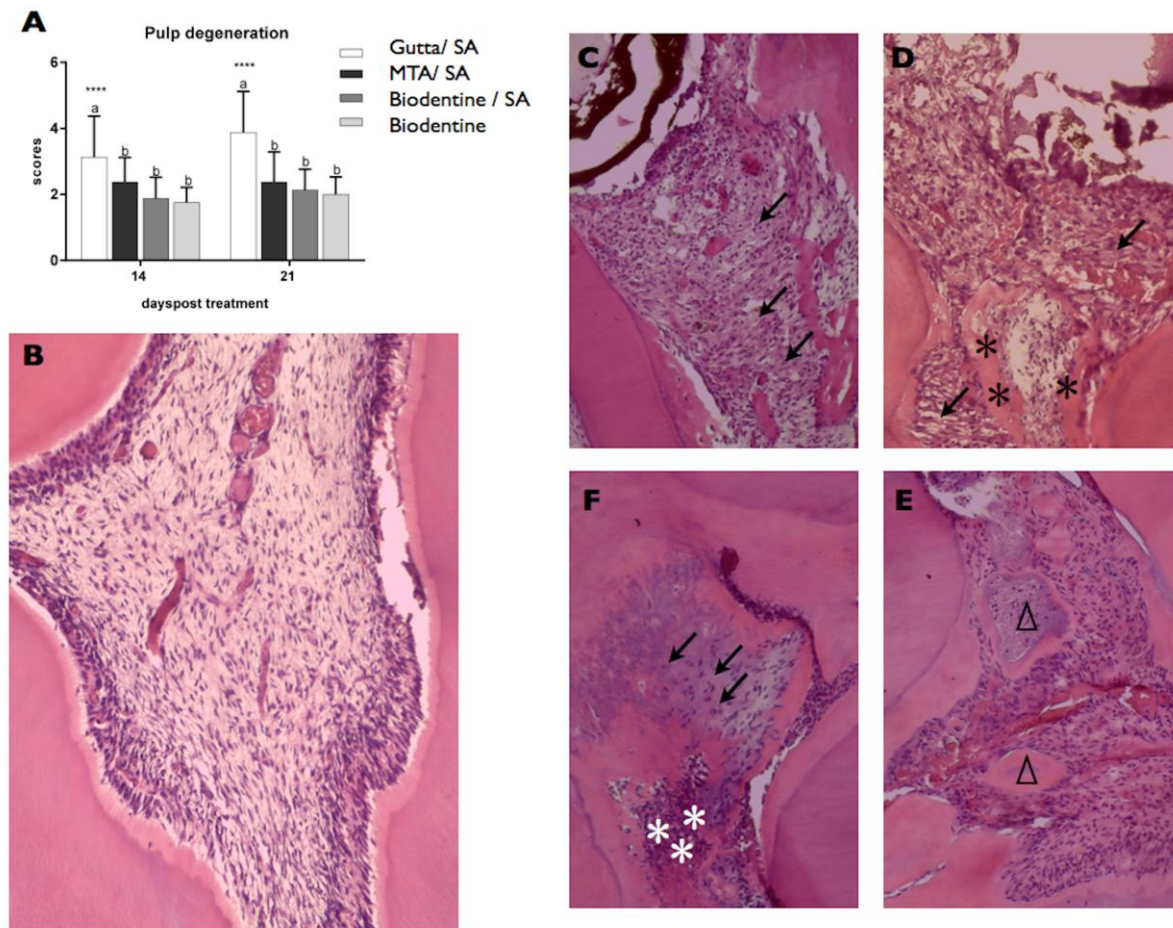
**Figures:**



**Figure 1.** Flowchart of study experimental design.

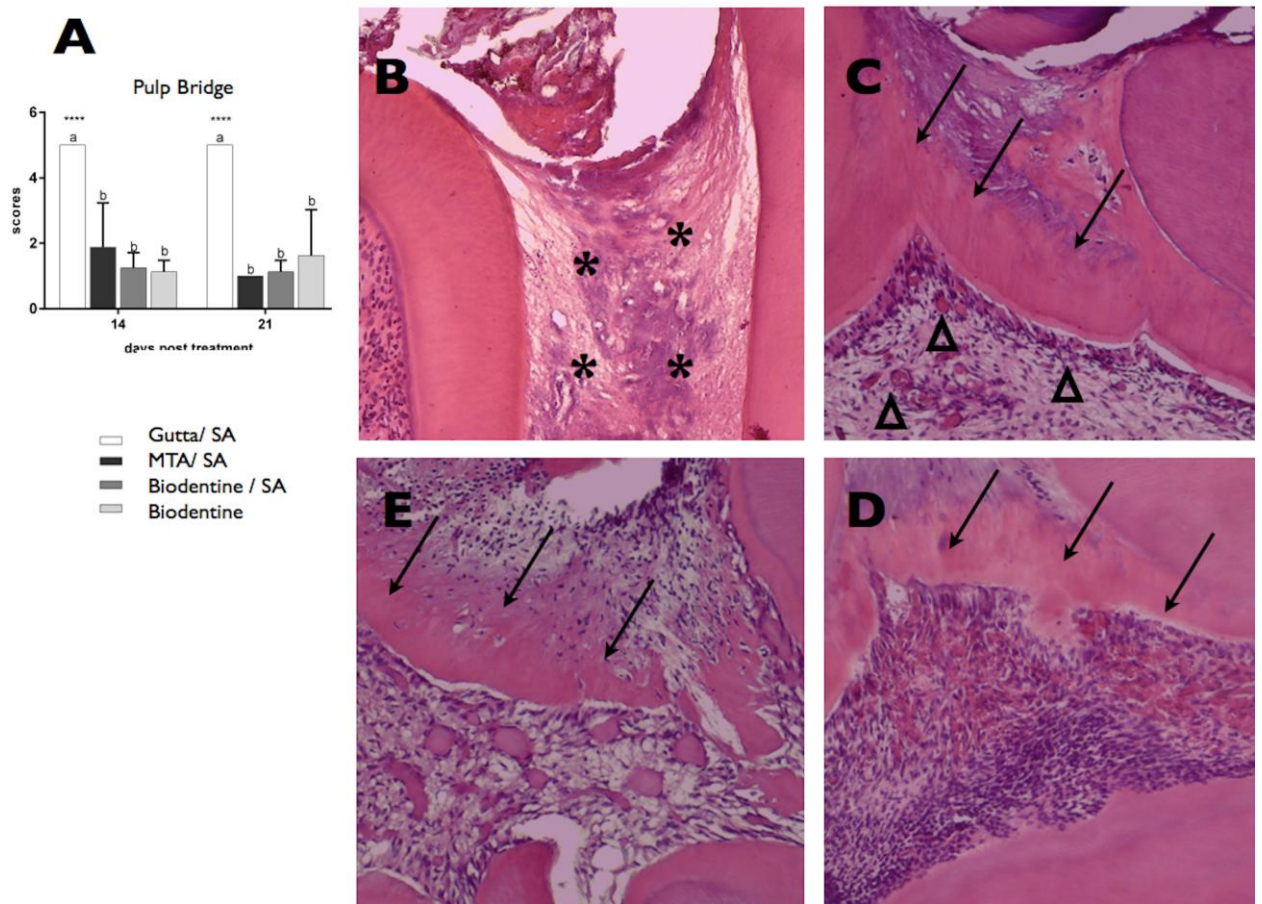


**Figure 2.** Inflammatory event means and standard deviations after 14 and 21 days of pulp capping. **(A)** Significant differences of inflammation intensity and **(B)** extension were observed comparing all test groups with the positive control ( $P < 0.0001$ ). In the 21 days experimental period, samples capped with Biodentine alone showed more intense inflammatory infiltrate compared to the ones capped with Biodentine and sealed with silver amalgam (SA) ( $P < 0.01$ ). **(C1- C2)** Sample capped with gutta-percha and sealed with SA showing abscess formation (\*) and intense inflammatory infiltrate that extends up to the root canal middle third (arrow) after 21 days (H/E - original magnification 40x and 100x). Samples capped with **(D)** MTA and **(E)** Biodentine and sealed with SA 14 days after treatment. Note that the inflammatory infiltrate is limited to the coronal portion of the root (arrows) (H/E - original magnification 40x). **(F1-F2)** Sample capped and sealed with Biodentine showing intense inflammatory infiltrate (\*) (H/E - original magnification 40x and 100x) associated to **(G)** the loss of coronal seal.



**Figure 3.** Degenerative event mean and standard deviation scores that took place after capping procedures. **(A)** Significant differences were observed comparing all test groups with the positive control in both 14 ( $P < 0.05$ ) and 21 days ( $P < 0.01$ ) experimental periods. **(B)** Untouched teeth served as the control for the absence of pulp inflammation and/or degeneration, being featured by abundant cellular content (H/E - original magnification 100x). **(C)** Sample capped with gutta-percha and sealed with silver amalgam 14 days after the procedures showing hyalinization area and reduction of dental pulp cellular content (arrows) (H/E - original magnification 100x). **(D)** Specimen capped with MTA and sealed with silver amalgam at the 21 days experimental period presenting pulp calcification (\*) and fibrous condensation (arrows) (H/E - original magnification 100x). **(E)** Pulp Stones ( $\Delta$ ) and tissue hyalinization in a sample capped with Biodentine and sealed with silver amalgam 21 days after treatment (H/E - original magnification 100x). **(F)** Specimen capped and sealed with Biodentine alone presenting both inflammatory infiltrate (\*) and degenerative events (arrows) associated to the loss of coronal seal after 21 days (H/E - original magnification 100x).





**Figure 4. (A)** Graph displaying mean and standard deviation scores for pulp bridge formation after capping procedures amongst groups. All test groups showed significant differences related to the control ( $P < 0.0001$ ); **(B)** Sample capped with gutta-percha showing pulp necrosis (\*) and absence of hard tissue barrier after 21 days (H/E - original magnification 100x); **(C)** healed and well-vascularized tissue ( $\Delta$ ) associated with pulp bridge formation (arrows) 21 days after pulp capping with MTA/SA (H/E - original magnification 100x); **(D)** Sample capped with Biodentine and sealed with silver amalgam at the 14 days experimental period presenting thick and completely formed hard tissue barrier (arrows) (H/E - original magnification 100x); **(E)** Sample capped and sealed with Biodentine showing almost complete hard tissue barrier (arrows) after 14 days (H/E - original magnification 100x).

**5 ARTIGO 02**

**Rats' periodontal response after furcal perforation using conventional mineral trioxide aggregate (MTA) or a tricalcium silicate based-material (Biodentine™).**

Submetido ao periódico Journal of Endodontics

Fator de impacto: 3,35



**Rat's periodontal response after furcal perforation using conventional mineral trioxide aggregate (MTA) or a tricalcium silicate based-material (Biodentine™).**

Magda S. Reis <sup>1,3</sup> DDS, MSc

Roberta K. Scarparo <sup>2</sup> DDS, MSc, PhD

Liviu Steier <sup>4</sup> DDS, MSc, PhD

José A. P. Figueiredo <sup>1</sup> DDS, MSc, PhD

<sup>1</sup> Clinical Department, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Conservative Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Nursing and Dentistry, University of Santa Cruz do Sul (UNISC), Santa Cruz do Sul, RS, Brazil

<sup>4</sup> MSc in Endodontology Director, Dental Education Unit, University of Warwick, Warwick University Medical School, Coventry, United Kingdom

\*Corresponding author

Roberta Kochenborger Scarparo

Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2492 - CEP 90035-003

Porto Alegre – RS – Brazil

Phone: 55 51 3308 5010

[robertascarparo@hotmail.com](mailto:robertascarparo@hotmail.com) / [roberta.scarparo@ufrgs.br](mailto:roberta.scarparo@ufrgs.br)

## Highlights

- Tissue responses after sealing furcal perforations with mineral trioxide aggregate (MTA) or with a silicate-based containing material (Biodentine™) were compared in a rat experimental model.
- Biodentine™ and MTA promoted similar responses when used in furcal perforations.
- Biodentine™ reduced inflammation intensity and extent at furcation area, similarly to MTA.

## **Rats' periodontal response after furcal perforation using conventional mineral trioxide aggregate (MTA) or a tricalcium silicate based-material (Biodentine™).**

### **Abstract**

**Introduction:** This study assessed tissue responses to furcal exposure and sealing with either Biodentine™ or MTA. **Methods:** Sixty (60) male *Wistar* rats were divided into five groups, according to the materials (n=6 per group/period). The mandibular first molars had furcation mechanically exposed and sealed with either MTA or Biodentine™, and restored with silver amalgam. In an additional test group, teeth were both sealed and restored with Biodentine™. Furcal sealing with gutta-percha and silver amalgam restoration served as a positive control, and untouched teeth were the negative control. Histological evaluation was performed at experimental periods of 14 or 21 days. The results were subjected to ANOVA and Tukey *post hoc* tests ( $p < 0.05$ ). **Results:** Biodentine™ and MTA presented satisfactory results, which were characterized by a mild inflammatory response compared to the control, regardless of the material used for coronal sealing and of the experimental period evaluated ( $p < 0.0001$ ). All the test groups showed less bone resorption than the positive control after 21 days ( $p < 0.05$ ), being this difference more pronounced in teeth restored with silver amalgam. Cement repair occurred in 30% of MTA and Biodentine™ samples, and was not detected in any specimen of the positive control group. **Conclusions:** Biodentine™ and MTA promoted similar responses when used to seal furcal perforations. Although further investigations are required, Biodentine should be considered a promising alternative. As a definitive restorative material it did not provide efficient seal.

**Key Words:** Furcal perforation, Repair, Biodentine, Mineral trioxide aggregate.

## Introduction

Root perforations which communicate pulpal space with periodontal tissues may have pathological (i.e. extensive caries, resorption) or iatrogenic (i.e. procedural errors or accidents) origin. The affected tissues respond with various levels of inflammation and success or failure depend on site, extent of perforation and time taken to perform the sealing (1-2). This may cause secondary periodontal involvement and eventual loss of the tooth (3).

Difficulties with furcal perforations are related to the risk of contamination of the site of exposure. This risk is increased due to the possibility of epithelial proliferation and periodontitis, which could markedly worsen the prognosis of the tooth (3). Cement and bone resorption may jeopardize repair and long term prognosis (2). A shift in this paradigm was established when proper biomaterials, such as mineral trioxide aggregate (MTA), started to be used to seal the perforation and stimulate tissue repair (4-10).

MTA is composed of Portland cement and bismuth oxide, and was firstly advocated for use as a root-end filling material and for repair of root perforations (6). Several studies confirmed its biocompatibility, dental tissue repair and sealing abilities over root perforations (4-5, 7-10).

Despite the aforementioned properties, MTA imposes difficulties with manipulation and applicability, requiring proper training and ability (4, 8, 10). The long setting time (about 3 hours) results in the need for moist, which may request a second visit (4-5, 10). Discoloration is another important issue, and even white MTA formulation is not able to avoid areas to discolor and display a brown-grey precipitate deriving from the reaction of bismuth oxide and sodium hypochlorite, thus altering tooth color (11). There should be a call for action towards the release of novel materials that overcome such inconveniences.

Biodentine™ (Septodont, Sair Maur de Fossés, France) was introduced in 2009 firstly to pulp capping and pulpotomy (12-13) as well as root perforations (8, 14). It belongs to the same family of MTA, with higher control over hazardous by-products (10, 15). It is composed of tricalcium silicate, dicalcium silicate, calcium carbonate, iron oxide and zirconium oxide. Its liquid contains calcium chloride (accelerator) hydro-soluble polymer and water reduction agent (8, 15).

Positive aspects of Biodentine™ have been pointed out, such as low cytotoxicity (16), good biocompatibility, bioactivity (17) and biomineralizing properties (18). Easy

manipulation, good consistency and reduced setting time (10-15 minutes) add to the advantages reported (8, 12-15). Zirconium oxide, the radio-pacifier (15), did not exhibit dentin discoloration (19).

Some in vitro studies showed high mechanic compression resistance and micro hardness (14, 17). However, “in vivo” studies with Biodentine™ on perforations are scarce and not enough evidence has confirmed such potential. Thus, the present investigation aims to assess tissue response to sealing of rats’ furcal perforations with Biodentine™ and compare with currently used MTA.

### **Materials and Methods**

This study was approved by the local Animal Ethics Committee (Protocol: 12/00320). Eighty (60) male Wistar rats weighing approximately 250 g (n=6 per group/period) were anesthetized intraperitoneally with Ketamine (Dopalen, Ceva – Paulínea, SP – Brazil) and Xylazine Rompum, Bayer – São Paulo – SP – Brazil) with 80 and 20 mg/kg body weight, respectively. Mouth opening was achieved by using a previously designed device (20), and the tissues were kept away with the aid of dental pliers. Perforations at furcation area of mandibular first molars were performed in the center of occlusal surface, using round diamond burs (ISO # 1011 HL, KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) at high speed and under water-cooling. The resulting cavities presented nearly the same diameter (about 1mm) of the bur tip. Visual examination and clinical inspection with Rhein probes (Odous de Deus, Belo Horizonte, Brazil) confirmed perforations. Copious irrigation with distilled water and wet cotton pellets with light pressure controlled the bleeding. Sealing was achieved with either MTA (Angelus, Londrina, PR, Brazil) or Calcium Silicate Cement Biodentine - Biodentine™ - (Septodont, Saint Maur-des-Fosses, France), and restored with silver amalgam (DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). In an additional test group, teeth were both sealed and restored with Biodentine. Furcal sealing with white gutta-percha (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) and silver amalgam restoration served as a positive control, and untouched teeth were the negative control (Figure 1). Manipulation of all materials followed manufacturers` instructions. After experimental periods of 14 and 21 days, the animals were euthanized by inhalation of isoflurane, and the jaws were dissected for histological evaluation.

### *Histological processing and analysis*

The samples were fixed with 10% buffered paraformaldehyde for 24 hours, decalcified with 17% EDTA for 5 weeks, and dehydrated in ascending concentrations of ethanol and embedded in paraffin. Five  $\mu\text{m}$ -thick sections in a bucco-lingual direction were stained with hematoxylin and eosin (HE). For each sample, the three sections that better allowed the observation of furcal perforation area were selected for histological analysis. A capture system (Motic Plus Moticam- 5 megapixels) was used for images storage. A histological descriptive analysis of samples was performed and classified in scores by a blinded calibrated examiner (Kappa > 0.90 for all variables) according to inflammation extension and intensity and events of bone resorption and cementum repair in the furcal area (table 1).

Comparisons of histological features amongst groups were performed by 2-way analysis of variance and Tukey post-hoc test, using Graphpad Prism 6.0 Statistical Software (Graph Pad Software Inc. San Diego, CA). Differences were regarded when  $p < .05$ .

## **Results**

Biodentine™ and MTA presented satisfactory results, characterized by a milder inflammatory response compared to the control, regardless of the material and experimental period. Extension of inflammation was similar amongst groups the at 14 days, but all test groups presented more restricted damage compared to control after 21 days. Biodentine and MTA presented less bone resorption at 21 days compared to control ( $p < 0.01$ ), but when Biodentine™ was used as restorative material this difference was less visible ( $p < 0.05$ ). Cement repair occurred only in 30% of Biodentine™ and MTA samples, and no repair occurred in control group. Although not significant, this was a finding worth of note (Figure 2 and 3). Samples of negative control group (healthy teeth) served as a parameter of periodontal tissues homeostasis and revealed absence of inflammation, regular bone and intact cement. Gutta-percha (positive control) caused severe inflammatory reaction and abscess formation (Figure 1).

## **Discussion**

The choice of a proper sealing material for root perforation should always take into consideration its ability to respect, or not be hazardous, to the tissues.

Depending on the case, these materials may determine repair, which is desirable, or bone loss and other sequels, which interfere with treatment prognosis (1-2).

Clinical studies are important as they allow inferences about the symptoms and radiographic observation of repair areas (or its lack of repair) surrounding the periodontal support tissues (21-24). On the other hand, they do not assess tissue responses, which should be the base for accurate material testing, helping to determine the best treatment protocols (1-2, 7, 25-26). Several authors, assessing dental materials' periodontal, pulpal and periapical tissue responses have used animal models such as rats (20, 27-28). Although dogs and monkeys present size and morphology that facilitates access, visualization and control of the material to seal perforations (7, 25-26, 29-32), rats contain biological similarities with humans with a faster metabolism, which reduces the time of research (20, 27-28).

MTA and Biodentine™ performed better than the control in reducing the inflammatory response at the damaged site. This occurred both in intensity and in extent in up to 21 days. Positive characteristics of Biodentine™, such as biocompatibility, lack of cytotoxicity or genotoxicity, antimicrobial effects and low potential for tooth discoloration (15-16, 19) helps us speculate that this material could be of use at the site of the perforation as an alternative to MTA.

The analysis of cement after the perforations sealing has found repair in 30% of Biodentine™ and MTA samples against none of the positive control. Although not statistically significant, these data are worth of note. In agreement, previous studies (7, 29, 32) observed cement repair following dog teeth perforation and sealing with MTA, with or without the use of an internal matrix, differently from the detected when testing different materials (25, 30). The current research showed that Biodentine present similar behavior than MTA in stimulating cementum repair.

A possible explanation for the absence of cementum repair in some samples treated with either MTA or Biodentine could be the hypothesis that furcation behaves differently from apical area, as furcal cement is not cellular and contains a very thin layer. In cemental repair process, periodontal ligament cells turn into cementoblasts, generating a cementoid tissue that resembles bone. However, this is more sensitive in furcal perforations, because of proximity with gingival sulcus, leading to exposure to oral environment and its bacterial contamination. This reduces chances of repair, as opposed to the apical region (20).

The period of 21 days could be short to display significant cementogenesis. There are studies with rats, using 28 days analyses, but authors did not assess cementum formation (28). The downside of longer evaluation periods is the risks of dental structure wear, typical of rodents (20).

Bone resorptions are commonly present in furcal perforations, due to contamination or reaction to the material. If the material is adequate for use, proper sealing may allow osteogenesis (7, 26, 29). Reduction of bone resorption was significant following 21 days with the test materials. A study with MTA showed this trend with primary human cell culture (33). Other studies, not using histological criteria, found similar results with MTA (21-24). Clinical studies generally follow up using radiological criteria of reduction in radiolucency. The osteoblastic activity could explain these findings.

Flow and setting time of sealing materials may influence tissue repair, as long as there is no overflow (29, 34). MTA has challenging characteristics from its manipulation to setting. This may jeopardize furcal seal as it may be removed with irrigation or early occlusal load (4, 8, 10). Biodentine™ has better flow and lower setting time when compared to MTA (8, 14, 19) as well as better resistance to occlusal load (14). Operators also noticed that in this experiment. A previous investigation also reported advantages of Biodentine against MTA on exposure to irrigating solutions (sodium hypochlorite, chlorhexidine, saline). MTA behaved worse when in contact with chlorhexidine (14). Apparently, Biodentine™ forms dentinal tags (17) which allow mechanical anchorage to surface, demanding higher strength for it to dislocate from radicular dentine. On the other hand, tissue response was similar among test groups, which could be explained by MTA biocompatibility. Other materials were tested in previous studies, such as glass ionomer and dental amalgam, with mechanical and chemical advantages over MTA (14, 34).

Contamination, lack of adequate seal and coronal leakage cause poor prognosis to furcal perforation treatment (7-8, 26, 29, 31). The ability of Biodentine™ as a restorative material was tested in one of the groups. Although significant differences were not detected amongst the test groups, a slightly higher bone resorption was detected when Biodentine was used as a restoration. It may be due to contamination, and one can speculate that, if periods of assessment were longer, there would be biofilm formation and lack of adequate restoration would exert further tissue damage.



## **Conclusions**

Biodentine™ showed favorable properties in furcal perforations, being similar to MTA. However, cementum repair should be object of further analysis. Although the study aids to the knowledge about Biodentine™, more needs to be studied for its implementation with lack of doubt in such perforations. As a definitive restorative material it did not provide efficient seal.

## **Acknowledgments**

M.S.R. is a PhD student in Dentistry supported by Pro bolsa 2 (PUCRS). Thanks Ms. Joel Henrique Ellwanger for technical assistance. The authors deny any conflicts of interest related to this study.

## References

1. Fuss Z. Management of root perforations: Classification, diagnosis, prevention, and treatment. *J Endod* 1995;21:442.
2. Seltzer S, Sinai I, August D. Periodontal Effects of Root Perforations Before and During Endodontic Procedures. *J Dent Res*. 1970;49:332-339.
3. Alhadainy HA. Root perforations. A review of literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78:368-374.
4. Darvell BW, Wu RCT. "MTA"—An Hydraulic Silicate Cement: Review update and setting reaction. *Dent Mater*. 2011;27:407-422.
5. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. *J Endod*. 2010;36:400-413.
6. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod*. 1993;19:541-544.
7. Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, et al. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;79:756-763.
8. Haapasalo M, Parhar M, Huang X, et al. Clinical use of bioceramic materials. *Endod Topics* 2015;32:97-117.
9. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. *J Endod*. 2010;36:16-27.
10. Camilleri J. Mineral trioxide aggregate: present and future developments. *Endod Topics* 2015;32:31-46.
11. Camilleri J. Color stability of white mineral trioxide aggregate in contact with hypochlorite solution. *J Endod*. 2014;40:436-440.
12. Tran XV, Gorin C, Willig C, et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res*. 2012;91:1166-1171.
13. Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2013;39:743-747.
14. Guneser MB, Akbulut MB, Eldeniz AU. Effect of Various Endodontic Irrigants on the Push-out Bond Strength of Biodentine and Conventional Root Perforation Repair Materials. *J Endod*. 2013;39:380-384.

15. Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater.* 2013;29:e20-28.
16. Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod.* 2013;39:478-483.
17. Han L, Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int Endod J.* 2011;44:1081-1087.
18. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, et al. Biodentine Induces Immortalized Murine Pulp Cell Differentiation into Odontoblast-like Cells and Stimulates Biomineralization. *J Endod.* 2012;38:1220-1226.
19. Camilleri J. Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine Used for Pulpotomy Procedures. *J Endod.* 2015;41:1139-1145.
20. Scarparo RK, Dondoni L, Bottcher DE, et al. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod.* 2011;37:1069-1073.
21. Arens DE, Torabinejad M. Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate: Two case reports. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;82:84-88.
22. Pace R, Giuliani V, Pagavino G. Mineral Trioxide Aggregate as Repair Material for Furcal Perforation: Case Series. *J Endod.* 2008;34:1130-1133.
23. Ibarrola JL, Biggs SG, Beeson TJ. Repair of a Large Furcation Perforation: A Four-Year Follow-Up. *J Endod.* 2008;34:617-619.
24. Main C, Mirzayan N, Shabahang S, et al. Repair of Root Perforations Using Mineral Trioxide Aggregate: A Long-term Study. *J Endod.* 2004;30:80-83.
25. Balla R, LoMonaco CJ, Skribner J, et al. Histological study of furcation perforations treated with Tricalcium phosphate, hydroxylapatite, amalgam, and Life. *J Endod.* 1991;17:234-238.
26. Beavers RA, Bergenholatz G, Cox CF. Periodontal wound healing following intentional root perforations in permanent teeth of *Macaca mulatta*. *Int Endod J.* 1986;19:36-44.
27. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim.* 2010;44:1-6.
28. Silva MJB, Caliarri MV, Sobrinho APR, et al. An in vivo experimental model to assess furcal lesions as a result of perforation. *Int Endod J.* 2009;42:922-929.

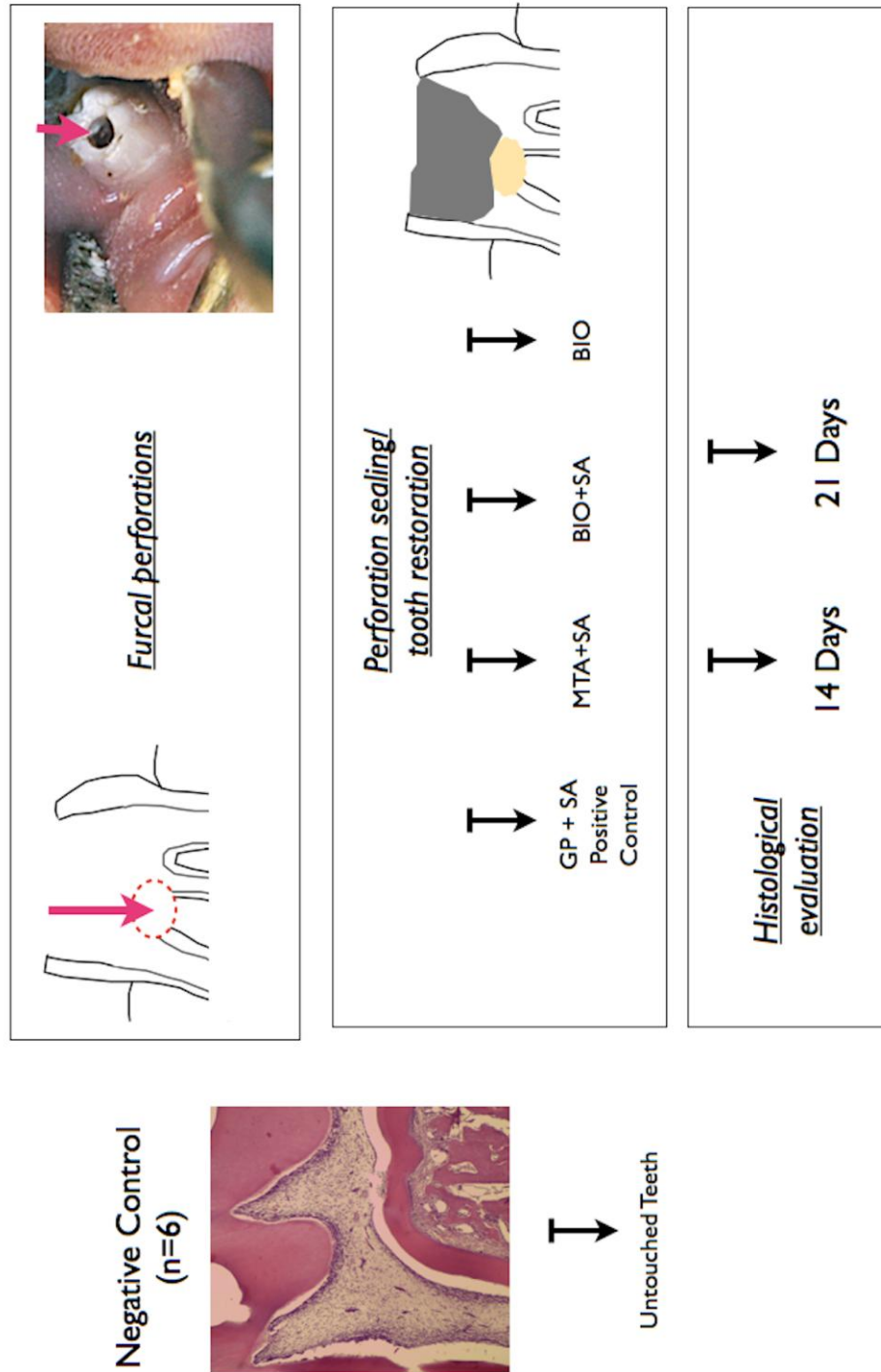
29. Al-Daafas A, Al-Nazhan S. Histological evaluation of contaminated furcal perforation in dogs' teeth repaired by MTA with or without internal matrix. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103:e92-e99.
30. Hartwell GR, England MC. Healing of furcation perforations in primate teeth after repair with decalcified freeze-dried bone: A longitudinal study. *J Endod.* 1993;19:357-361.
31. Vanni JR, Della-Bona Á, Figueiredo JAPD, et al. Radiographic evaluation of furcal perforations sealed with different materials in dogs' teeth. *J Appl Oral Sci.* 2011;19:421-425.
32. Samiee M, Eghbal M, Parirokh M, et al. Repair of furcal perforation using a new endodontic cement. *Clin Oral Invest.* 2010;14:653-658.
33. Perinpanayagam H, Al-Rabeah E. Osteoblasts interact with MTA surfaces and express Runx2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107:590-596.
34. Alhadainy HA, Abdalla AI. Artificial floor technique used for the repair of furcation perforations: A microleakage study. *J Endod.* 1998;24:33-35.

**Table 1:** Scoring system for furcal perforations procedures and tissue response.

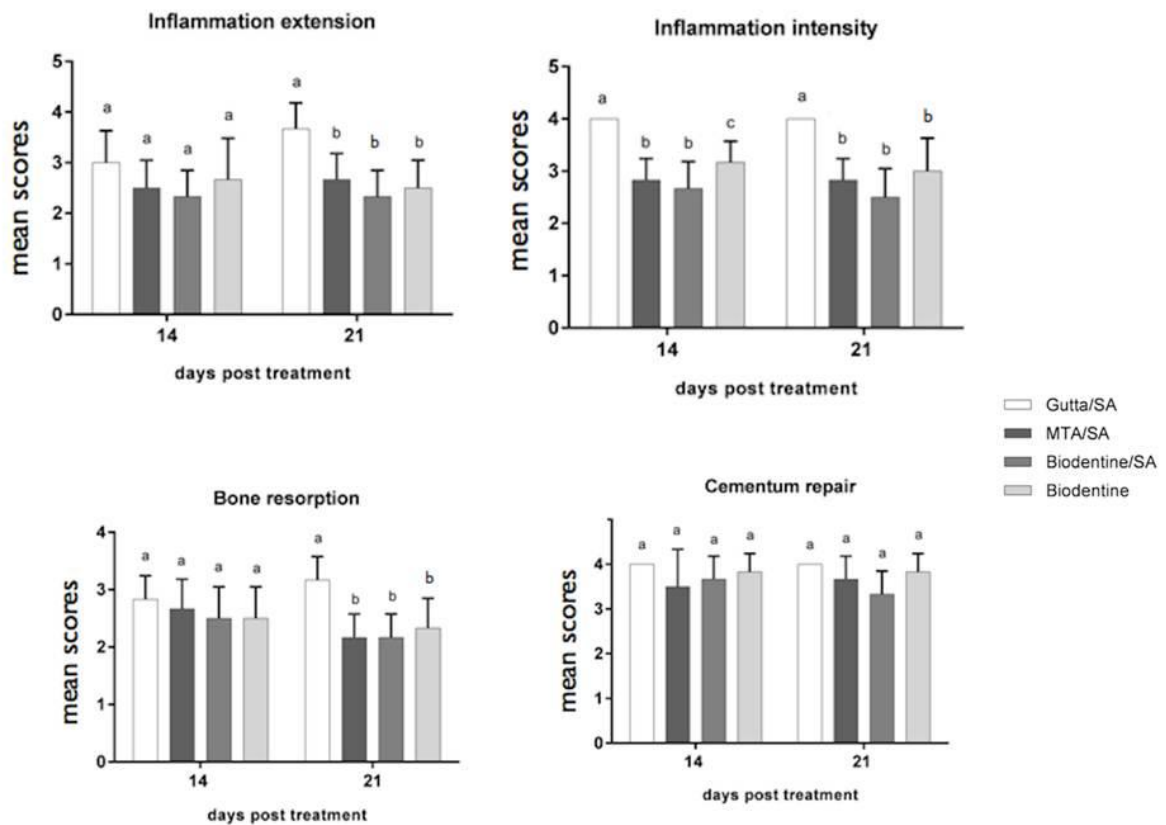
<b>Intensity of inflammatory infiltrate</b>
<p><b>1:</b> Absence of inflammation</p> <p><b>2:</b> Presence of sparse mononuclear cells</p> <p><b>3:</b> Presence of mononuclear cells infiltrate and/or sparse neutrophils and eosinophils</p> <p><b>4:</b> Neutrophilic and/or eosinophilic infiltrate, and areas of abscess</p>
<b>Extent of inflammatory infiltrate</b>
<p><b>1:</b> Absence of inflammation</p> <p><b>2:</b> Inflammation restricted to furcal exposure</p> <p><b>3:</b> Inflammation occupying up to half of furcal bone area</p> <p><b>4:</b> Inflammation occupying more than half of furcal bone area</p>
<b><i>Bone resorption</i></b>
<p><b>1:</b> Totally repaired</p> <p><b>2:</b> Resorption restricted to perforation area</p> <p><b>3:</b> Resorption occupying up to half of furcal bone area</p> <p><b>4:</b> Resorption occupying more than half of furcal bone area</p>
<b><i>Cement repair at furcal area</i></b>
<p><b>1:</b> Totally repaired</p> <p><b>2:</b> Repair until half of furcation cemental area</p> <p><b>3:</b> Repair until a quarter of furcation cemental area</p> <p><b>4:</b> No repair</p>

## Study Design

Positive Control and Test Groups (n=6 per group/period)



**Figure 1.** Design of the experiment showing study groups, procedures and evaluation periods. Histological analysis of tissue responses to gutta-percha (GP) (positive control), mineral trioxide aggregate (MTA) and Biodentine (BIO), in teeth sealed with either silver amalgam (SA) or Biodentine (BIO) was performed 14 and 21 days after perforation of root furcation (red arrow). Untouched teeth served as the negative control.



**Figure 2.** Mean scores and standard deviation of inflammatory events (extension and intensity), bone resorption and cementum repair after 14 and 21 days of furcal perforation and sealing. After 21 days, inflammatory extension was significantly greater in the control group compared to MTA/SA, Biodentine alone ( $p < .01$ ) and Biodentine/SA ( $p < .0001$ ). After 14 days the positive control presented more intense inflammation compared to MTA/SA, Biodentine/SA ( $p < .0001$ ) and Biodentine alone ( $p < .1$ ). After 21 days, bone resorption was greater in the positive control group compared to MTA/SA, Biodentine/SA ( $p < .01$ ) and Biodentine alone ( $p < .05$ ).



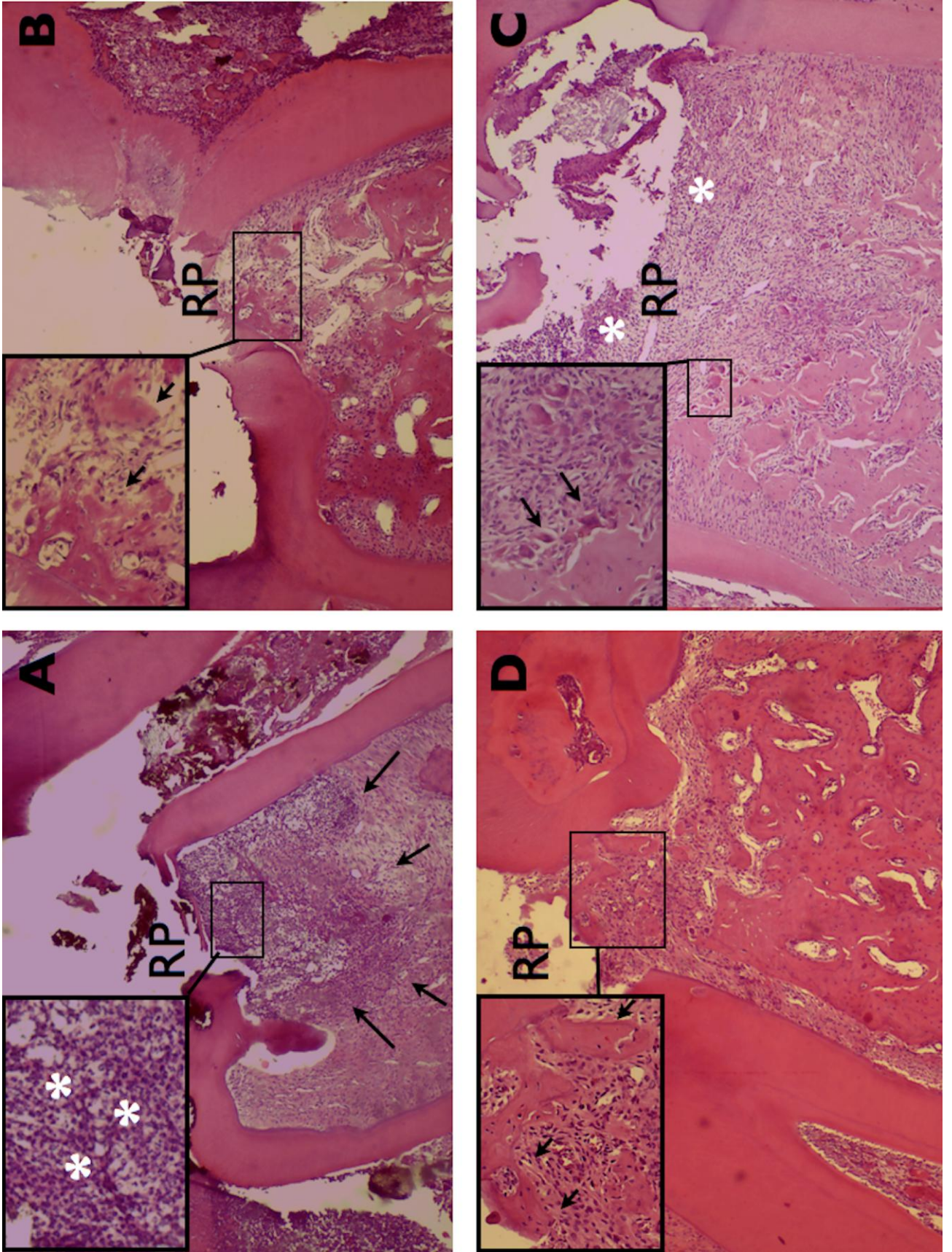


Figure 3.



**Figure 3.** Histological events observed after root perforation (RP) and sealing. **(A)** Sample of the positive control group showing abscess formation (\*) and extent inflammatory infiltrate (arrows) after 14 days (H/E - original magnification 40x and 100x); **(B)** Samples sealed with MTA in the 21 days experimental period presenting osteoblastic activity and bone formation (arrows) (H/E - original magnification 40x and 100x); **(C)** samples sealed with Biodentine alone 14 days after treatment. Note bone resorption and osteoclastic activity (arrows), probably influenced by the inflammatory events (\*) started by the loss of coronal sealing (H/E - original magnification 40x and 100x) **(D)** Sample sealed with Biodentine and restored with silver amalgam showing bone formation (arrows) 21 days after treatment (H/E - original magnification 40x and 100x).

## 6 DISCUSSÃO GERAL

Uma parte dos avanços da pesquisa odontológica está relacionada a novos materiais e, neste caso, é fundamental que a tecnologia esteja aliada às bases biológicas dos tecidos. Em terapias onde os tecidos vivos estabelecem contato direto com os materiais, estes devem apresentar qualidades próximas às ideais e possibilitar o reparo e a regeneração dos tecidos afetados, restabelecendo as funções do dente (TROPE, 2008; COOPER et al., 2010; PRATI & GANDOLFI, 2015).

Muitos materiais à base de silicatos de cálcio possuem reconhecidas propriedades biológicas, mas apresentam limitações, como longo tempo de presa, baixas propriedades mecânicas e difícil manipulação. O mais conhecido é o Agregado Trióxido de Mineral (MTA), que desde a década de 1990 tornou-se uma referência para diversas terapias endodônticas (LEE & TORABINEJAD, 1993; PARANJPE et al., 2011; PARIROKH & TORABINEJAD, 2010b; CAMILLERI, 2015a; DARVEL & WU, 2011; MENTE et al., 2014).

A partir de 2009, outro material à base de silicato de cálcio, o Biodentine<sup>®</sup>, foi introduzido como um substituto ao MTA. Desde então, alguns estudos comparativos têm apontado a superioridade do Biodentine<sup>®</sup>, devido à indução de dentina terciária reacional e reparadora; maior resistência à força de compressão e microdureza; menor tempo de presa; e facilidade de manuseio (LAURENT, CAMPS, ABOUT, 2012; ZANINI et al, 2012; HAN & OKIJI, 2013; GRECH, MALLIA, CAMILLERI, 2013; LUO et al., 2014; RAJASEKHARAN et al., 2014). A capacidade restauradora também foi investigada como uma característica do Biodentine<sup>®</sup> (KOUBI et al., 2012; RASKIN et al., 2012; CAMILLERI, 2013; KOUBI et al., 2013). No entanto, a indicação do Biodentine<sup>®</sup> era para restauração temporária, e não definitiva.

O presente estudo buscou, em ratos *wistar*, compreender as respostas teciduais mediante o uso do MTA e do Biodentine<sup>®</sup> sobre a polpa (exposições pulpares) e tecidos periodontais de suporte (perfurações de furca). Além disso, avaliou o comportamento do Biodentine<sup>®</sup> como material restaurador e sua influência nas respostas teciduais, mesmo tendo ciência de que esta não é sua indicação precípua.

As pesquisas relativas a exposições pulpares e perfurações de furca costumavam utilizar cães e macacos. No entanto, o modelo em ratos tem apresentado uma série de argumentos positivos relacionados aos aspectos técnicos

e financeiros, por se tratar de animais menores (DAMMASCHKE, 2010). O conhecimento da idade e da genética dos ratos elimina interferências amostrais. A microbiota oral e as respostas do hospedeiro são similares às observadas em humanos (KAKEHASHI et al., 1965), e o metabolismo mais acelerado deste modelo proporciona rapidez na progressão das respostas histológicas pulpares e periodontais (SILVA et al., 2009; DAMMASCHKE, 2010). Os incisivos de ratos são de fácil acesso e muito utilizados em pesquisas moleculares por apresentarem crescimento contínuo. No entanto, os molares dos ratos apresentam similaridades anatômicas e histológicas com molares humanos (SILVA et al., 2009; DAMMASCHKE, 2010; SCARPARO et al., 2011; TRAN et al., 2012; DONDONI et al., 2014).

Diante do pequeno porte dos animais, foi preciso gerenciar o seu manuseio. Neste estudo, optou-se por procedimentos a quatro mãos. Após o efetivo controle anestésico e posicionamento correto dos animais, utilizou-se um aparato (SCARPARO et al., 2011) para driblar a pequena dimensão e o posicionamento anatômico dos molares. O dispositivo ampliou o campo de ação e facilitou as etapas operatórias das exposições pulpares e das perfurações de furca.

Para a seleção do outro material utilizado sobre a polpa e tecido periodontal de suporte no comparativo com o Biodentine optou-se pelo MTA como padrão-ouro, pois é também um cimento capaz de tomar presa, diferentemente do hidróxido de cálcio. Para restaurar as cavidades buscou-se um material de fácil aplicação e resistente à força da mastigação empregada pelos roedores. O amálgama apresentou estas características. O uso da resina composta requereria preparo prévio da cavidade com condicionamento ácido e adesivo, comprometendo o tempo operacional de trabalho nestes animais.

A determinação do tempo experimental (14 e 21 dias) considerou estudos prévios, que apontaram para a fragilização da estrutura dentária após a execução dos procedimentos, pois podem comprometer as amostras em períodos de maior tempo observacional (DAMMASCHKE, 2010; SCARPARO et al., 2011; TRAN et al., 2012). Tal fato ficou evidenciado neste estudo durante a análise clínica, fotográfica e radiográfica, que mostrou fraturas de cúspides em determinadas amostras. Ainda assim, foi possível aferir respostas para as análises histológicas propostas.

Os resultados apontaram que o Biodentine® e o MTA apresentaram capacidade de promover tecido duro, produzindo níveis aceitáveis de resposta inflamatória e

mantendo a vitalidade pulpar quando usados como agentes capeadores. Esta pesquisa está em concordância com outros estudos que testaram o MTA em terapias de polpa vital (TORABINEJAD & PARIROKH, 2010; DAMMASCHKE, 2010; TABARSI et al., 2010; ESKANDARIZADEH et al., 2011). Entretanto, mostrou algumas dificuldades a respeito da capacidade do Biodentine<sup>®</sup> em produzir selamento coronal quando utilizado como um material restaurador.

Em relação aos níveis de inflamação pulpar e alterações degenerativas, o tempo experimental de 14 dias mostrou-se adequado para avaliar respostas frente aos biomateriais. Para observar formação de barreira de tecido mineralizado, a maioria das amostras necessitou de 21 dias. Relatos de períodos mais longos para obter os mesmos resultados estão disponíveis com outros modelos (porquinhos-da-índia, cães e humanos) (NOWICKA, et al., 2013; DE ROSSI et al., 2014; TZIAFA et al., 2014).

A simultânea ocorrência de eventos inflamatórios e degenerativos, após exposição pulpar e aplicação de biomateriais, foi avaliada através da comparação das características pulpares de amostras do controle negativo (dentes saudáveis). Estes resultados confirmam as descrições anteriores destas reações teciduais a estímulos externos (SELTZER, BENDER, ZIONTZ, 1963; TROPE, 2008; COOPER, et al., 2010). A presença de células inflamatórias e de abscesso, juntamente com condensação fibrosa, hialinização e áreas calcificadas, caracteriza as alterações pulpares como processos dinâmicos. Embora, a intensidade da inflamação seja frequentemente utilizada para medir o dano, as descrições histológicas detalhadas das respostas pulpares (DONDONI et al., 2014) não são utilizadas na maior parte dos estudos relativos à manutenção da polpa vital (ACCORINTE et al.; 2008; NOWICKA et al., 2013).

O grupo controle positivo mostrou acentuada degeneração e necrose tecidual. Muitas amostras em contato com MTA ou Biodentine<sup>®</sup> apresentaram uma moderada condensação fibrosa, áreas de hialinização, degeneração cálcica e amplas áreas de calcificações intrapulpares. Biodentine<sup>®</sup> favoreceu a ocorrência de calcificações de polpa, embora comparada aos outros grupos não tenham sido estatisticamente significativas. Da mesma forma, Tziafa et al. (2014) observaram maior ocorrência de calcificação ectópica da polpa em amostras tratadas com este material.

MTA e Biodentine<sup>®</sup> produziram reações inflamatórias transitórias com extensão limitada, contribuindo no reparo pulpar e na formação de barreiras de tecido duro,

diferentemente do grupo controle positivo. Em concordância, Nowicka et al. (2013) observaram o mesmo em períodos mais longos. Assim, confirmou-se que, uma leve inflamação, faz parte do processo que leva à proliferação e diferenciação de células-tronco (TROPE, 2008; COOPER et al., 2010). Os eventos inflamatórios estimulam as vias de sinalização moleculares capazes de induzir a proliferação e a diferenciação das células-tronco da polpa dentária (DPSC) em odontoblastóides, levando à síntese, à secreção e à mineralização da matriz de dentina (OBEID et al., 2013; PARANJPE et al., 2011; ZANINI et al., 2012).

As barreiras mineralizadas formadas nos grupos de biomateriais podem ser parcialmente explicadas pelo potencial de mineralização do MTA (TABARSI et al., 2010; DAMMASCHKE et al., 2010; DARVELL & WU, 2011; MENTE et al., 2014) e Biodentine<sup>®</sup> (TRAN et al., 2012; RAJASEKHARAN et al., 2014; DE ROSSI et al., 2014; TZIAFA et al., 2014) devido ao efeito desses materiais sobre o tecido pulpar. Além disso, uma investigação prévia *in vitro* revelou que, mesmo quando preparado em diferentes concentrações, Biodentine<sup>®</sup> é capaz de aumentar a proliferação, a migração e a adesão de células tronco (LUO et al., 2014), o que também pode ter favorecido as respostas biológicas observadas neste estudo.

A capacidade do Biodentine<sup>®</sup> em promover a mineralização pulpar em períodos mais curtos do que outros materiais foi sugerida em estudo *in vitro* com dentes humanos (LAURENT, CAMPS, ABOUT, 2012). Células pulpares em contato com Biodentine<sup>®</sup> mostraram capacidade de promover liberação de TGF- $\beta$ 1, formação de focos mineralizados em apenas 2 dias e aparência de osteodentina após 14 dias. Na presente investigação *in vivo*, embora Biodentine<sup>®</sup> tenha sido capaz de favorecer a formação de barreiras de tecido duro, o processo não foi mais rápido do que nas amostras de MTA.

Ainda que zonas de osteodentina tenham sido previamente descritas como características de pontes dentinárias induzidas por Biodentine<sup>®</sup> (TZIAFA et al., 2014), o mesmo não foi confirmado neste estudo. Isso pode ter acontecido, principalmente, porque o modelo em rato não permite observações exatas nos mesmos locais que possibilitem inferir diferenças dentro das características das pontes de dentina. Os resultados aqui apresentados são categóricos e confirmam as potencialidades de Biodentine<sup>®</sup> na indução de mineralização (TRAN et al., 2012; ZANINI et al., 2012; LAURENT, CAMPS, ABOUT, 2012; NOWICKA et al., 2013; CHANG, et al., 2014) e na manutenção da saúde do tecido pulpar (DE ROSSI et al.,

2014; TZIAFA et al., 2014). Por outro lado, a perda de selamento em algumas amostras não afetou esse potencial. Provavelmente, a necessidade de menor pressão para inserir o Biodentine® como material restaurador nas cavidades dos molares de ratos pode ter influenciado neste resultado.

Assim como em outras investigações (TRAN et al., 2012; NOWICKA et al., 2013; DE ROSSI et al., 2014), amostras capeadas com MTA e Biodentine® promoveram maior formação de barreiras de tecido duro incompletas e completas do que o grupo controle positivo. Foi notável, embora não mensurado, que Biodentine® induziu pontes mais consistentes e mais grossas em comparação com MTA, o que confirma as conclusões de outros estudos (DE ROSSI et al., 2014; TZIAFA et al., 2014).

A capacidade dos materiais restauradores em manter um vedamento coronal eficiente é de suma importância para evitar a infecção e permitir o sucesso da terapia da polpa vital (KAKEHASHI, STANLEY, FITZGERALD, 1965; NOWICKA et al., 2013; MENTE et al., 2014; DONDONI et al., 2014;). Como demonstrado no presente estudo, algumas amostras seladas com Biodentine® mostraram degradação ou perda total do material restaurador em 21 dias, ainda que apenas em uma amostra não tenha ocorrido a formação de barreira de tecido mineralizado. A explicação pode ser a ocorrência precoce do selamento biológico. No entanto, falhas no selamento coronal podem impedir o sucesso do tratamento a longo prazo, através de re-infecção e do restabelecimento da doença pulpar, o que provavelmente ocorreria se períodos experimentais mais longos tivessem sido incluídos.

Importante aspecto a ser notado é que, embora o modelo de rato produza maior tensão mastigatória característica dos roedores (SCARPARO et al., 2011; TRAN et al., 2012), a erosão das restaurações de Biodentine® foi verificada também em dentes posteriores humanos (KOUBI et al., 2013). Estes resultados, juntamente com evidências de alteração química e estrutural na presença de ácido, sangue e outros fluidos (CAMILLERI, 2013; GRECH, MALLIA, CAMILLERI, 2013), contradizem os relatos de maior resistência à compressão (CAMILLERI, SORRENTINO, DAMIDOT, 2013) e do adequado uso do Biodentine® como um material restaurador temporário (RASKIN et al., 2012; KOUBI et al., 2012). Assim, a aplicação clínica para esse fim requer cautela.

A escolha do material para selamento de perfurações de furca deve levar em consideração a sua capacidade de não ser agressivo aos tecidos. Dependendo do

caso, o agente pode tanto determinar reparação, o que é desejável, como perda óssea e outras consequências, que interferem no tratamento (SELTZER, SINAI, AUGUST, 1970; FUSS, 1995).

Estudos clínicos que avaliam resultados perante selamento de áreas perfuradas são importantes, pois permitem inferências sobre os sintomas e observação radiográfica de áreas de reparação (ou sua falta de reparação) em torno dos tecidos periodontais de suporte (ALHADAINY, 1994; LEE, MONSEF, TORABINEJAD, 1993; PARIROKH & TORABINEJAD, 2010<sup>a</sup>; PARIROKH & TORABINEJAD, 2010<sup>b</sup>; DARVELL & WU, 2011; HAAPASALO et al., 2015). Por outro lado, eles não avaliam as respostas teciduais que ajudam a determinar os melhores protocolos de tratamento (SELTZER, SINAI, AUGUST, 1970; FUSS, 1995; CAMILLERI, 2015<sup>a</sup>).

Na comparação do selamento de perfurações, MTA e Biodentine<sup>®</sup> tiveram melhor desempenho em reduzir a resposta inflamatória no local agredido do que o controle positivo em intensidade e em extensão quando atingiu 21 dias. A redução da inflamação, em conjunto com as características positivas de Biodentine<sup>®</sup> (GRECH, MALLIA, CAMILLERI, 2013; ZHOU et al., 2013), contribui para especular que este material pode ser utilizado no local da perfuração, como uma alternativa ao MTA.

A análise do tecido cementário, após selamento das perfurações, evidenciou a reparação do cimento em 30% das amostras dos grupos que utilizaram Biodentine<sup>®</sup> e MTA contra nenhuma do controle positivo. Apesar de não serem estatisticamente significativos, estes dados são dignos de nota, pois concordam com diferentes estudos (PITT FORD et al., 1995; AL DAAFAS & AL-NAZHAN, 2007; HAKKI, et al., 2009; SAMIEE et al., 2010). Neles, foi detectada reparação cementária em dentes selados com MTA, diferentemente do que foi observado com outros materiais (BALLA et al., 1991; HARTWELL & ENGLAND, 1993). A atual pesquisa mostrou que Biodentine<sup>®</sup> tem comportamento semelhante ao MTA para estimular o reparo do cimento.

Uma hipótese para a ausência de reparação do cimento em algumas amostras tratadas com MTA ou Biodentine<sup>®</sup> é que o cimento da furca se comporta de forma diferente da região apical, pois o cimento não é celular e contém uma camada muito fina. No processo de reparação de cimento, as células do ligamento periodontal se transformam em cementoblastos, gerando um tecido ósseo com

aspecto cementóide. No entanto, isto é mais sensível em perfurações de furca, por causa da proximidade do sulco gengival, levando à exposição ao ambiente bucal e à sua contaminação bacteriana. Tal aspecto reduz as possibilidades de reparação, diferentemente do que ocorre na região apical (SCARPARO et al., 2011). Além disso, o período de 21 dias pode ter sido curto para exibir cementogênese significativa. Existem estudos de 28 dias com ratos, mas os autores não avaliaram o critério de formação de cimento (SILVA et al., 2009). Como anteriormente apontado, períodos maiores de avaliação aumentam o risco de desgaste da estrutura dental de ratos (SCARPARO et al., 2011; TRAN et al. 2012). Futuras investigações podem incluir diferentes níveis de perfuração, semelhante a estudos clínicos, mas com número compatível de amostras para permitir inferências adequadas.

Reabsorções ósseas aparecem com frequência em perfurações de furca, devido à contaminação ou reação ao material. Se este for adequado para utilização sobre os tecidos, há uma redução na reabsorção óssea e estímulo à osteogênese (BEAVERS, BERGENHOLTZ, COX, 1986; PITT FORD et al., 1995; AL-DAAFAS & AL-NAZHAN, 2007). Neste estudo, a redução da reabsorção óssea foi significativa após 21 dias com MTA e Biodentine<sup>®</sup>, sugerindo osteogênese. Pesquisa prévia com MTA mostrou esta tendência com a cultura de células primárias humanas (PERINPNAYAGAN & AL-RABEAH, 2009). Outras investigações clínicas, que não utilizaram critérios histológicos, também encontraram resultados semelhantes com MTA (ARENS & TORABINEJAD, 1996; MAIN et al., 2004; YILDIRIM & DALCI, 2006; PACE, GIULIANI, PAGAVINI, 2008; IBARROLA, BIGGS, BEESON, 2008;). Esse tipo de estudo geralmente utiliza critérios radiológicos que avaliam redução de radiolucência. Nestes casos, a atividade osteoblástica poderia explicar esses achados.

Escoamento e tempo de presa dos materiais de selamento podem influenciar a reparação dos tecidos quando ocorre extravazamento (ALHADAINY & ABDALLA, 1998; AL-DAAFAS & AL-NAZHAN, 2007). O MTA tem características difíceis de manipulação e elevado tempo de presa. Isso pode colocar em risco o selamento da furca, visto que ele pode ser removido ou deslocado do local com a irrigação ou a carga oclusal (DARVELL & WU, 2011; HAAPASALO et al., 2015; CAMILLERI, 2015a). O Biodentine<sup>®</sup> apresentou melhor escoamento e menor tempo de presa quando comparado com o MTA (GUNESER, AKBULUT, ELDENIZ, 2013; HAAPASALO et al., 2015; CAMILLERI, 2015b), bem como uma melhor resistência à



carga de oclusão (GUNESER, AKBULUT, ELDENIZ, 2013). Isto foi notado pelos operadores também nesta experiência.

Um estudo prévio relatou as vantagens do Biodentine® em relação ao MTA quando ambos foram expostos a substâncias irrigantes (hipoclorito de sódio, clorexidina, soro fisiológico). MTA apresentou comportamento aquém quando em contato com a clorexidina (GUNESER, AKBULUT, ELDENIZ, 2013). Aparentemente, o Biodentine®, por formar *tags* com a dentina (HAN & OKIJI, 2011), permite maior ancoragem mecânica à superfície, exigindo maior força para seu deslocamento da dentina radicular. Por outro lado, a resposta do tecido foi semelhante entre os grupos teste, que poderia ser explicada pela biocompatibilidade do MTA. Outros materiais foram testados em estudos anteriores, como o ionômero de vidro e o amálgama, com maiores vantagens mecânicas e químicas sobre o MTA (ALHADAINY & ABDALLA, 1998; GUNESER, AKBULUT, ELDENIZ, 2013,).

Contaminação da área de furca, ausência de selamento adequado e infiltração coronária contribuem para um prognóstico ruim do tratamento de perfurações de furca (BEAVERS, BORGENTHOLTZ, COX, 1986; PITT FORD et al., 1995, AL-DAAFAS & AL-NAZHAN, 2007; VANNI et al., 2011; HAAPASALO, et al., 2015). A capacidade restauradora do Biodentine® também foi testada em um dos grupos do experimento de perfuração. Embora diferenças significativas não tenham sido detectadas entre os grupos teste, uma reabsorção óssea ligeiramente mais elevada foi observada quando Biodentine® foi usado como material de restauração. Isso pode ter ocorrido devido à contaminação. Além disso, pode-se especular que, se os períodos de avaliação fossem maiores, haveria a formação de biofilme e a falta de restauração adequada exerceriam danos aos tecidos.

Embora os resultados do presente estudo tenham possibilitado conhecer mais o Biodentine®, averiguou-se a similaridade com o MTA quando aplicado sobre os tecidos pulpar e periodontal nas terapias de polpa vital e de perfurações de furca. Como os resultados de reparação do cimento não foram evidentes, uma análise mais aprofundada é necessária. Também o uso do Biodentine® como restauração mostrou limitações em relação à capacidade de vedamento coronal, e deve, portanto, estar associado com um material restaurador mais eficiente para assegurar resultados positivos ao longo do tempo. As vantagens do Biodentine® que corroboram para a escolha do produto na prática odontológica estão na facilidade do manuseio e na perspectiva de evitar a descoloração dos dentes. Cabe verificar, em

longo prazo, o comportamento clínico deste material em humanos. Para vencer a prova do tempo, no entanto, é preciso que seu uso seja testado e propriedades e limitações melhor entendidos. Assim, poder-se-á desvelar o real alcance deste promissor material.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

- O Biodentine<sup>®</sup> e o MTA mostraram propriedades similares favoráveis nas terapias de polpa vital e de perfurações de furca.
- Nas pulpotomias, Biodentine<sup>®</sup> e MTA apresentaram diminuição significativa da resposta inflamatória (intensidade e extensão) e dos eventos degenerativos. A formação de tecido mineralizado foi confirmada. Quando Biodentine<sup>®</sup> foi usado como material restaurador, essa diferença foi menos visível.
- Nas perfurações de furca, Biodentine<sup>®</sup> e MTA apresentaram redução da resposta inflamatória (intensidade e extensão) e dos eventos de reabsorção óssea. Porém, quando Biodentine<sup>®</sup> foi usado como material restaurador, essa diferença foi menos visível.
- O uso do Biodentine<sup>®</sup> como material restaurador não promoveu selamento coronário eficiente, não sendo recomendável para este fim.

## REFERÊNCIAS

Accorinte MdLR, Holland R, Reis A, et al. Evaluation of Mineral Trioxide Aggregate and Calcium Hydroxide Cement as Pulp-capping Agents in Human Teeth. *J Endod.* 2008;34:1-6.

Aguilar P, Linsuwanont P. Vital Pulp Therapy in Vital Permanent Teeth with Cariously Exposed Pulp: A Systematic Review. *J Endod.* 2011;37:581-587.

Al-Daafas A, Al-Nazhan S. Histological evaluation of contaminated furcal perforation in dogs' teeth repaired by MTA with or without internal matrix. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103:e92-e99.

Alhadainy HA, Abdalla AI. Artificial floor technique used for the repair of furcation perforations: A microleakage study. *J Endod.* 1998;24:33-35.

Alhadainy HA. Root perforations. A review of literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78:368-374.

Arens DE, Torabinejad M. Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate: Two case reports. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;82:84-88.

Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, et al. A comparative study of histologic response to different pulp capping materials and a novel endodontic cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106:609-14.

Balla R, LoMonaco CJ, Skribner J, et al. Histological study of furcation perforations treated with Tricalcium phosphate, hydroxylapatite, amalgam, and Life. *J Endod.* 1991;17:234-238.

Beavers RA, Bergenholatz G, Cox CF. Periodontal wound healing following intentional root perforations in permanent teeth of *Macaca mulatta*. *Int Endod J.* 1986;19: 36-44.

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

Camilleri J. Color stability of white mineral trioxide aggregate in contact with hypochlorite solution. *J Endod.* 2014;40:436-440.

Camilleri J. Investigation of Biodentine as dentine replacement material. *J Dent.* 2013;41:600-610.

Camilleri J. Mineral trioxide aggregate: present and future developments. *Endod Topics.* 2015a;32:31-46.

Camilleri J. Characterization of modified calcium-silicate cements exposed to acidic environment. *Materials Characterization* 2011;62(1):70-75.

Camilleri J. Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine Used for Pulpotomy Procedures. *J Endod.* 2015b;41:1139-1145.

Chang SW, Lee SY, Ann HJ, et al. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. *J Endod.* 2014;40:1194-200.

Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, et al. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent.* 2010;38:687-97.

Corral Nuñez CM, Bosomworth HJ, Field C, et al. Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate Induce Similar Cellular Responses in a Fibroblast Cell Line. *J Endod.* 2014;40:406-411.

Dammaschke T, Stratmann U, Wolff P, et al. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an immunohistologic comparison with calcium hydroxide in rodents. *J Endod.* 2010;36:814-9.

Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim.* 2010;44:1-6.

Daoudi MF, Saunders WP. In Vitro Evaluation of Furcal Perforation Repair Using Mineral Trioxide Aggregate or Resin Modified Glass Ionomer Cement with and without the Use of the Operating Microscope. *Journal of endodontics* 2002;28(7):512-515.

Darvell BW, Wu RCT. "MTA"—An Hydraulic Silicate Cement: Review update and setting reaction. *Dent Mater.* 2011;27:407-22.

De Rossi A, Silva LAB, Gatón-Hernández P, et al. Comparison of Pulpal Responses to Pulpotomy and Pulp Capping with Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate in Dogs. *J Endod.* 2014;40:1362-9.

Dondoni L, Scarparo RK, Kantarci A, et al. Effect of the pro-resolution lipid mediator Resolvin E1 (RvE1) on pulp tissues exposed to the oral environment. *Int Endod J.* 2014;47:827-34.

Eskandarizadeh A, Parirokh M, Shahpasandzadeh M, et al. A comparative study on dental pulp response to calcium hydroxide, white and grey mineral trioxide aggregate as pulp capping agents. *J Conserv Dent.* 2011;14:351.

Formosa LM, Mallia B, Camilleri J. The effect of curing conditions on the physical properties of tricalcium silicate cement for use as a dental biomaterial. *Int Endod J.* 2012;45:326-36.

Fuss Z. Management of root perforations: Classification, diagnosis, prevention, and treatment. *J Endod.* 1995;21:442.

Grech L, Mallia B, Camilleri J. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *Int Endod J.* 2013;46:632-41.

Grech L, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mater*. 2013;29:e20-8.

Guneser MB, Akbulut MB, Eldeniz AU. Effect of Various Endodontic Irrigants on the Push-out Bond Strength of Biodentine and Conventional Root Perforation Repair Materials. *J Endod*. 2013;39:380-384.

Haapasalo M, Parhar M, Huang X, et al. Clinical use of bioceramic materials. *Endod Topics*. 2015;32:97-117.

Hakki SS, Bozkurt SB, Hakki EE, et al. Effects of Mineral Trioxide Aggregate on Cell Survival, Gene Expression Associated with Mineralized Tissues, and Biomineralization of Cementoblasts. *J Endod*. 2009;35:513-519.

Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. *Int Endod J*. 2013;46:808-14.

Hartwell GR, England MC. Healing of furcation perforations in primate teeth after repair with decalcified freeze-dried bone: A longitudinal study. *J Endod*. 1993;19:357-361.

Hashem AAR, Wanees ASA. The Effect of Acidity on Dislodgment Resistance of Mineral Trioxide Aggregate and Bioaggregate in Furcation Perforations: An In Vitro Comparative Study. *J Endod*. 2012;38:245-249.

Holland R. Histochemical response of amputated pulps to calcium hydroxide. *Rev Bras Pesq Med Biol* 1971;4(1-2):83-95.

Ibarrola JL, Biggs SG, Beeson TJ. Repair of a Large Furcation Perforation: A Four-Year Follow-Up. *J Endod*. 2008;34:617-619.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340-9.

Kang S-H, Shin Y-S, Lee H-S, et al. Color Changes of Teeth after Treatment with Various Mineral Trioxide Aggregate-based Materials: An Ex Vivo Study. *J Endod.* 2015;41:737-41.

Kohli MR, Yamaguchi M, Setzer FC, Karabucak B. Spectrophotometric Analysis of Coronal Tooth Discoloration Induced by Various Bioceramic Cements and Other Endodontic Materials. *Journal of endodontics* 2015;41(11):1862-1866.

Koubi G, Colon P, Franquin JC, et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clin Oral Investig.* 2013;17:243-9.

Koubi S, Elmerini H, Koubi G, et al. Quantitative evaluation by glucose diffusion of microleakage in aged calcium silicate-based open-sandwich restorations. *Int J Dent.* 2012;2012:105863.

Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 2012;45:439-48.

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

Luo Z, Li D, Kohli MR, et al. Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent.* 2014;42:490-7.

Ma J, Shen Y, Stojicic S, et al. Biocompatibility of Two Novel Root Repair Materials. *Journal of endodontics* 2011;37(6):793-798.



Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, et al. Mineral Trioxide Aggregate Induces Bone Morphogenetic Protein-2 Expression and Calcification in Human Periodontal Ligament Cells. *Journal of endodontics* 2010;36(4):647-652.

Main C, Mirzayan N, Shabahang S, et al. Repair of Root Perforations Using Mineral Trioxide Aggregate: A Long-term Study. *J Endod.* 2004;30:80-83.

Mente J, Hufnagel S, Leo M, et al. Treatment Outcome of Mineral Trioxide Aggregate or Calcium Hydroxide Direct Pulp Capping: Long-term Results. *J Endod.* 2014;40:1746-51.

Mori GG, Teixeira LM, Oliveira DL, et al. Biocompatibility Evaluation of Biodentine in Subcutaneous Tissue of Rats. *J Endod.* 2014;40:1485-1488.

Nanci A, Bosshardt, DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol.* 2000. 2006; 40: 112-8

Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2013;39:743-7.

Obeid M, Saber SEDM, Ismael AED, et al. Mesenchymal stem cells promote hard-tissue repair after direct pulp capping. *J Endod.* 2013;39:626-31.

Pace R, Giuliani V, Pagavino G. Mineral Trioxide Aggregate as Repair Material for Furcal Perforation: *J Endod.* 2008;34:1130-1133.

Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, et al. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod.* 2011;37:1691-5.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. *J Endod.* 2010a;36:16-27.

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. *J Endod.* 2010b;36:400-413.

Peng W, Liu W, Zhai W, et al. Effect of Tricalcium Silicate on the Proliferation and Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Cells. *J Endod.* 2011;37:1240-1246.

Perinpanayagam H, Al-Rabeah E. Osteoblasts interact with MTA surfaces and express Runx2. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107:590-596.

Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, et al. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;79:756-763.

Prati C, Gandolfi MG. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. *Dent Mater.* 2015;31:351-70.

Rajasekharan S, Martens LC, Cauwels RG, et al. Biodentine material characteristics and clinical applications: a review of the literature. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2014;15:147-58.

Raskin A, Eschrich G, Dejoux J, et al. In vitro microleakage of Biodentine as a dentin substitute compared to Fuji II LC in cervical lining restorations. *J Adhes Dent.* 2012;14:535-42.

Salako N, Joseph B, Ritwik P, et al. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. *Dent Traumatol.* 2003;19:314-20.

Samiee M, Eghbal M, Parirokh M, et al. Repair of furcal perforation using a new endodontic cement. *Clin Oral Invest.* 2010;14:653-658.

Scarpato RK, Dondoni L, Bottcher DE, et al. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod.* 2011;37:1069-73.

Seltzer S, Bender IB, Ziontz M. The dynamics of pulp inflammation: Correlations between diagnostic data and actual histologic findings in the pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1963;16:846-71.

Seltzer S, Sinai I, August D. Periodontal Effects of Root Perforations Before and During Endodontic Procedures. *J Dent Res.* 1970;49:332-339.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004; 364: 149-55.

Shokouhinejad N, Nekoofar MH, Iravani A, et al. Effect of Acidic Environment on the Push-out Bond Strength of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2010;36:871-874.

Silva MJB, Caliaro MV, Sobrinho APR, et al. An in vivo experimental model to assess furcal lesions as a result of perforation. *Int Endod J.* 2009;42:922-929.

Tabarsi B, Parirokh M, Eghbal MJ, et al. A comparative study of dental pulp response to several pulpotomy agents. *Int Endod J.* 2010;43:565-71.

Torabinejad M, Parirokh M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part II: Leakage and Biocompatibility Investigations. *J Endod.* 2010;36:190-202.

Tran XV, Gorin C, Willig C, et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res.* 2012;91:1166-71.

Trope M. Regenerative Potential of Dental Pulp. *J Endod.* 2008;34:S13-S17.

- Tsesis I, Rosenberg E, Faivishevsky V, et al. Prevalence and Associated Periodontal Status of Teeth with Root Perforation: A Retrospective Study of 2,002 Patients' Medical Records. *Journal of endodontics* 2010;36(5):797-800
- Tziafa C, Koliniotou-Koumpia E, Papadimitriou S, et al. Dentinogenic responses after direct pulp capping of miniature swine teeth with Biodentine. *J Endod.* 2014;40:1967-71.
- Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent.* 2000;28:77-92.
- Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res.* 2004;38:314-20.
- Vallés M, Mercadé M, Duran-Sindreu F, et al. Influence of Light and Oxygen on the Color Stability of Five Calcium Silicate–based Materials. *J Endod.* 2013;39:525-528.
- Vallés M, Roig M, Duran-Sindreu F, et al. Color Stability of Teeth Restored with Biodentine: A 6-month In Vitro Study. *Journal of endodontics* 2015;41(7):1157-1160.
- Vanni JR, Della-Bona Á, Figueiredo JAPD, et al. Radiographic evaluation of furcal perforations sealed with different materials in dogs' teeth. *J Appl Oral Sci.* 2011;19:421-425.
- Yildirim G, Dalci K. Treatment of lateral root perforation with mineral trioxide aggregate: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102:e55-e58.
- Zanini M, Sautier JM, Berdal A, et al. Biodentine Induces Immortalized Murine Pulp Cell Differentiation into Odontoblast-like Cells and Stimulates Biomineralization. *J Endod.* 2012;38:1220-6.
- Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, et al. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod.* 2013;39:478-483.

**ANEXO A – Aprovação da Comissão Científica e de Ética da Faculdade de  
Odontologia da PUCRS**



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 12 de dezembro de 2012

**O Projeto de: Tese**

**Protocolado sob nº:** 0022/12

**Intitulado:** Comparação entre o efeito biológico do Biodente™ e o MUA, sobre exposição de tecido pulpar e periodontal da furca: estudo em ratos.

**Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo

**Pesquisadores Associados:** Magda de Sousa Reis

**Nível:** Tese / Doutorado

Foi *aprovado* pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 12 de dezembro de 2012.

*Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CFUA/PUCRS.*

**Profa. Dra. Ana Marla Spohr**  
Coordenadora da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

**ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS**

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 027/13 – CEUA

Porto Alegre, 02 de maio de 2013.


Senhor Pesquisador,

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 12/00320, **“Comparação entre o efeito biológico do biodentineMT e o MTA, sobre exposição de tecido pulpar e periodontal da furca: estudo em ratos”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Lembramos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber  
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. José Antonio Poli de Figueiredo  
FO  
Nesta Universidade

**PUCRS**

**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345

**ANEXO C – Carta de submissão ao periódico Dental Materials**

From: [dentistry.dentmatj@manchester.ac.uk](mailto:dentistry.dentmatj@manchester.ac.uk)

To: robertascarparo@hotmail.com; [roberta.scarparo@puhrs.br](mailto:roberta.scarparo@puhrs.br)

Date: Thu, 3 Sep 2015 20:09:35 +0100

Subject: Submission Confirmation for your paper

Full Length Article

Dear Roberta,

Your submission entitled "Pulpal response after capping with conventional mineral trioxide aggregate (MTA) or a tricalcium silicate based-material (Biodentine)" has been received by Dental Materials.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/dema/>.

Your username is: [robertascarparo@hotmail.com](mailto:robertascarparo@hotmail.com)

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/dema/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/dema/automail_query.asp).

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System Dental Materials

**ANEXO D – Carta de submissão ao periódico Journal of Endodontics**

From: [support@elsevier.com](mailto:support@elsevier.com)

To: robertascarparo@hotmail.com; [roberta.scarparo@pucri.br](mailto:roberta.scarparo@pucri.br)

Date: Thu, 17 Sep 2015 20:57:13 +0100

Subject: Submission Confirmation for Periodontal response after furcal perforation using conventional mineral trioxide aggregate (MTA) or a tricalcium silicate based-material (Biodentine)

Dear Dr. Scarparo,

Your submission entitled "Periodontal response after furcal perforation using conventional mineral trioxide aggregate (MTA) or a tricalcium silicate based-material (Biodentine)" has been received by the Journal of Endodontics.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Journal of Endodontics web site as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/joe/>

Your username is: [robertascarparo@hotmail.com](mailto:robertascarparo@hotmail.com)

If you need to retrieve password details, please go to:

[http://ees.elsevier.com/joe/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/joe/automail_query.asp)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

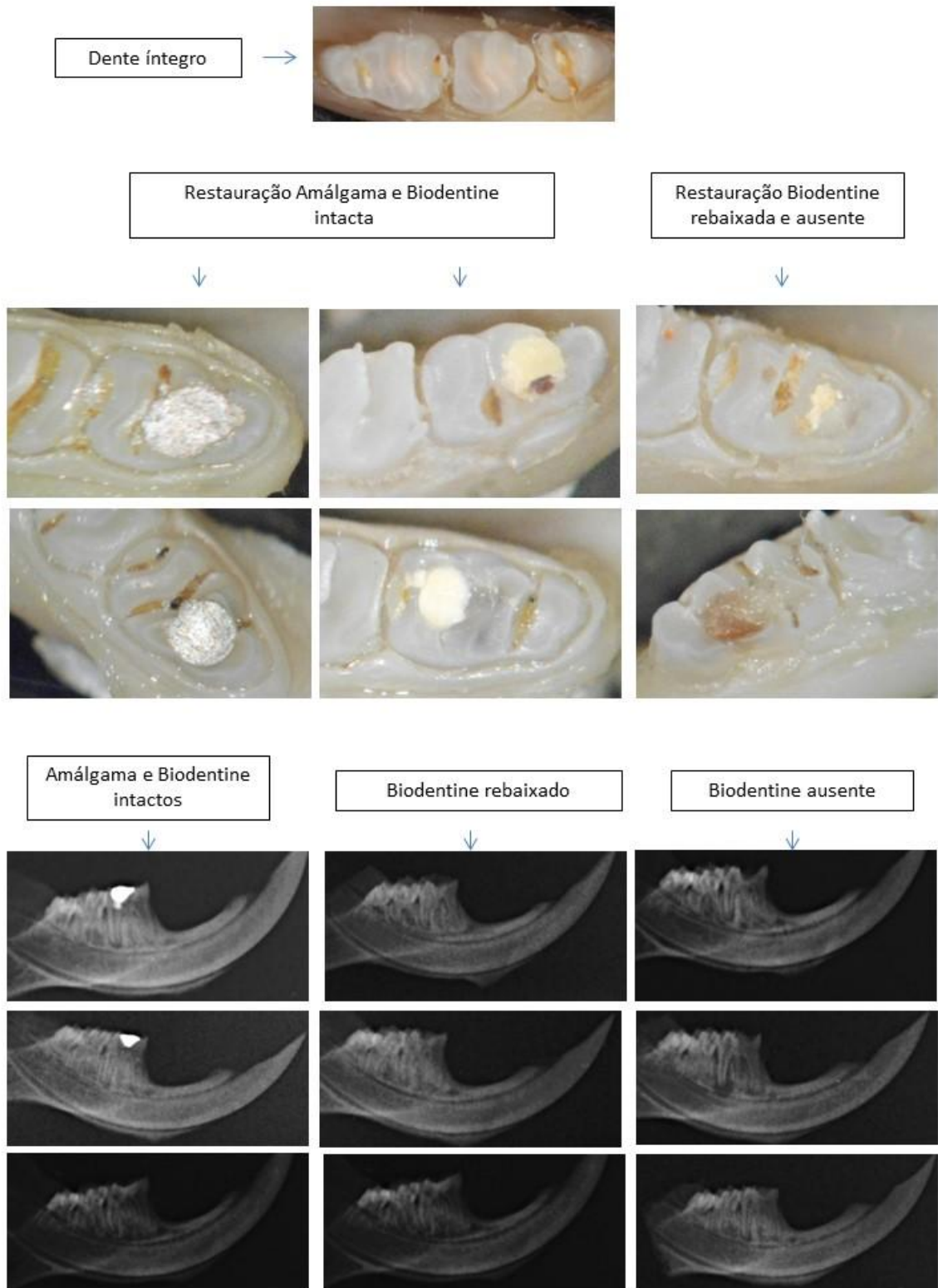
Thank you for submitting your work to the Journal of Endodontics.

Kind regards,

Journal of Endodontics



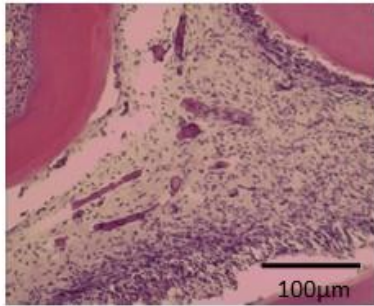
### ANEXO E – Imagens clínicas e radiográficas



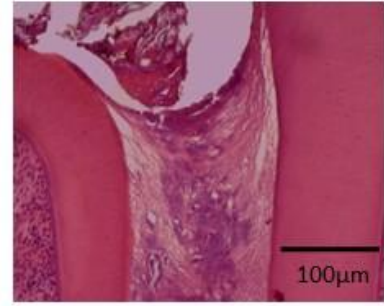
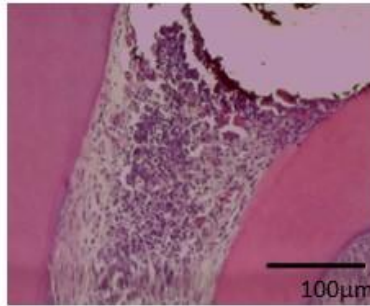
### ANEXO F – Imagens histológicas

#### PULPOTOMIAS

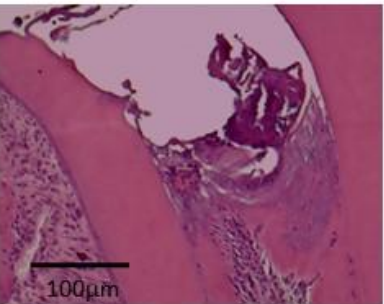
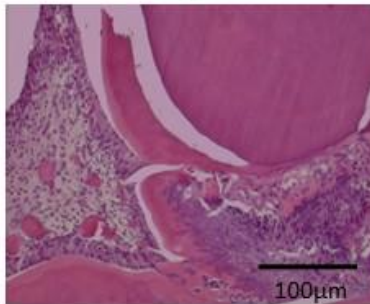
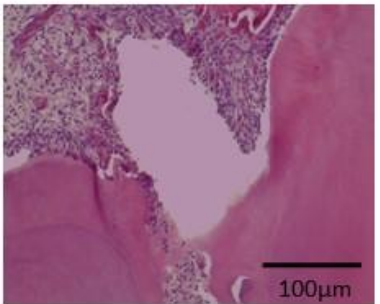
CONTROLE NEGATIVO



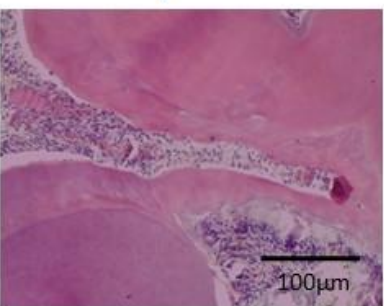
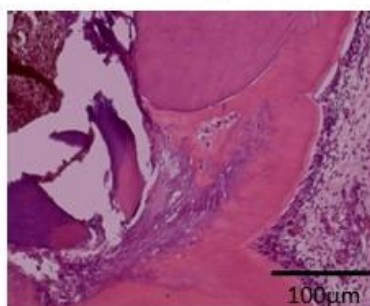
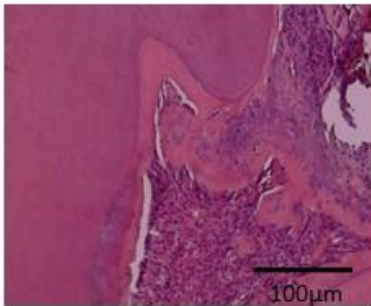
CONTROLE POSITIVO



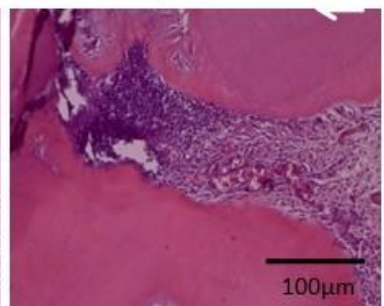
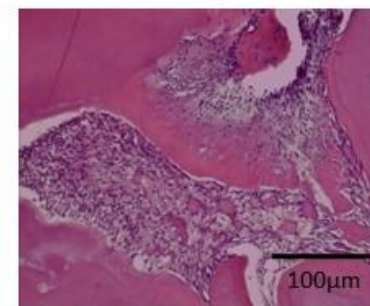
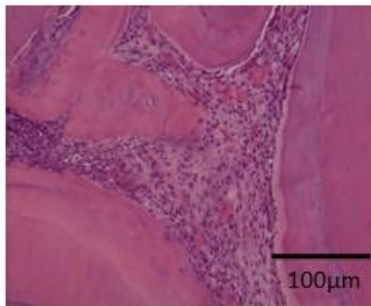
MTA / SA



BIODENTINE / SA

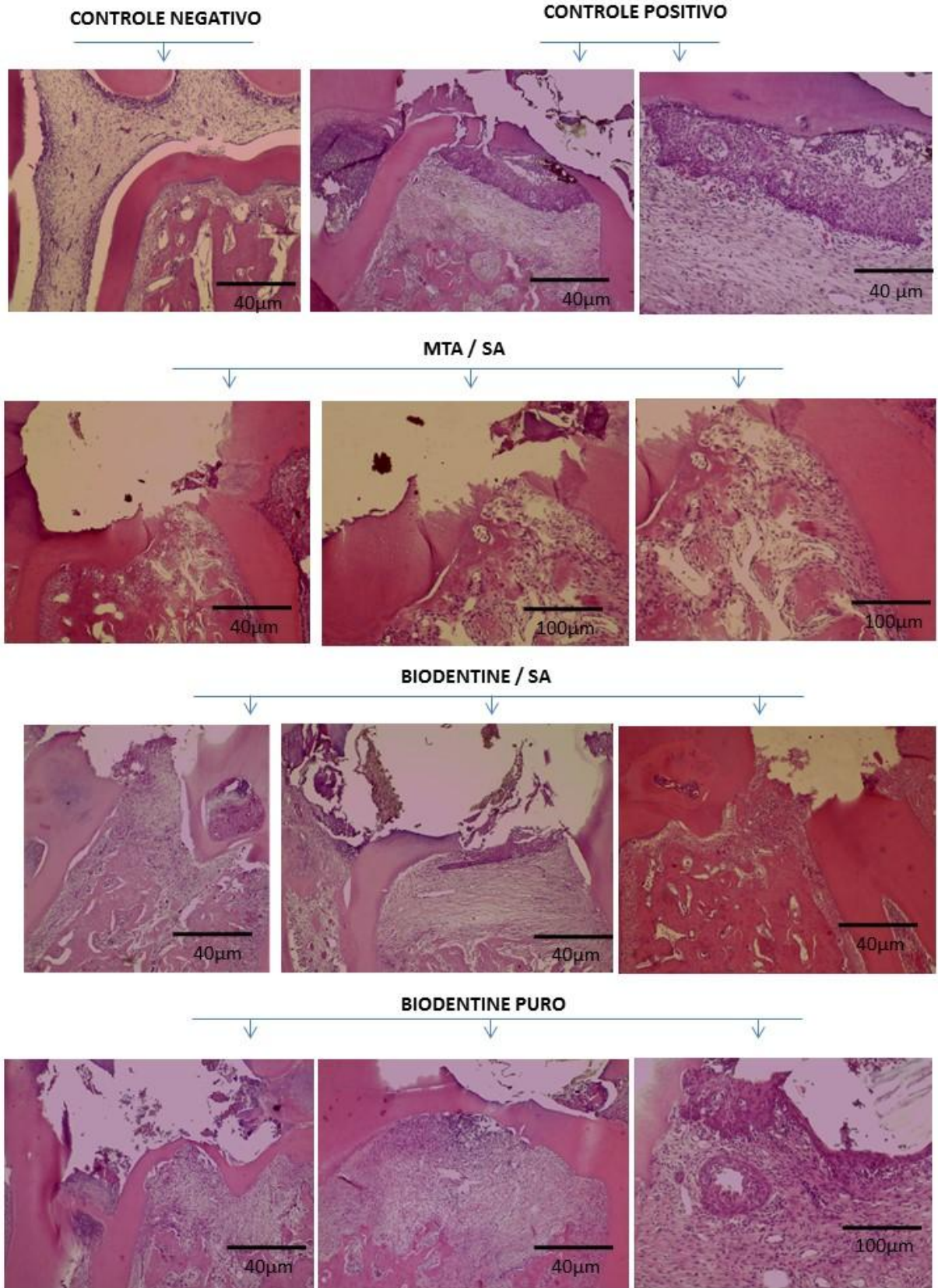


BIODENTINE PURO





### PERFURAÇÕES DE FURCA



### ANEXO G – Imagens Biodentine™ e modo de preparo

