

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FELIPE ANDRETTA COPELLI

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA BIOLÓGICA DA MATRIZ DENTINÁRIA
DESMINERALIZADA LIOFILIZADA IMPLANTADA EM TECIDO
SUBCUTÂNEO DE RATOS.

CURITIBA

2018

FELIPE ANDRETTA COPELLI

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA BIOLÓGICA DA MATRIZ DENTINÁRIA
DESMINERALIZADA LIOFILIZADA IMPLANTADA EM TECIDO
SUBCUTÂNEO DE RATOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Cavalini Cavenago
Coorientador: Prof. Dr. Antonio Adilson Soares
de Lima

CURITIBA
2018

Copelli, Felipe Andretta

Avaliação da resposta biológica da matriz dentinária desmineralizada liofilizada implantada em tecido subcutâneo de ratos / Felipe Andretta Copelli – Curitiba 2018.

67 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Bruno Cavalini Cavenago

Coorientador: Professor Dr. Antonio Adilson Soares de Lima

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui referência

1. Endodontia. 2. Matriz dentinária desmineralizada liofilizada. 3. Biocompatibilidade. 4. Inflamação. 5. Teste de materiais. I. Cavenago, Bruno Cavalini. II. Lima, Antonio Adilson Soares de. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 617.6342

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **FELIPE ANDRETTA COPELLI** intitulada: **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA BIOLÓGICA DA MATIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA LIOFILIZADA IMPLANTADA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de Julho de 2018.



BRUNO CAVALINI CAVENAGO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



EVERDAN CARNEIRO
Avaliador Externo (PUC/PR)



CAROLINA CARVALHO DE OLIVEIRA SANTOS
Avaliador Externo (UFPR)

TERMO DE APROVAÇÃO

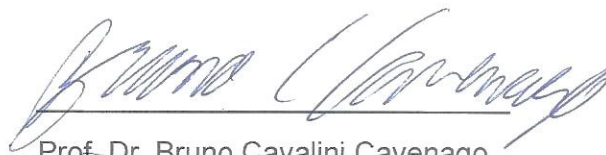
FELIPE ANDRETTA COPELLI

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA BIOLÓGICA DA MATRIZ DENTINÁRIA
DESMINERALIZADA LIOFILIZADA IMPLANTADA EM TECIDO SUB CUTÂNEO DE
RATOS

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte Banca Examinadora:

Orientador:



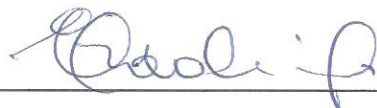
Prof. Dr. Bruno Cavalini Cavenago

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR



Profa. Dra. Carolina Carvalho de Oliveira Santos

Departamento de Odontologia Restauradora, UFPR



Prof. Dr. Everdan Carneiro

Departamento de Odontologia, PUCPR

Curitiba, 31 de julho de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu pai, de quem eu sinto intensa e eterna saudades! Daria tudo para tê-lo aqui acompanhando essa minha realização!

E à minha mãe, a quem sou muito grato por tudo o que fez e faz por mim! Vocês dois são os principais responsáveis por tudo o que eu realizei! Obrigado pelo amor, dedicação e apoio incondicionais! Amo vocês!

A Vivian, minha noiva, agradeço por toda a paciência, compreensão e apoio durante todo o mestrado! Sou muito realizado por tê-la ao meu lado! Te amo muito!

E ao meu avô Cid, e irmãos Fernanda e Lucas, amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná, instituição na qual muito me orgulho de ter estudado durante a graduação, especialização e mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPR.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Cavalini Cavenago pela dedicação, paciência e ensinamentos durante todo o mestrado. Te admiro por seu esforço, conhecimento e humildade! Sou muito grato por todo seu apoio e pelas oportunidades que me proporcionou! Muito obrigado!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima, agradeço pela oportunidade ao me orientar em um trabalho na especialidade que tanto amo. Obrigado pela paciência, confiança e apoio nesses dois anos!

Aos professores da disciplina de Endodontia da UFPR: Prof. Dr. Antonio Batista, a quem tanto admiro desde a graduação, exemplo de professor e endodontista para mim! A Prof. Dra. Carolina Carvalho de Oliveira Santos, agradeço pelo apoio durante todo o mestrado, e pelas valiosas considerações na qualificação, a disciplina de endodontia e o mestrado ganham muito com sua chegada e a do Prof. Bruno. Obrigado também a Prof. Dra. Marili Doro Andrade Deonizio por todo o carinho e apoio desde a graduação, especialização e pelo incentivo para iniciar esse mestrado.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia: agradeço pelos ensinamentos, pelas aulas e pela dedicação ao programa!

Ao Biotério do Setor de Ciências Biológicas e aos seus funcionários pelos orientações e cuidado com os animais utilizados nesse estudo.

Ao banco de dentes por ceder a matriz.

Ao biotério e funcionários do curso de Nutrição e Farmácia.

À Bruna Colombo Cordeiro, do Laboratório de Patologia pela grande ajuda durante os preparos histológicos. Obrigado pelas orientações, pelo esforço e pela companhia durante a pesquisa! Agradeço também aos demais funcionários do curso de odontologia!

À aluna Renata Leal pela colaboração nas várias fases dos experimentos.

Aos colegas do Programa:

Gabriela Fracasso Moraes, foi muita sorte dividirmos a matriz nos nossos estudos, obrigado por toda ajuda, apoio e amizade!

Camila Fabri, Pablo Servilha, Marcelo Morato, Daniel Negrelle e Eduardo Oliveira obrigado pela ajuda durante os experimentos e pela parceria durante todo o curso!

Estendo meus agradecimentos a todos os outros colegas do programa!

RESUMO

A matriz dentinária desmineralizada liofilizada (MDDL) é um complexo de colágeno tipo 1 e fatores de crescimento sem os cristais minerais. Para que a MDDL possa ser indicada para tratamentos reparadores como capeamentos pulpares, pulpotomias e selamento de perfurações sua biocompatibilidade precisa ser avaliada, comparando-a com a de materiais endodônticos contemporâneos. O objetivo deste estudo foi avaliar em tecido subcutâneo de ratos a biocompatibilidade da MDDL comparada com o MTA e Biodentine. Foram utilizados 40 ratos da linhagem *Wistar*, cada animal recebeu duas incisões verticais realizadas no dorso para inserção de quatro tubos de polietileno, sendo 3 preenchidos com os materiais experimentais (MDDL, MTA e Biodentine) e 1 mantido vazio, configurando o grupo controle (n=10). Os animais foram sacrificados após 3, 7, 15 e 30 dias, e as amostras de tecido subcutâneo adjacentes aos tubos implantados foram submetidas a preparação histotécnica. Cortes semi-seriados de 5 micrômetros foram corados com hematoxilina e eosina para avaliação qualitativa descritiva e quantitativa em microscópio de luz. A análise histológica descritiva foi realizada pela observação dos cortes com aumentos de 100 e 400x, enquanto a análise histomorfométrica foi feita com aumento de 400x. A quantificação das células inflamatórias foi realizada por meio do software ImageJ, posteriormente para quantificar a intensidade da resposta inflamatória foram atribuídos escores de 0 a 3, representando desde a ausência de resposta inflamatória até inflamação severa. A análise estatística foi realizada pelos testes Anova e Bonferroni ($p < 0,05$). Todos os grupos apresentaram resposta inflamatória moderada (escore 2) nos dois primeiros períodos, com presença de infiltrado inflamatório predominantemente de macrófagos e proliferação angioblástica. Após 15 dias o grupo controle apresentou resposta inflamatória leve e maior reparo com predomínio de fibroblastos, com diferença significativa dos grupos dos materiais que ainda apresentaram uma inflamação moderada. Aos 30 dias, todos os grupos apresentaram resposta inflamatória leve, com sinais de reparo, predomínio de fibroblastos e maior quantidade de fibras colágenas. Dentro das limitações desse estudo, pode-se afirmar que a MDDL é um material biocompatível, com comportamento biológico similar ao do MTA e Biodentine.

Palavras-chaves: Matriz dentinária desmineralizada liofilizada. Biocompatibilidade. Inflamação. Teste de materiais. Endodontia.

ABSTRACT

Lyophilized demineralized dentin matrix (MDDL) is a type 1 collagen complex and growth factors without the mineral crystals. For MDDL to be indicated for repair treatments such as pulp capping, pulpotomies and perforation sealing its biocompatibility needs to be evaluated comparing it with contemporary endodontic materials. The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of MDDL in rat subcutaneous tissue compared to MTA and Biodentine. Four Wistar rats were used, each animal received two vertical incisions performed on the back for insertion of four polyethylene tubes, three of which were filled with the experimental materials (MDDL, MTA and Biodentine) and 1 were kept empty, as control group (n= 10). After 3, 7, 15 and 30 days, the animals were sacrificed, and the subcutaneous tissue samples adjacent to the implanted tubes were submitted to histotechnic preparation. Semi-serial cuts of 5 micrometers were stained with hematoxylin and eosin for qualitative descriptive and quantitative evaluation under a light microscope. The descriptive histological analysis was performed by observing the sections with magnification of 100 and 400x, while the histomorphometric analysis was done with a 400x magnification and analysis by ImageJ software. Scores from 0 to 3, ranging from the absence of inflammatory response to severe inflammation, were assigned to quantify the intensity of the inflammatory response for each sample. Statistical analysis was performed using the Anova and Bonferroni tests ($p < 0.05$). All groups presented moderate inflammation in the first two periods, with presence of inflammatory infiltrate predominantly of macrophages and angioblastic proliferation. After 15 days the control group presented mild inflammation and greater repair with predominance of fibroblasts, with significant difference of the groups of materials, which still presented moderate inflammation. At 30 days, all groups presented mild inflammatory response, with signs of repair, predominance of fibroblasts and a greater amount of collagen fibers. Within the limitations of this study, it can be stated that MDDL is a biocompatible material, with biological behavior similar to MTA and Biodentine.

Keywords: Lyophilized Demineralized Dentin Matrix. Biocompatibility. Dentin. Inflammation. Materials testing. Endodontics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Período de 3 dias	28
Figura 2 - Período de 7 dias	29
Figura 3 - Período de 15 dias	30
Figura 4- Período de 30 dias	31
Figura 5 - Procedimentos cirúrgicos	56
Figura 6 - Contagem das células no software ImageJ	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 ARTIGO	21
3.1 TÍTULO:.....	21
3.2 RESUMO.....	22
3.5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.6 RESULTADOS	28
3.6.1 Análise histológica descritiva.....	28
3.6.2 Análise histológica morfométrica.....	31
4 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL PARANÁ (CEUA)	51
ANEXO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS DETALHADOS	52
APÊNDICE 1 – NORMAS PARA AUTORES DO PERIÓDICO ESCOLHIDO ..	59

1 INTRODUÇÃO

A dentina representa a maior parte da estrutura dentária, sendo composta por cristais minerais de hidroxiapatita, fibras colágenas e macromoléculas não colágenas (BERTASSONI, 2017). Sua porção inorgânica apresenta 27% de cálcio, com maior concentração deste elemento em sua superfície externa, 13% de fósforo e 0,01% de magnésio. Também possui ferro, cobre, zinco e flúor e o seu teor de água equivale a 10% (ATANCE, 1996).

A matéria orgânica da dentina é composta por fibras colágenas (90% são colágeno do tipo I) que são unidas por lipídios, glicosaminoglicanas e compostos proteicos, ácido condroitino-sulfúrico, resíduo proteico insolúvel e ácido cítrico. Além disso, é possível encontrar colesterol, lipídios e constituintes não colágenos, tais como: fosforinas, fosfoproteínas, sialoproteínas, Gla-proteínas (osteocalcina), proteoglicanas, glicoproteínas, glicoproteínas ácidas (osteonectina) e proteínas séricas (ATANCE, 1996; BERTASSONI *et al.*, 2012; OPSAHL VITAL *et al.*, 2012; CHAUSSAIN *et al.*, 2013; QIN *et al.*, 2015). As glicosaminoglicanas, que fazem parte dos proteoglicanos, são importantes para a maturação de fibrilas de colágeno e mineralização adequada (EMBERY *et al.*, 2001).

O tecido dentinário apresenta elementos bioquímicos potenciais, os quais poderão interagir positivamente com as células permitindo uma melhor adesão, crescimento, migração e diferenciação celular. Tais características podem ser importantes tanto na engenharia tecidual quanto nas enxertias realizadas na ortopedia, neurocirurgia, odontologia, cirurgias plásticas e cirurgias de reconstrução. A dentina é considerada um tecido conjuntivo mineralizado, cuja composição e modo de formação exibem muitas similaridades com o osso (HOLLINGER & WONG, 1996), é o tecido menos mineralizado e mais resiliente da estrutura dentária sendo componente chave para engenharia tecidual (LI *et al.*, 2011).

A dentina, tal como o osso, contém fatores de crescimento como proteínas ósseas morfogenéticas (BMP), insulínico (IGF), derivado de plaquetas (PGDF), de crescimento fibroblástico (FGF) e de transformação do crescimento beta (TGF β) (GAO *et al.*, 1998; SCHMIDT-SCHULTZ & SCHULTZ, 2005; SMITH *et*

al., 2012). Estes fatores de crescimento podem também estimular a produção de matriz ou regular a produção de proteínas ou moléculas que são importantes para o processo de remineralização da matriz específica (MAZZONI *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2012). A liberação dessas moléculas de dentina pode fornecer uma fonte de moléculas bioativas com potencial significativo para aplicação no reparo da estrutura dentinária danificada ou restaurada (SMITH *et al.*, 2012; FERRACANE *et al.*, 2013). As BMPs são moléculas que atuam sobre as células tronco levando à diferenciação de células secretoras de matriz óssea (KATZ *et al.*, 1993; HOTZ & HERR, 1994) e têm função de regular a diferenciação do tecido cartilaginoso e ósseo *in vivo*. Elas desempenham várias funções durante o desenvolvimento embrionário e na organogênese, incluindo a esqueletogênese e o desenvolvimento craniofacial dos tecidos ósseos e dentários. Durante a enxertia óssea onde ocorre a reabsorção óssea, os osteoclastos degradam a matriz óssea que propicia a liberação das BMPs. Estas proteínas induzem a quimiotaxia, a proliferação e a diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos, bem como aumentam a síntese de matriz óssea (BESSHO *et al.*, 1990; 1992).

Com base no potencial de osteoindução, osteocondução, e osteogênese, e na similiaridade histológica da dentina com osso (KIM *et al.*, 2013), muitos estudos vêm sendo realizados com a matriz dentinária desmineralizada (MDD) para avaliar a sua capacidade de atuar como um biomaterial. A MDD é um complexo de colágeno tipo 1 e fatores de crescimento sem os cristais minerais (LIU *et al.*, 2016). Nas últimas décadas estudos nessa área vêm sendo realizados, principalmente utilizando-a como arcabouço para ligação, crescimento e diferenciação celular, identificação de fontes de células-tronco e moléculas bioativas visando a regeneração de tecidos e órgãos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014). Como resultado, a evolução dos biomateriais tem estimulado o desenvolvimento de novos produtos além do aperfeiçoamento dos materiais já disponíveis no mercado (DEB & CHANA, 2015). Na engenharia tecidual, os biomateriais devem interagir positivamente com as células para permitir uma melhor adesão, crescimento, migração e diferenciação celular (MA, 2004).

Para utilização da matriz dentinária como um biomaterial, ela precisa ser submetida aos processos de desmineralização e liofilização. A liofilização a frio consiste na desidratação da matriz dentinária desmineralizada por mobilização das moléculas de água de solvatação que envolvem as macromoléculas proteicas. Esta dessecação ocorre por um mecanismo de queda brusca de pressão devido à formação de vácuo e diminuição acentuada da temperatura, controlada pelo aparelho liofilizador. A liofilização se apresenta como uma técnica importante para biomateriais de enxertos homogêneos para diminuição do risco de transmissão de infecções como o HIV e declínio de sua antigenicidade. (ZASACKI, 1991; MELLONIG *et al.*, 1992).

Diversos estudos demonstraram que a matriz óssea desmineralizada estimula condrogênese seguida de osteogênese quando em contato com células mesenquimais em implantes em músculo, medula óssea, tendões e ligamento periodontal (URIST, 1965; URIST & DOWELL, 1968; REDDI & HUGGINS, 1972; CHALMERS *et al.*, 1975). Com base nesses trabalhos, foram realizados outros estudos que implantaram a MDD de ratos, coelhos e humanos, nos olhos e na musculatura abdominal de ratos e coelhos, nos quais encontraram, histologicamente, a formação de tecido ósseo nesses tecidos (BANG & URIST, 1967b; YEOMANS & URIST, 1967; BANG, 1972; BANG *et al.*, 1972; INOUE *et al.*, 1986; TZIAFAS & KOLOKURIS, 1990) BANG & URIST (1967a) (1967). Os mesmos resultados também foram alcançados em estudos *in vitro* com MDD e células mesenquimais (SOMERMAN *et al.*, 1987). Bang (1972) comparou o grau de antigenicidade da MDD xenogênica com a homogênea. Neste estudo, notou-se o alto grau de antigenicidade do enxerto xenogênico sem a presença de osteoindução, enquanto a MDD homogênea provocava discreta reação imunológica. Além disso, evidenciou-se ainda, certo potencial osteoindutor. A aplicação clínica da dentina desmineralizada homogênea foi relatada posteriormente sem resultados superiores, evidenciados por meio de controle radiográfico (NORDENRAM *et al.*, 1975). Embora a MDD autógena tenha sido empregada experimentalmente em enxertos ósseos variados, pouco se sabe sobre o comportamento dessa substância de origem homogênea.

A MDD também vêm sendo testada para outras aplicações além da enxertia óssea. Tziafas & Kolokuris (1990) testaram a MDD autógena extraída de dentes decíduos de cães quando implantada em polpa de dentes caninos permanentes. Nos implantes pulpares foi observada a formação de dentina e organização odontoblástica. Oguntebi *et al.* (1993) compararam capeamentos pulpares realizados em suínos com MDD, um cimento cerâmico bioativo (Bioglass) e um cimento de hidróxido de cálcio (Life). Em todos os espécimes capeados com MDD foi encontrada uma grande formação de dentina reparadora. Nakashima (1994) comparou a utilização de MDD xenógena isolada e combinada com BMP-2 e BMP-4 humanas em pulpotomias. Após dois meses, esse autor observou que a formação de dentina foi menor em espessura quando utilizada a MDD isolada e concluiu que as BMPs possuem um importante papel na indução da diferenciação de odontoblastos. Zhang *et al.* (2012) compararam a MDD com diferentes materiais (osso cerâmico bovino - CBB, submucosa de intestino delgado, ploi-L-lactato-co-glicolato, e sulfato ácido hialurônico condroitin-colágeno) na regeneração dentinária através de células tronco pulpares. Esses autores concluíram que as células cultivadas com MDD e CBB apresentaram maiores níveis de atividade de fosfatase alcalina e expressão de mRNA de sialoproteína óssea, osteocalcina, sialofosfoproteína dentinária (DSPP) e proteína de matriz dentinária 1 (DMP-1). Com a *implantação in vivo* dos materiais, foi observada uma maior formação de dentina, pré-dentina e odontoblastos nos grupos da MDD e CBB. Kang *et al.* (2017) compararam a eficiência das células-tronco humanas da polpa na diferenciação osteogênica e na formação óssea *in vivo* quando combinadas com a MDD e os fosfatos de hidroxiapatita-tricálcica (HA-TCPs). Os autores encontraram um maior potencial de osteoindução da MDD quando comparada com os HA-TCPs devido aos componentes orgânicos da MDD. Entretanto, a formação óssea *in vivo* foi similar para os dois materiais. Quando esses dois biomateriais foram comparados em relação a expressão gênica osteogênica, o resultado foi similar. Por outro lado, a expressão gênica dentinogênica foi maior para a MDD. Diferentes tamanhos e densidades da MDD também já foram avaliados, Nam *et al.* (2016) avaliaram enxertos ósseos com 2 diferentes tamanhos da MDD, e em avaliação histológica,

concluíram que menores partículas, com menor espaço entre elas, foram mais efetivas na promoção da osteogênese.

Mehrvarzfar *et al.* (2017) compararam as respostas do agregado mineral trióxido (MTA) com o MTA combinado com MDD autóloga em pulpotomias. Nesse estudo clínico de boca dividida, um terceiro molar do paciente foi utilizado para obtenção da MDD e outros dois para capeamento pulpar com os dois materiais. Após seis semanas de acompanhamento clínico e radiográfico, os dentes foram extraídos e submetidos a uma avaliação histológica. Os autores não encontraram diferença estatisticamente significativa quanto à qualidade das pontes de dentina formadas. Por outro lado, houve um aumento significativo na espessura das pontes de dentina no grupo do MTA tratado com MDD.

Vários modelos experimentais *in vivo* têm sido empregados para a biocompatibilidade de biomateriais implantados em diferentes sítios em animais (BANG, 1972; BESSHO *et al.*, 1992; CARVALHO *et al.*, 2004; DEB & CHANA, 2015). Avaliar a biocompatibilidade de um novo biomaterial por meio de estudos *in vivo* é de suma importância para seu aperfeiçoamento e indicações clínicas. A resposta biológica do tecido conjuntivo subcutâneo frente a materiais de uso odontológico vem sendo avaliada de longa data. Em 1963, Guttuso realizou um estudo histopatológico para verificar a resposta inflamatória provocada por materiais endodônticos em tecido subcutâneo de ratos. O método de implantação de tubos de polietileno no referido tecido foi proposto por Torneck, em 1966 (TORNECK, 1966). Em 1981, Olsson, Sliwowski e Langeland, (OLSSON *et al.*, 1981) agruparam as duas metodologias citadas anteriormente para avaliar a resposta inflamatória de materiais endodônticos inseridos em tubos implantados no tecido subcutâneo. A técnica de avaliação biológica através da implantação de tubos de polietileno com materiais em tecido subcutâneo é a opção indicada pela Federação Dentária Internacional (Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics, 1980). Nos últimos anos diversos estudos foram realizados utilizando-se a mesma metodologia para avaliar a resposta biológica de materiais de uso endodôntico (MIDENA *et al.*, 2015; PETROVIC *et al.*, 2015;

SUZUKI *et al.*, 2015; CAVENAGO *et al.*, 2017; CINTRA *et al.*, 2017a; MOZAYENI *et al.*, 2017; OMIDI *et al.*, 2017).

A forma em pó da matriz dentinária desmineralizada liofilizada poderia ser empregada sobre o tecido pulpar, de forma análoga ao hidróxido de cálcio, com o objetivo de formar uma barreira mineralizada em casos de capeamento pulpar e pulpotomia. Atualmente, o MTA é o material de referência para o capeamento pulpar, pulpotomia, selamento de perfurações radiculares, reabsorções, apicificação e retrobturação. Este material apresenta-se como um pó fino de partículas hidrofílicas na coloração cinza ou branca, sendo composto por silicato tricálcio, aluminato tricálcio, óxido tricálcio, óxido de silicato e outros óxidos minerais (TORABINEJAD *et al.*, 1993; PARIROKH & TORABINEJAD, 2010). Esse cimento foi validado por diversos estudos que comprovaram sua biocompatibilidade. Dentre os estudos *in vivo*, a avaliação da resposta tecidual foi muito experimentada por meio de implantes de MTA em tecido subcutâneo (ZMENER *et al.*, 2012; MIDENA *et al.*, 2015; MINOTTI *et al.*, 2015). De modo geral, o MTA gera um infiltrado inflamatório crônico de leve a moderada intensidade que é gradualmente reduzido em função do tempo (HOLLAND *et al.*, 1999; CAMILLERI & PITT FORD, 2006; BOSIO *et al.*, 2014).

O Biodentine (Septodont, St-Maur-des-Fosses, França) é outro material também a base de silicato tricálcio que tem sido proposto como um substituto para dentina. Ele pode ser empregado em casos de perfurações radiculares, capeamentos pulpares, pulpotomia, em cirurgias pararendodônticas como selador apical e, até, como restaurador coronário em dentes posteriores (KOUBI *et al.*, 2013). Em um estudo *in vitro* para avaliação das propriedades biológicas do Biodentine, Zanini *et al.* (2012) testaram células indiferenciadas da polpa dental (OD-21) quando em contato com o cimento, e encontraram diferenciação dessas células em odontoblastos, concluindo que cimento é considerado bioativo, pois é capaz de induzir a biomineralização. Dentre os poucos estudos que avaliaram suas propriedades biológicas, Mori *et al.* (2014), implantaram o Biodentine em tecido subcutâneo e concluíram que este cimento pode ser considerado biocompatível.

Apesar do MTA e o Biodentine serem atualmente os materiais de escolha para capeamento pulpar direto, pulpotomia e selamento de perfurações, eles podem liberar uma pequena quantidade de arsênico e chumbo quando em contato com fluidos corporais (CAMILLERI *et al.*, 2012). Além disso, outro estudo mostrou que o radiopacificador utilizado no MTA pode causar pigmentação das coroas dentárias quando em contato com o hipoclorito de sódio (MARCIANO *et al.*, 2015).

Face ao exposto, justifica-se a realização de uma avaliação da resposta biológica por meio da implantação de tubos de polietileno em tecido subcutâneo de ratos, de modo a confrontar os resultados dos cimentos já conhecidos com a MDD liofilizada em pó. Até a presente data e nas bases de dados consultadas, não há nenhum relato na literatura sobre a reação do tecido conjuntivo subcutâneo frente à referida matriz em pó. Essas análises biológicas primárias serão o ponto inicial de estudos para investigar e validar o uso da MDD liofilizada em procedimentos clínicos em humanos.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta biológica da matriz dentinária desmineralizada liofilizada em pó.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a biocompatibilidade da matriz dentinária desmineralizada liofilizada em pó, do Biodentine e do MTA branco implantados em tecido subcutâneo de ratos.

3 ARTIGO

3.1 TÍTULO:

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA BIOLÓGICA DA MATRIZ DENTINÁRIA DESMINERALIZADA LIOFILIZADA EM PÓ IMPLANTADA EM TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Felipe Andretta Copelli, DDS¹

Antonio Adilson Soares de Lima, DDS, PhD²

Bruno Cavalini Cavenago, DDS, PhD³

¹Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Paraná - UFPR

²Departamento de Estomatologia da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

³Departamento de Odontologia Restauradora da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Autor para correspondência:

Felipe Andretta Copelli

Rua Joaquim Nabuco, 270. Cidade Jardim. São José dos Pinhais/PR.

CEP 83040-210

felipecopelli@yahoo.com.br

+5541999865597

3.2 RESUMO

Introdução A matriz dentinária desmineralizada liofilizada (MDDL) é um complexo de colágeno tipo 1 e fatores de crescimento sem os cristais minerais. Acredita-se que esta matriz, na forma de pó, possa ser uma substituta a materiais endodônticos contemporâneos. O objetivo deste estudo foi avaliar em tecido subcutâneo de ratos a biocompatibilidade da MDDL comparada com o MTA e Biodentine. **Metodologia:** Foram utilizados 40 ratos da linhagem *Wistar*, cada animal recebeu duas incisões no dorso para inserção de quatro tubos de polietileno, sendo 3 preenchidos com os materiais experimentais (MDDL, MTA e Biodentine) e 1 vazio (grupo controle) (n=10). Após 3, 7, 15 e 30 dias os animais foram sacrificados e as amostras de tecido adjacentes aos tubos foram processadas em lâminas histológicas e coradas com hematoxilina e eosina para avaliação qualitativa descritiva e quantitativa em microscópio óptico. Foram atribuídos escores para quantificar a intensidade da resposta inflamatória que foram estatisticamente comparados por meio do teste Anova ($p < 0,05$) **Resultados:** Na análise descritiva, todos os grupos apresentaram resposta inflamatória moderada nos dois primeiros períodos. Após 15 dias o grupo controle apresentou inflamação leve enquanto os grupos dos materiais ainda apresentaram inflamação moderada. Aos 30 dias, todos os grupos apresentaram resposta inflamatória leve e com sinais de reparo. A análise histomorfométrica mostrou semelhança entre os grupos nos períodos de 3 e 7 dias (escore 2). Aos 15 dias, o grupo controle se apresentou com escore 1, com diferença significativa em relação aos outros grupos (escore 2). No último período, todos os grupos apresentaram o mesmo resultado (escore 1). **Conclusão:** Dentro das limitações desse estudo, pode-se afirmar que a MDDL em pó é um material biocompatível.

Palavras-chaves: Matriz dentinária desmineralizada liofilizada. Biocompatibilidade. Inflamação. Teste de materiais. Endodontia.

3.4 INTRODUÇÃO

A matriz dentinária desmineralizada liofilizada (MDDL) é um complexo de colágeno tipo 1 e fatores de crescimento sem os cristais minerais (1). A dentina é uma fonte de moléculas bioativas com potencial significativo para aplicação no reparo da estrutura dentinária danificada ou restaurada (2, 3). De acordo com Albuquerque et al (4) Vários estudos foram realizados, principalmente utilizando-a como arcabouço para ligação, crescimento e diferenciação celular e identificação de fontes de células-tronco e moléculas bioativas visando a regeneração de tecidos e órgãos. Pesquisas usando diferentes técnicas de preparo desse material foram realizadas, sendo a sua maioria para avaliação desse material na enxertia óssea (5-12). O processo de desmineralização é necessário para liberar os vários fatores de crescimento e proteínas (13). Diversos estudos demonstraram que a matriz óssea desmineralizada estimula osteogênese (8, 10-12) e a dentinogênese (14-17).

Atualmente, o Agregado Trióxido Mineral (MTA) e o Biodentine são os materiais de escolha para capeamento pulpar, pulpotomia, selamento de perfurações radiculares, reabsorções, apicificação e retrobturação (18-20). O MTA apresenta biocompatibilidade (18), adequada capacidade seladora (19), baixa solubilidade (21), promove a liberação de íons cálcio e é altamente alcalino. (22) O Biodentine também é considerado um cimento biocompatível (23) e bioativo (24). Apesar das boas propriedades desses cimentos, eles podem liberar uma pequena quantidade de arsênico e chumbo quando em contato com fluidos corporais (25). Além disso, o óxido de bismuto, radiopacificador utilizado no MTA pode causar pigmentação das coroas dentárias quando em contato com o hipoclorito de sódio (26).

A MDDL pode ser produzida em diferentes tamanhos de partículas, tão diminutas que constituem o material na forma de pó. (27) A maior parte dos estudos empregaram esse material para enxertos ósseos, e por isso utilizam partículas maiores. Para aplicação em endodontia é indicado o material estar em forma de pó, pois áreas de perfuração, capeamentos pulpares e reabsorções, por exemplo, apresentam tamanho diminuto, impossibilitando o uso de partículas

maiores. Não foram encontrados até o momento, nas principais bases de dados pesquisadas, estudos que avaliaram a biocompatibilidade desse material na forma de pequenas partículas (pó).

O objetivo desse estudo foi avaliar a resposta biológica da MDDL em pó por meio da implantação de tubos de polietileno com esse material, MTA e Biodentine, em tecido subcutâneo de ratos.

3.5 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR - processo 23075167918/2016-35; Aprovação 1050). Foram utilizados 40 ratos da linhagem *Wistar (Rathus norvegicus)*, fêmeas, adultos, com peso entre 250 e 300 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas, com cinco animais cada. Estes receberam água e ração comercial balanceada *ad libitum*. Essas gaiolas foram mantidas, pré e pós-procedimentos cirúrgicos, em uma sala com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$). Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de Xilazina (0,04 mL/100 g Xilazin® - Syntec do Brasil Ltda, Santana de Parnaíba, Brasil) e cloridrato de Ketamina (0,08 mL/100 g Cetamin® - Syntec do Brasil Ltda, Santana de Parnaíba, Brasil) por meio de injeção intramuscular.

Foram selecionados 160 tubos de polietileno (Embramed Ind. Com. Ltda. São Paulo, Brasil) com 1,5 mm de diâmetro interno, 2 mm de diâmetro externo e 10 mm de comprimento, esterilizados por óxido de etileno, foram divididos em quatro grupos:

1. MTA (n=40): Preenchidos com MTA (Angelus, Londrina, Brasil)
2. MDDL (n=40): Preenchidos com a MDDL.
3. Biodentine (n=40): Preenchidos com Biodentine (Septodont, St-Maur-des-Fosses, França)
4. Controle negativo (n=40) Tubos vazios.

A MDDL utilizada nesse estudo foi obtida do banco de dentes da UFPR. Foram selecionados dentes terceiros molares hígidos, com indicação clínica para exodontia. O processo de obtenção da matriz foi iniciado com a remoção do ligamento periodontal e polpa dos dentes extraídos, seguido pela esterilização em autoclave. Em seguida foi realizada a pulverização em diferentes granulometrias e peneiração em telas graduadas, para esse estudo foram utilizadas partículas pequenas (75 μm) de modo a se obter uma matriz fina com apresentação em pó. A separação química entre esmalte, dentina e cimento foi realizada por fracionamento de líquidos de densidade adequada. A

dentina separada foi desmineralizada de acordo com o protocolo de LI et al. (2011), que consiste numa sequência de soluções de EDTA de 17%, 10% e 5%. Após secagem, a matriz foi levada a um liofilizador até a sua completa liofilização. Assim que obtida a MDDL, foi esterilizada por raios Gama e criopreservada a -80°C .

Os cimentos MTA e Biodentine foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante. A MDDL foi manipulada, sobre uma placa de vidro esterilizada, com água destilada esterilizada, agregada aos poucos, com auxílio de uma espátula metálica flexível nº 24 (SS White/Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) até obter-se uma consistência de pasta.

Após manipulação, os materiais foram inseridos nos tubos de polietileno com auxílio de uma espátula de inserção e condensadores endodônticos (Maillefer, Ballaigues, Suíça), de modo a preencher de forma homogênea suas extremidades.

Com os animais anestesiados, foi realizada a tricotomia do dorso dos animais e antissepsia desta região com solução de iodopovidona (Rioquímica Indústria Farmacêutica Ltda., São José do Rio Preto, Brasil). Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal com uma extensão de aproximadamente 15 mm na região mediana do dorso de cada animal com lâmina de bisturi nº15 (Embramac – Empresa Brasileira de Materiais Cirúrgicos Ltda., Itajaí, Brasil). Os tubos de polietileno foram posicionados dentro de um dispositivo Transofix (B.Braun, São Gonçalo, Brasil) utilizado como um trocarte, juntamente com um artroscópio TM Action para ATM (Traumec, Rio Claro, Brasil). Este instrumento foi introduzido com movimentos de cateterismo com leve pressão, divulsionando os tecidos até atingir uma profundidade de 18 mm, onde o tubo foi depositado.

Os implantes foram depositados perpendicularmente à linha de incisão, cada animal recebeu quatro implantes, dois na incisão superior (grupo 1 para esquerda, grupo 2 para direita) e dois na região inferior (grupo 3 para esquerda e grupo 4 para direita). As bordas das incisões foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos, Brasil). Em seguida, uma nova antissepsia desta região com solução de iodopovidona foi realizada. Os animais foram divididos em quatro períodos experimentais (3, 7, 15 e 30 dias), com 10 animais por período.

Decorridos os períodos experimentais, os animais foram sacrificados com uma overdose de solução anestésica. Após constatada a morte do animal, foi realizada a tricotomia da região dorsal e os tubos implantados foram localizados por palpação. A área do local do implante foi dissecada com lâmina de bisturi nº 15 juntamente com uma margem de tecido ao redor do tubo. Os tecidos foram fixados em solução de formalina a 10%. Os tubos foram removidos e os espécimes foram incluídos em parafina. Cortes longitudinais de 5 micrometros de espessura, foram realizados no sentido longitudinal do tubo. As lâminas foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE) e analisadas por microscopia de luz. Os cortes corados com HE foram usados para as análises histológica descritiva e histomorfométrica.

A descrição histológica foi realizada para identificar a resposta do tecido subcutâneo aos materiais testados. Foi utilizado um microscópio de luz (Olympus, Tóquio, Japão) com aumentos de 100 e 400x. A área avaliada foi a porção de tecido localizada na embocadura do tubo de polietileno, região dos tecidos que esteve em contato com os materiais testados. A análise foi realizada por meio de uma descrição dos fenômenos celulares vinculados à reação tecidual frente ao material testado. Foram considerados o infiltrado inflamatório (e os fenômenos correlatos) e o reparo.

A análise histomorfométrica foi realizada com o uso de um microscópio de luz com aumento de 400x. A porção do tecido que permaneceu em contato com o material na extremidade do tubo foi avaliada. Três campos adjacentes foram capturados e as imagens foram analisadas pelo uso do software ImageJ (ImageJ, Bethesda, EUA). Então, foram classificados em escores, de acordo com a metodologia de estudos similares (28-31), sendo: (0) - nenhuma ou poucas células; (1) - menos de 25 células; (2) - entre 25 e 125 células; e (3) - 125 ou mais células inflamatórias.

As prevalências dos escores foram convertidas em porcentagem, bem como estabelecidas suas medianas para cada grupo em cada período experimental. Os dados foram analisados estatisticamente pela conversão das variáveis em Ranks e teste Anova com análise de Bonferroni com nível de significância de 5% ($p < 0,05$)

3.6 RESULTADOS

3.6.1 Análise histológica descritiva

Como característica comum entre os grupos observou-se a formação de tecido conjuntivo ao redor da área de implantação do tubo. Nos grupos com materiais foi possível observar partículas dos materiais nos tecidos. Outra reação tecidual observada em todos os grupos, foi a evolução do reparo em função do tempo.

Período de 3 dias

Nesse período, todos os grupos apresentaram infiltrado inflamatório moderado, com predomínio de macrófagos. Além disso, alguns fibroblastos e vasos sanguíneos também foram observados. Observou-se presença de edema (Figura 1).

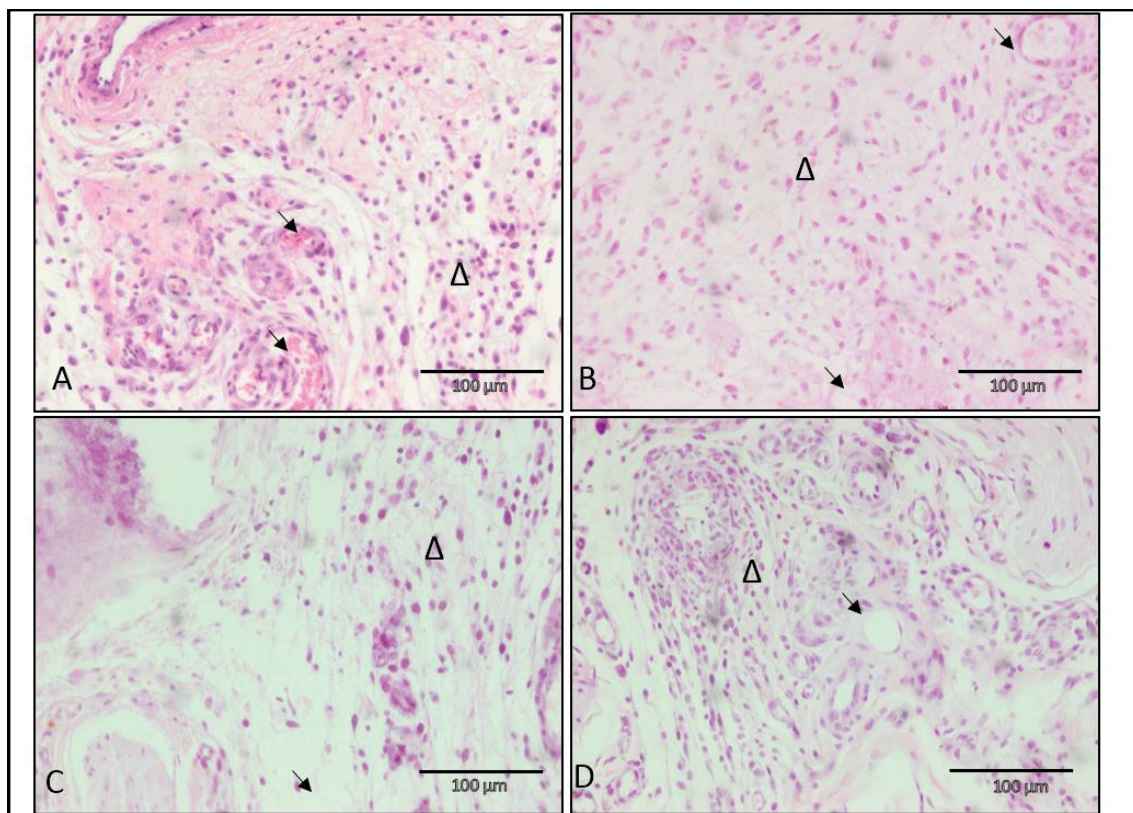


Figura 1- Período de 3 dias - (A) Controle (B) MDDL (C) MTA (D) Biodentine. Triângulos indicam infiltrado inflamatório. Flechas indicam vasos sanguíneos

Período de 7 dias

Todos os grupos ainda apresentaram infiltrado inflamatório moderado com predomínio de macrófagos. Foi observada presença de proliferação angioblástica. Nos grupos dos cimentos observou-se os macrófagos posicionados ao redor e em interação com o material extravasado, na realização de fagocitose (Figura 2).

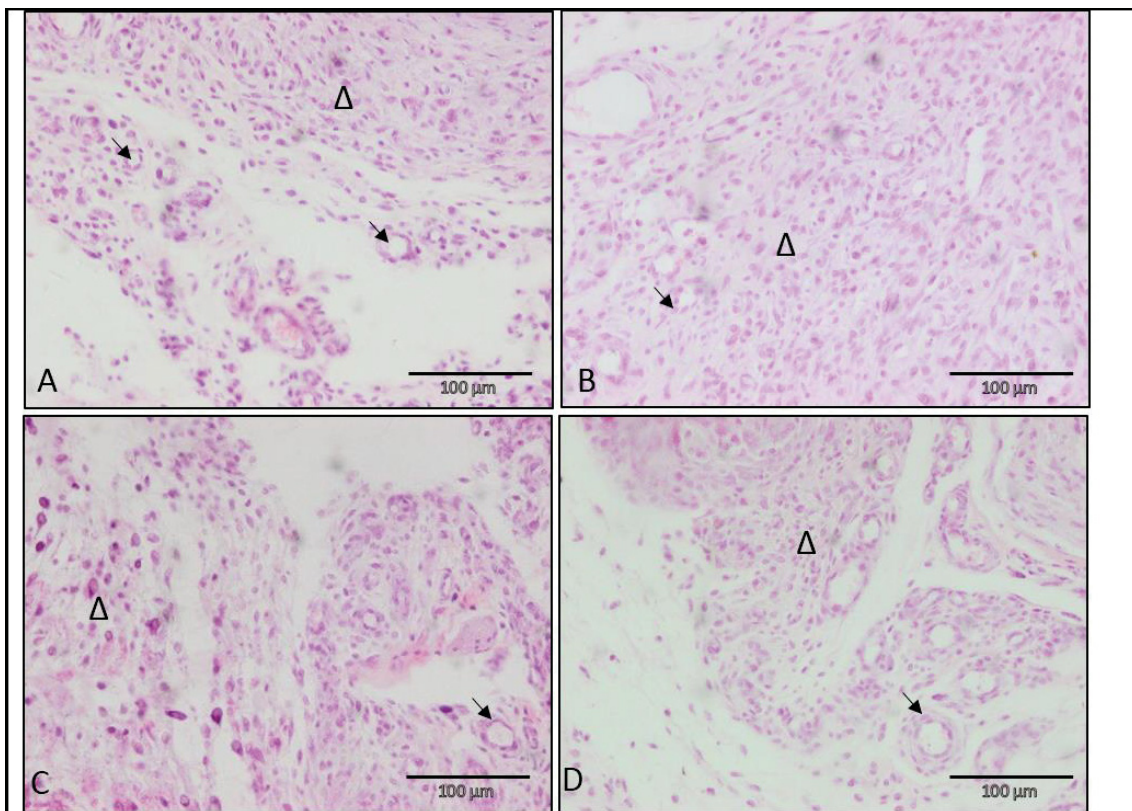


Figura 2 - Período de 7 dias -(A) Controle (B) MDDL (C) MTA (D) Biodentine. Triângulos indicam infiltrado inflamatório. Flechas indicam vasos sanguíneos.

Período de 15 dias

O grupo controle apresentou maior redução do infiltrado inflamatório, apresentando intensidade leve. Os demais grupos mantiveram um infiltrado inflamatório moderado com maior proliferação fibro-angioblástica (Figura 3).

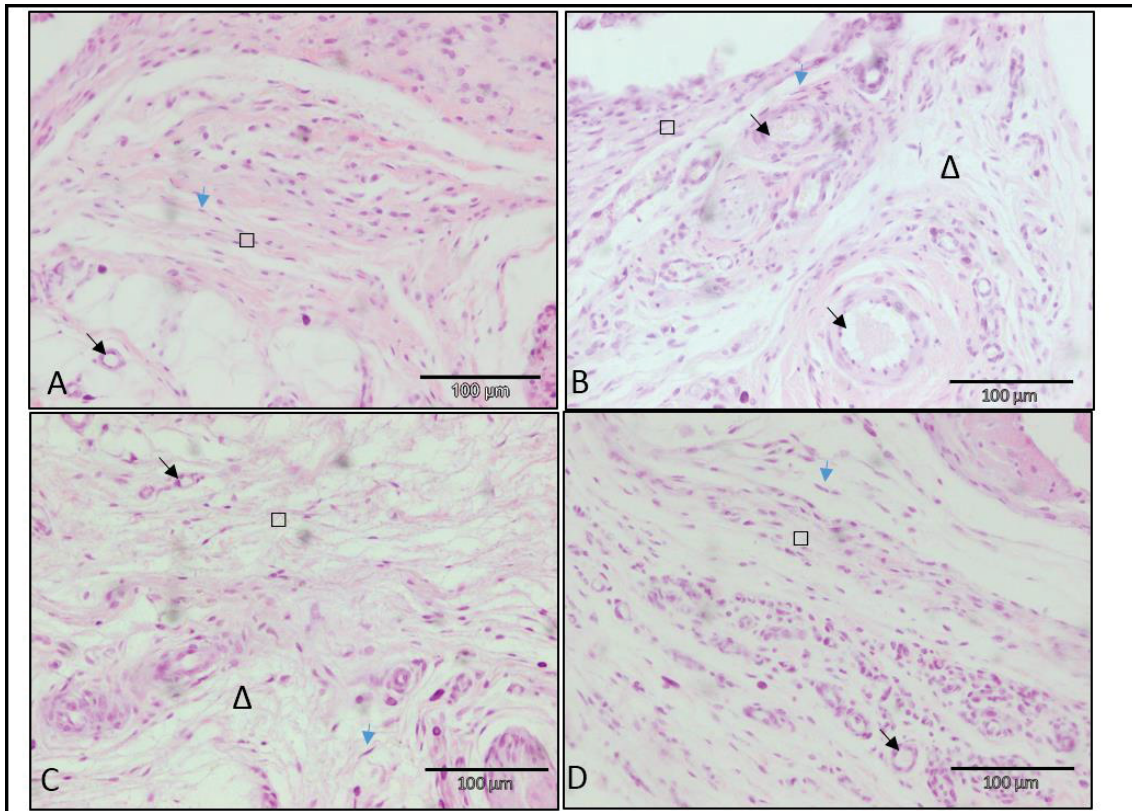


Figura 3 - Período de 15 dias - (A) Controle (B) MDDL (C) MTA (D) Biodentine. Triângulos indicam infiltrado inflamatório. Flechas pretas indicam vasos sanguíneos. Flechas azuis indicam fibroblastos. Quadrados indicam fibras colágenas.

Período de 30 dias

Todos os grupos apresentaram infiltrado inflamatório leve, cápsula delgada, grande quantidade de fibras colágenas e diminuição da população de células inflamatórias e de vasos sanguíneos neste período. Além disso, observou-se um predomínio de fibroblastos (Figura 4).

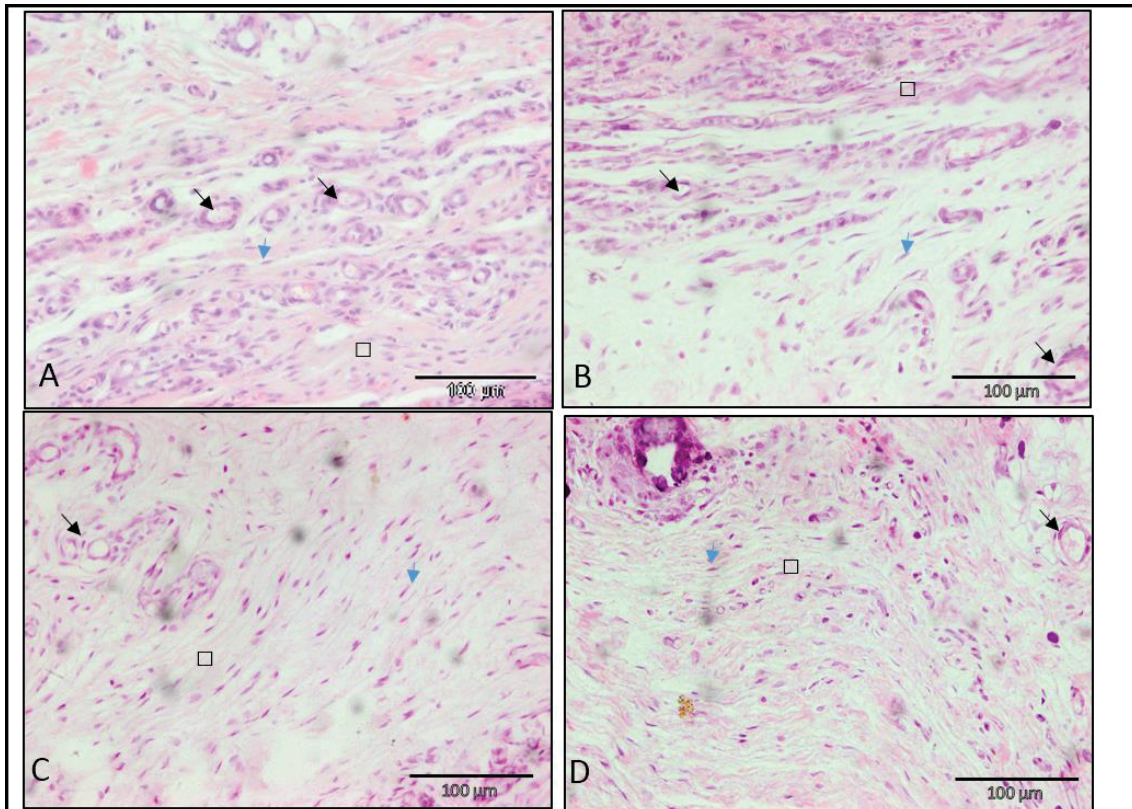


Figura 4- Período de 30 dias - (A) Controle (B) MDDL (C) MTA (D) Biodentine. Flechas pretas indicam vasos sanguíneos. Flechas azuis indicam fibroblastos. Quadrados indicam fibras colágenas.

3.6.2 Análise histológica morfométrica

A Tabela 1 apresenta as porcentagens dos escores que categorizam a resposta inflamatória dos diferentes grupos em todos os tempos experimentais. Nos períodos de 3 e 7 dias não foram observadas diferenças entre todos os grupos, os espécimes apresentaram contagem de células entre 25 e 125. (escore 2). No período de 15 dias, os grupos dos materiais apresentaram maior resposta inflamatória (escore 2), com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), com o grupo controle que apresentou maior reparo (escore 1). Em 30 dias, todos os grupos apresentaram sinais evidentes de reparação (escore 1).

Tabela 1 – Porcentagem dos escores que categorizam a resposta inflamatória dentre os grupos avaliados nos diferentes períodos experimentais.

	Período/Grupo	Escore				Mediana
		0	1	2	3	
3 dias	Controle	0	0	100	0	2
	MTA	0	0	100	0	2
	Biodentine	0	0	100	0	2
	MDDL	0	0	100	0	2
7 dias	Controle	0	0	100	0	2
	MTA	0	0	100	0	2
	Biodentine	0	0	100	0	2
	MDDL	0	0	100	0	2
15 dias*	Controle	0	100	0	0	1 ^a
	MTA	0	0	100	0	2 ^b
	Biodentine	0	6.66	93.34	0	2 ^b
	MDDL	0	13.33	86.67	0	2 ^b
30 dias	Controle	0	100	0	0	1
	MTA	0	100	0	0	1
	Biodentine	0	93.34	6.66	0	1
	MDDL	0	100	0	0	1

Escore – 0 (nenhuma reação inflamatória): nenhuma ou poucas; 1 (reação inflamatória leve): menos de 25 células; 2 (reação inflamatória moderada): entre 25 e 125 células; 3 (reação inflamatória severa): 125 ou mais células.

*No período de 15 dias, letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos (ANOVA, Bonferroni, $p < 0,05$)

3.7 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, a MDDL em pó apresentou-se biocompatível, com resposta biológica similar aos cimentos MTA e Biodentine.

Em geral, os biomateriais não devem induzir uma resposta negativa do tecido hospedeiro e, para tanto, devem se assemelhar quimicamente ao mesmo. Essa característica é definida como biocompatibilidade (32). Algumas características dos estudos em tecido subcutâneo fazem com que esse método seja referência pela FDI (33) e ISO (34). Uma das vantagens é que após a implantação de tubos de polietileno vazios em tecido subcutâneo do dorso de ratos ocorre reparo com formação de tecido fibroso e a inflamação não se apresenta persistente; outra vantagem da aplicação deste método é de permitir a implantação de materiais prontamente manipulados, diminuindo a difusão para os tecidos adjacentes dos componentes dos materiais, assim como a padronização do contato material/tecido por meio do diâmetro do tubo. O diâmetro externo adotado nesse estudo, permite segurança quanto ao extravasamento do material, ao mesmo tempo fornece uma área adequada e padronizada para análise histológica. Para resolução do problema de extravasamento de material poderia se implantar o material depois da sua presa, entretanto, desse modo, seria perdida a avaliação das reações que ocorrem antes da presa (35).

Para esse estudo realizou-se a liofilização da MDDL, que consiste numa técnica de preparo adequada a biomateriais de enxertos, uma vez que, têm-se observado a diminuição do risco de transmissão de infecções como o HIV, no caso de enxertos homogêneos, além do significativo declínio de sua antigenicidade, estimulando apenas discretamente a reação de resposta imune do paciente (36-38). O processo de liofilização a frio promove a desidratação da matriz dentinária desmineralizada por mobilização das moléculas de água de solvatação que envolvem as macromoléculas proteicas. A liofilização poderia provocar a hidrólise dessas macromoléculas mantendo, entretanto, intactos os polipeptídeos que constituem segmentos proteicos de natureza colágena ou não, biologicamente ativos no processo de regeneração tecidual. Tal fato poderia explicar a diminuição da antigenicidade da MDDL, sem perdas das

características osteopromotoras. Considerando que nesse estudo foi utilizado um enxerto xenógeno, a biocompatibilidade apresentada pode ser decorrente da liofilização.

O tamanho das partículas e a interconexão dos poros da MDD desempenham um importante papel na formação óssea. Nam *et al.* (27) avaliaram enxertos ósseos com 2 diferentes tamanhos da MDD, e em avaliação histológica, concluíram que menores partículas, com menor espaço entre elas, foram mais efetivas na promoção da osteogênese. Porém, para utilização em endodontia, o material deve estar na forma de pó, já que as dimensões das estruturas tratadas são bastante reduzidas, não sendo possível a aplicação de materiais em forma granular.

A escolha do MTA como material para comparação se deve ao fato de ser um material extensamente estudado e presente no mercado há vários anos (18, 26, 39-41). Esse material é o padrão-ouro para tratamentos de reabsorções, perfurações, pulpotomias e retro-obturações. Tal fato se deve às suas características físico-químicas e boas propriedades biológicas. Vários estudos já comprovaram que o MTA é biocompatível (42). Estudos clínicos também demonstraram a superioridade biológica desse material a outros cimentos utilizados para retro-obturações (43-45). Em 2008, Fernandez-Yanez Sanchez *et al.* (46) através de uma meta-análise comparando MTA e outros cimentos retro-obturadores encontraram os mesmos resultados. Os resultados desse estudo demonstraram que o MTA apresentou reação inflamatória moderada nos períodos iniciais de 3, 7 e 15 dias, havendo reparo com o tempo. Além disso, aos 30 dias, ele induziu uma resposta inflamatória leve e formação de um novo tecido, sendo este, organizado, com predomínio de fibras colágenas e fibroblastos, corroborando com os resultados de outros estudos (40, 47-49). Resultado diferente de Mori *et al.* (23) que encontrou resposta inflamatória leve também nos períodos iniciais, por outro lado Moretton *et al.* (48), verificaram presença de inflamação severa, com presença de necrose, aos 15 e 30 dias.

Apesar das satisfatórias propriedades do MTA, seu longo tempo de presa e dificuldade de manipulação estimulam a busca por um material substituto. A inclusão do Biodentine nesse estudo se deve ao fato desse cimento ser apresentado como uma opção ao MTA pois possui as mesmas indicações

clínicas. Em um estudo clínico, Nowicka *et al.* (50) compararam Biodentine e MTA quanto a resposta pulpar de dentes humanos após capeamento com os dois materiais. Os autores encontraram resultados semelhantes para os dois grupos e concluíram que o Biodentine teve eficácia similar ao MTA na realização de capeamentos pulpares diretos, além disso, se apresenta como uma opção de manejo e técnica mais simples que o MTA. Outros autores também encontraram bons resultados sobre células pulpares (24, 51-53) e estimulação da formação de dentina (51, 52). Em um estudo *in vitro* comparando a ocorrência de descoloração coronária, os autores encontraram diferença significativa para o Biodentine, que apresentou menor alteração de cor nos dentes quando comparado aos cimentos Bioaggregate e MTA. Nesse estudo observou-se uma resposta inflamatória moderada nos períodos iniciais e reparo nos períodos finais. Estes achados corroboram os resultados de estudos prévios (23, 54).

Usados como controle, os tubos vazios mostraram reação inflamatória nos períodos iniciais (3 e 7 dias) semelhante à dos outros grupos. Aos 15 dias, o grupo controle apresentou maior reparo, diferindo dos grupos dos cimentos que ainda apresentaram reação inflamatória moderada. Aos 30 dias, todos os grupos apresentaram reparo, com presença de poucas células inflamatórias. A presença de inflamação nos dois primeiros períodos sugere que essa resposta se deu pelo trauma cirúrgico, e, portanto, a reação inflamatória encontrada nos outros grupos após 7 dias se deu pelos materiais.

Tendo em vista a biocompatibilidade da MDDL encontrada nesse estudo, esse material pode ser uma alternativa interessante para tratamentos que são realizados na atualidade com o MTA. Para sua utilização em humanos se fazem necessários novos estudos que testem suas propriedades físico-químicas.

3.8 REFERÊNCIAS (normas da revista)

1. Liu G, Xu G, Gao Z, Liu Z, Xu J, Wang J, et al. Demineralized Dentin Matrix Induces Odontoblastic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *Cells, tissues, organs*. 2016;201(1):65-76.
2. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Archives of oral biology*. 2012;57(2):109-21.
3. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Dentin matrix component solubilization by solutions of pH relevant to self-etching dental adhesives. *The journal of adhesive dentistry*. 2013;15(5):407-12.
4. Albuquerque MT, Valera MC, Nakashima M, Nor JE, Bottino MC. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *Journal of dental research*. 2014;93(12):1222-31.
5. Bang G. Induction of heterotopic bone formation by demineralized dentin in guinea pigs: antigenicity of the dentin matrix. *Journal of oral pathology*. 1972;1(4):172-85.
6. Bang G, Nordenram A, Anneroth G. Allogenic demineralized dentin implants in jaw defects of Java monkeys. *International journal of oral surgery*. 1972;1(3):126-36.
7. Bang G, Urist MR. Recalcification of decalcified dentin in the living animal. *Journal of dental research*. 1967;46(4):722-30.
8. Chalmers J, Gray DH, Rush J. Observations on the induction of bone in soft tissues. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1975;57(1):36-45.
9. Inoue T, Deporter DA, Melcher AH. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. *Journal of dental research*. 1986;65(1):12-22.

10. Reddi AH, Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69(6):1601-5.
11. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-9.
12. Urist MR, Dowell TA. Inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix. *Clinical orthopaedics and related research*. 1968;61:61-78.
13. Kim YK, Lee J, Um IW, Kim KW, Murata M, Akazawa T, et al. Tooth-derived bone graft material. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2013;39(3):103-11.
14. Tziafas D, Kolokuris I. Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. *Journal of dental research*. 1990;69(1):75-81.
15. Oguntebi B, Clark A, Wilson J. Pulp capping with Bioglass and autologous demineralized dentin in miniature swine. *Journal of dental research*. 1993;72(2):484-9.
16. Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *Journal of dental research*. 1994;73(9):1515-22.
17. Zhang H, Liu S, Zhou Y, Tan J, Che H, Ning F, et al. Natural mineralized scaffolds promote the dentinogenic potential of dental pulp stem cells via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Tissue engineering Part A*. 2012;18(7-8):677-91.
18. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *Journal of endodontics*. 2010;36(3):400-13.

19. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *Journal of endodontics*. 1993;19(12):591-5.
20. 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. *Clinical oral investigations*. 2013;17(1):243-9.
21. Cavenago BC, Pereira TC, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Marciano MA, Bramante CM, et al. Influence of powder-to-water ratio on radiopacity, setting time, pH, calcium ion release and a micro-CT volumetric solubility of white mineral trioxide aggregate. *International endodontic journal*. 2014;47(2):120-6.
22. Duarte MA, Alves de Aguiar K, Zeferino MA, Vivan RR, Ordinola-Zapata R, Tanomaru-Filho M, et al. Evaluation of the propylene glycol association on some physical and chemical properties of mineral trioxide aggregate. *International endodontic journal*. 2012;45(6):565-70.
23. Mori GG, Teixeira LM, de Oliveira DL, Jacomini LM, da Silva SR. Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. *Journal of endodontics*. 2014;40(9):1485-8.
24. Zanini M, Sautier JM, Berdal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *Journal of endodontics*. 2012;38(9):1220-6.
25. Camilleri J, Kralj P, Veber M, Sinagra E. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. *International endodontic journal*. 2012;45(8):737-43.
26. Marciano MA, Duarte MA, Camilleri J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. *Clinical oral investigations*. 2015;19(9):2201-9.

27. Nam JW, Kim MY, Han SJ. Cranial bone regeneration according to different particle sizes and densities of demineralized dentin matrix in the rabbit model. *Maxillofacial plastic and reconstructive surgery*. 2016;38(1):27.
28. Bueno CRE, Vasques AMV, Cury MTS, Sivieri-Araujo G, Jacinto RC, Gomes-Filho JE, et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of mineral trioxide aggregate flow. *Clinical oral investigations*. 2018.
29. Cintra LTA, Benetti F, de Azevedo Queiroz IO, Ferreira LL, Massunari L, Bueno CRE, et al. Evaluation of the Cytotoxicity and Biocompatibility of New Resin Epoxy-based Endodontic Sealer Containing Calcium Hydroxide. *Journal of endodontics*. 2017;43(12):2088-92.
30. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Nery MJ, Filho JA, et al. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX(R). *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2012;28(6):452-6.
31. Valentim D, Bueno CRE, Marques VAS, Vasques AMV, Cury MTS, Cintra LTA, et al. Calcium hydroxide associated with a new vehicle: Psidium cattleianum leaf extracts. Tissue response evaluation. *Brazilian oral research*. 2017;31:e43.
32. Holzapfel BM, Reichert JC, Schantz JT, Gbureck U, Rackwitz L, Noth U, et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced drug delivery reviews*. 2013;65(4):581-603.
33. FDI. Recommended standart practices for biological evaluation of dental materials.: *International Endodontic Journal*; 1980. p. 2.
34. Biological evaluation of medical devices. Part 6:Tests for local effects after implantation *International Standard*, (2016).
35. Olsson B, Sliwkowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *Journal of endodontics*. 1981;7(8):355-67.

36. Zasacki W. The efficacy of application of lyophilized, radiation-sterilized bone graft in orthopedic surgery. *Clinical orthopaedics and related research*. 1991(272):82-7.
37. Mellonig JT, Prewett AB, Moyer MP. HIV inactivation in a bone allograft. *Journal of periodontology*. 1992;63(12):979-83.
38. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. 1965. *Clinical orthopaedics and related research*. 2002(395):4-10.
39. Mehrvarzfar P, Abbott PV, Mashhadiabbas F, Vatanpour M, Tour Savadkouhi S. Clinical and histological responses of human dental pulp to MTA and combined MTA/treated dentin matrix in partial pulpotomy. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc*. 2017.
40. Cavenago BC, Del Carpio-Perochena AE, Ordinola-Zapata R, Estrela C, Garlet GP, Tanomaru-Filho M, et al. Effect of Using Different Vehicles on the Physicochemical, Antimicrobial, and Biological Properties of White Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of endodontics*. 2017;43(5):779-86.
41. Camilleri J, Pitt Ford TR. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *International endodontic journal*. 2006;39(10):747-54.
42. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *Journal of endodontics*. 2010;36(2):190-202.
43. Saunders WP. A prospective clinical study of periradicular surgery using mineral trioxide aggregate as a root-end filling. *Journal of endodontics*. 2008;34(6):660-5.
44. von Arx T, Hanni S, Jensen SS. Clinical results with two different methods of root-end preparation and filling in apical surgery: mineral trioxide aggregate and adhesive resin composite. *Journal of endodontics*. 2010;36(7):1122-9.

45. Tsesis I, Rosen E, Taschieri S, Telishevsky Strauss Y, Ceresoli V, Del Fabbro M. Outcomes of surgical endodontic treatment performed by a modern technique: an updated meta-analysis of the literature. *Journal of endodontics*. 2013;39(3):332-9.
46. Fernandez-Yanez Sanchez A, Leco-Berrocal MI, Martinez-Gonzalez JM. Metaanalysis of filler materials in periapical surgery. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2008;13(3):E180-5.
47. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *Journal of endodontics*. 2004;30(2):95-9.
48. Moretton TR, Brown CE, Jr., Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *Journal of biomedical materials research*. 2000;52(3):528-33.
49. Hwang YC, Lee SH, Hwang IN, Kang IC, Kim MS, Kim SH, et al. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2009;107(3):e96-102.
50. 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. *Journal of endodontics*. 2013;39(6):743-7.
51. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *International endodontic journal*. 2012;45(5):439-48.
52. 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. *Journal of dental research*. 2012;91(12):1166-71.

53. Peng W, Liu W, Zhai W, Jiang L, Li L, Chang J, et al. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *Journal of endodontics*. 2011;37(9):1240-6.
54. da Fonseca TS, da Silva GF, Tanomaru-Filho M, Sasso-Cerri E, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. *International endodontic journal*. 2016;49(2):145-53.

4 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, é possível afirmar que a MDDL é um material biocompatível apresentando comportamento semelhante aos cimentos MTA e Biodentine.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. T. et al. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. **J Dent Res**, v. 93, n. 12, p. 1222-31, Dec 2014.

ATANCE, J. A. R. **Bioquímica Bucodental**. Síntesis, 1996. 336

BANG, G. Induction of heterotopic bone formation by demineralized dentin in guinea pigs: antigenicity of the dentin matrix. **J Oral Pathol**, v. 1, n. 4, p. 172-85, 1972.

BANG, G.; NORDENRAM, A.; ANNEROTH, G. Allogenic demineralized dentin implants in jaw defects of Java monkeys. **Int J Oral Surg**, v. 1, n. 3, p. 126-36, 1972.

BANG, G.; URIST, M. R. Bone induction in excavation chambers in matrix of decalcified dentin. **Arch Surg**, v. 94, n. 6, p. 781-9, Jun 1967a.

BANG, G.; URIST, M. R. Recalcification of decalcified dentin in the living animal. **J Dent Res**, v. 46, n. 4, p. 722-30, Jul-Aug 1967b.

BERTASSONI, L. E. Dentin on the nanoscale: Hierarchical organization, mechanical behavior and bioinspired engineering. **Dent Mater**, v. 33, n. 6, p. 637-649, Jun 2017.

BERTASSONI, L. E. et al. The dentin organic matrix - limitations of restorative dentistry hidden on the nanometer scale. **Acta Biomater**, v. 8, n. 7, p. 2419-33, Jul 2012.

BESSHO, K.; TAGAWA, T.; MURATA, M. Purification of rabbit bone morphogenetic protein derived from bone, dentin, and wound tissue after tooth extraction. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 48, n. 2, p. 162-9, Feb 1990.

BESSHO, K.; TAGAWA, T.; MURATA, M. Comparison of bone matrix-derived bone morphogenetic proteins from various animals. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 50, n. 5, p. 496-501, May 1992.

BOSIO, C. C. et al. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. **Int Endod J**, v. 47, n. 7, p. 667-74, Jul 2014.

BUENO, C. R. E. et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of mineral trioxide aggregate flow. **Clin Oral Investig**, Mar 23 2018.

CAMILLERI, J. et al. Characterization and analyses of acid-extractable and leached trace elements in dental cements. **Int Endod J**, v. 45, n. 8, p. 737-43, Aug 2012.

CAMILLERI, J.; PITT FORD, T. R. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. **Int Endod J**, v. 39, n. 10, p. 747-54, Oct 2006.

CARVALHO, V. A. et al. Histomorphometric analysis of homogenous demineralized dentin matrix as osteopromotive material in rabbit mandibles. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 19, n. 5, p. 679-86, Sep-Oct 2004.

CAVENAGO, B. C. et al. Effect of Using Different Vehicles on the Physicochemical, Antimicrobial, and Biological Properties of White Mineral Trioxide Aggregate. **J Endod**, v. 43, n. 5, p. 779-786, May 2017.

CHALMERS, J.; GRAY, D. H.; RUSH, J. Observations on the induction of bone in soft tissues. **J Bone Joint Surg Br**, v. 57, n. 1, p. 36-45, Feb 1975.

CHAUSSAIN, C. et al. Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: inhibition and clinical perspectives toward regeneration. **Front Physiol**, v. 4, p. 308, Nov 01 2013.

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

CINTRA, L. T. A. et al. Evaluation of the Cytotoxicity and Biocompatibility of New Resin Epoxy-based Endodontic Sealer Containing Calcium Hydroxide. **J Endod**, v. 43, n. 12, p. 2088-2092, Dec 2017b.

DEB, S.; CHANA, S. Biomaterials in Relation to Dentistry. **Front Oral Biol**, v. 17, p. 1-12, 2015.

EMBERY, G. et al. Proteoglycans in dentinogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 12, n. 4, p. 331-49, 20011017 DCOM- 20011205 2001.

FERRACANE, J. L.; COOPER, P. R.; SMITH, A. J. Dentin matrix component solubilization by solutions of pH relevant to self-etching dental adhesives. **J Adhes Dent**, v. 15, n. 5, p. 407-12, Oct 2013.

GAO, J.; SYMONS, A. L.; BARTOLD, P. M. Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in the developing periodontium of rats. **J Dent Res**, v. 77, n. 9, p. 1708-16, Sep 1998.

GOMES-FILHO, J. E. et al. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX(R). **Dent Traumatol**, v. 28, n. 6, p. 452-6, Dec 2012.

GUTTUSO, J. Histopathologic study of rat connective tissue responses to endodontic materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 16, p. 713-27, Jun 1963.

HOLLAND, R. et al. Reaction of dogs' teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. **J Endod**, v. 25, n. 11, p. 728-30, Nov 1999.

HOLLINGER, J.; WONG, M. E. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 82, n. 6, p. 594-606, Dec 1996.

HOTZ, G.; HERR, G. Bone substitute with osteoinductive biomaterials--current and future clinical applications. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 23, n. 6 Pt 2, p. 413-7, Dec 1994.

INOUE, T.; DEPORTER, D. A.; MELCHER, A. H. Induction of chondrogenesis in muscle, skin, bone marrow, and periodontal ligament by demineralized dentin and bone matrix in vivo and in vitro. **J Dent Res**, v. 65, n. 1, p. 12-22, Jan 1986.

KANG, K. J. et al. In Vitro and In Vivo Dentinogenic Efficacy of Human Dental Pulp-Derived Cells Induced by Demineralized Dentin Matrix and HA-TCP. **Stem Cells Int**, v. 2017, p. 2416254, 2017.

KATZ, R. W.; HOLLINGER, J. O.; REDDI, A. H. The functional equivalence of demineralized bone and tooth matrices in ectopic bone induction. **J Biomed Mater Res**, v. 27, n. 2, p. 239-45, Feb 1993.

KIM, Y. K. et al. Tooth-derived bone graft material. **J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg**, v. 39, n. 3, p. 103-11, Jun 2013.

KOUBI, G. 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**, v. 17, n. 1, p. 243-9, Jan 2013.

LI, R. et al. Human treated dentin matrix as a natural scaffold for complete human dentin tissue regeneration. **Biomaterials**, v. 32, n. 20, p. 4525-38, Jul 2011.

LIU, G. et al. Demineralized Dentin Matrix Induces Odontoblastic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. **Cells Tissues Organs**, v. 201, n. 1, p. 65-76, 2016.

MA, P. X. Scaffolds for tissue fabrication. **Materials Today**, v. 7, n. 5, p. 30-40, 2004.

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

MAZZONI, A. et al. A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part II: enzymes, serum proteins, and growth factors. **Endodontic Topics**, v. 21, n. 1, p. 19-40, 2009.

MEHRVARZ FAR, P. et al. Clinical and histological responses of human dental pulp to MTA and combined MTA/treated dentin matrix in partial pulpotomy. **Aust Endod J**, Aug 18 2017.

MELLONIG, J. T.; PREWETT, A. B.; MOYER, M. P. HIV inactivation in a bone allograft. **J Periodontol**, v. 63, n. 12, p. 979-83, Dec 1992.

MIDENA, R. Z. et al. Analysis of the reaction of subcutaneous tissues in rats and the antimicrobial activity of calcium hydroxide paste used in association with different substances. **J Appl Oral Sci**, v. 23, n. 5, p. 508-14, Oct 2015.

MINOTTI, P. G. et al. Rat subcutaneous tissue response to calcium silicate containing different arsenic concentrations. **J Appl Oral Sci**, v. 23, n. 1, p. 42-8, Jan-Feb 2015.

MORI, G. G. et al. Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. **J Endod**, v. 40, n. 9, p. 1485-8, Sep 2014.

MOZAYENI, M. A. et al. Subcutaneous Reaction of Rat Tissues to Nanosilver Coated Gutta-Percha. **Iran Endod J**, v. 12, n. 2, p. 157-161, Spring 2017.

NAKASHIMA, M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. **J Dent Res**, v. 73, n. 9, p. 1515-22, Sep 1994.

NAM, J. W.; KIM, M. Y.; HAN, S. J. Cranial bone regeneration according to different particle sizes and densities of demineralized dentin matrix in the rabbit model. **Maxillofac Plast Reconstr Surg**, v. 38, n. 1, p. 27, Dec 2016.

NORDENRAM, A.; BANG, G.; BERNHOFT, C. H. A clinical-radiographic study of allogenic demineralized dentin implants in cystic jaw cavities. **Int J Oral Surg**, v. 4, n. 2, p. 61-4, Apr 1975.

OGUNTEBI, B.; CLARK, A.; WILSON, J. Pulp capping with Bioglass and autologous demineralized dentin in miniature swine. **J Dent Res**, v. 72, n. 2, p. 484-9, Feb 1993.

OLSSON, B.; SLIWKOWSKI, A.; LANGELAND, K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. **J Endod**, v. 7, n. 8, p. 355-67, Aug 1981.

OMIDI, S. et al. Subcutaneous Connective Tissue Reaction to a New Nano Zinc-Oxide Eugenol Sealer in Rat Model. **Iran Endod J**, v. 12, n. 1, p. 64-69, Winter 2017.

OPSAHL VITAL, S. et al. Tooth dentin defects reflect genetic disorders affecting bone mineralization. **Bone**, v. 50, n. 4, p. 989-97, Apr 2012.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. **J Endod**, v. 36, n. 3, p. 400-13, Mar 2010.

PETROVIC, V. et al. Biocompatibility of new nanostructural materials based on active silicate systems and hydroxyapatite: in vitro and in vivo study. **Int Endod J**, v. 48, n. 10, p. 966-75, Oct 2015.

QIN, X. et al. Demineralized Dentin as a Semi-Rigid Barrier for Guiding Periodontal Tissue Regeneration. **J Periodontol**, v. 86, n. 12, p. 1370-9, Dec 2015.

Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. **Int Dent J**, v. 30, n. 2, p. 140-88, Jun 1980.

REDDI, A. H.; HUGGINS, C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 69, n. 6, p. 1601-5, Jun 1972.

SCHMIDT-SCHULTZ, T. H.; SCHULTZ, M. Intact growth factors are conserved in the extracellular matrix of ancient human bone and teeth: a storehouse for the study of human evolution in health and disease. **Biol Chem**, v. 386, n. 8, p. 767-76, Aug 2005.

SMITH, A. J. et al. Dentine as a bioactive extracellular matrix. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 2, p. 109-21, Feb 2012.

SOMERMAN, M. J. et al. Human dentin matrix induces cartilage formation in vitro by mesenchymal cells derived from embryonic muscle. **J Dent Res**, v. 66, n. 10, p. 1551-8, Oct 1987.

SUZUKI, Y. et al. Development of a novel fluorapatite-forming calcium phosphate cement with calcium silicate: in vitro and in vivo characteristics. **Dent Mater J**, v. 34, n. 2, p. 263-9, 2015.

TORABINEJAD, M.; WATSON, T. F.; PITT FORD, T. R. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. **J Endod**, v. 19, n. 12, p. 591-5, Dec 1993.

TORNECK, C. D. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. I. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 21, n. 3, p. 379-87, Mar 1966.

TZIAFAS, D.; KOLOKURIS, I. Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. **J Dent Res**, v. 69, n. 1, p. 75-81, Jan 1990.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893-9, Nov 12 1965.

URIST, M. R.; DOWELL, T. A. Inductive substratum for osteogenesis in pellets of particulate bone matrix. **Clin Orthop Relat Res**, v. 61, p. 61-78, Nov-Dec 1968.

VALENTIM, D. et al. Calcium hydroxide associated with a new vehicle: Psidium cattleianum leaf extracts. Tissue response evaluation. **Braz Oral Res**, v. 31, p. e43, Jul 3 2017.

YEOMANS, J. D.; URIST, M. R. Bone induction by decalcified dentine implanted into oral, osseous and muscle tissues. **Arch Oral Biol**, v. 12, n. 8, p. 999-1008, Aug 1967.

ZANINI, M. et al. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. **J Endod**, v. 38, n. 9, p. 1220-6, Sep 2012.

ZASACKI, W. The efficacy of application of lyophilized, radiation-sterilized bone graft in orthopedic surgery. **Clin Orthop Relat Res**, n. 272, p. 82-7, Nov 1991.

ZHANG, H. et al. Natural mineralized scaffolds promote the dentinogenic potential of dental pulp stem cells via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. **Tissue Eng Part A**, v. 18, n. 7-8, p. 677-91, Apr 2012.

ZMENER, O. et al. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. **J Endod**, v. 38, n. 9, p. 1233-8, Sep 2012.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL PARANÁ (CEUA)



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1050

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.167918/2016-35


APROVADO/APPROVAL: 14/02/2017 – R.O. 01/2017

TÍTULO: Avaliação da resposta biológica da matriz dentinária desmineralizada liofilizada implantada em tecido subcutâneo de ratos

TITLE: Biological response of lyophilized demineralized dentin matrix in subcutaneous tissue of rats

AUTORES/AUTHORS: Antonio Adilson Soares de Lima, Bruno Cavalini Cavenago, Felipe Andretta Copelli

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Estomatologia


Prof.ª Dra. Ana Vitória Fischer da Silva
Coordenadora da CEUA

ANEXO 2 - MATERIAIS E MÉTODOS DETALHADOS

1. Aprovação do comitê de ética

O presente estudo (processo 23075167918/2016-35) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO-UFPR) sob número 1050.

2. Animais de experimentação

Foram utilizados 40 ratos da linhagem *Wistar* (*Rathus norvegicus*), fêmeas, adultos, com peso entre 250 e 300 gramas, oriundos do Biotério da Universidade Federal do Paraná – UFPR. Somente animais que apresentaram funções vitais normais foram utilizados. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas, com cinco animais cada. Estes receberam água e ração comercial balanceada *ad libitum*. Essas gaiolas foram mantidas, pré e pós-procedimentos cirúrgicos, em uma sala do Biotério com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ \text{C}$).

3. Anestesia

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de Xilazina (0,04 mL/100 g Xilazin® - Syntec do Brasil Ltda, Brasil) e cloridrato de Ketamina (0,08 mL/100 g Cetamin® - Syntec do Brasil Ltda, Brasil) por meio de injeção intramuscular.

4. Delineamento do Experimento

A resposta biológica da matriz dentinária desmineralizada liofilizada (em pó), do MTA branco (Angelus, Londrina, Paraná, Brasil) e do Biodentine (Septodont, Saint-Maur-des-fossés Cedex, França) foi avaliada por meio da implantação de tubos de polietileno no tecido subcutâneo de animais de experimentação.

5. Obtenção da Matriz Dentinária Liofilizada (MDDL)

A MDDL utilizada nesse estudo foi obtida do banco de dentes da UFPR. Foram selecionados dentes terceiros molares hígidos. O processo de obtenção da matriz foi iniciado com a remoção do ligamento periodontal e polpa, seguido pela esterilização em autoclave. Em seguida foi realizada a pulverização em diferentes granulometrias e peneiração em telas graduadas. Para esse estudo foi utilizada a MDDL fina (75 μm).

A separação química entre esmalte, dentina e cimento foi realizada por fracionamento de líquidos de densidade adequada. A dentina separada foi desmineralizada de acordo com o protocolo de LI *et al.* (2011), que consiste numa sequência de soluções de EDTA em diferentes concentrações. Após secagem, a matriz foi levada a um liofilizador até a sua completa liofilização.

Assim que obtida a MDDL, ela foi esterilizada por raios Gama, e quando foi validado o processo, foi criopreservada a -80°C .

6. Preparo dos materiais

A MDDL foi manipulada, sobre uma placa de vidro esterilizada, com água destilada esterilizada, agregada aos poucos, com auxílio de uma espátula metálica flexível nº 24 (SS White/Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) até obter-se uma consistência de pasta.

O Biodentine foi manipulado de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando-se um amalgamador (Dabi Atlante, Ribeirão preto, SP, Brasil) para a mistura do cimento. Foram adicionadas 5 gotas do líquido ao pó e cápsula acondicionadora do material foi levada a agitação por 30 segundos.

O MTA branco foi manipulado com água destilada esterilizada empregando a proporção de 3 partes de pó para uma de líquido (Cavenago *et al.*, 2014). Para fracionar a quantidade de pó, este foi pesado em uma balança analítica eletrônica (Ohaus Adventurer, Parsippany, Estados Unidos) e o líquido proporcionado com auxílio de uma micropipeta monocanal de volume variável (Digipet, Curitiba, PR, Brasil).

7. Preparo dos implantes

Foram utilizados 160 tubos de polietileno (Embramed Ind. Com. Ltda. – São Paulo – SP – Brasil) com 1,5 mm de diâmetro interno, 2 mm de diâmetro externo e 10 mm de comprimento. Estes tubos foram previamente esterilizados com óxido de etileno (Unidade de Processamento de Materiais Esterilizados, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná).

Após manipulação, os materiais, foram inseridos nos tubos de polietileno com auxílio de uma espátula de inserção e condensadores endodônticos (Maillefer, Ballaigues, Suíça), de modo a preencher toda a extensão do tubo com o total selamento de suas extremidades. Tubos de polietileno vazios foram utilizados como controle.

8. Procedimentos cirúrgicos

Com os animais anestesiados, foi realizada a tricotomia do dorso dos animais e antissepsia desta região com solução de iodopovidona (Rioquímica Indústria Farmacêutica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil).

Em seguida, foi realizada uma incisão longitudinal com uma extensão de aproximadamente 15 mm na região mediana do dorso de cada animal com lâmina de bisturi nº15 (Embramac – Empresa Brasileira de Materiais Cirúrgicos Ltda., Itajaí, SC, Brasil). Os tubos de polietileno foram posicionados dentro de um dispositivo Transofix (B.Braun, São Gonçalo, Brasil) utilizado como um trocarte, juntamente com um artroscópio TM Action para ATM (Traumec, Rio Claro, Brasil). Este instrumento foi introduzido com movimentos de cateterismo com leve pressão, divulsionando os tecidos até atingir uma profundidade de 18 mm, onde o tubo foi depositado.

Os implantes foram depositados perpendicularmente à linha de incisão, cada animal recebeu quatro implantes, dois para o lado direito e outros dois para o lado esquerdo do dorso do animal, conforme descrito anteriormente. As bordas das incisões foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida,

uma nova antissepsia desta região com solução de iodopovidona foi realizada. Para a identificação dos animais foram realizadas marcações, de diferentes cores, com caneta permanente na base da cauda dos animais. Os animais foram divididos em quatro períodos experimentais (3,7, 15 e 30 dias), com 10 animais por período.

9. Obtenção das amostras e procedimentos histotécnico

Decorridos os períodos experimentais, os animais foram sacrificados com uma overdose de solução anestésica. Para esse método, os animais foram novamente anestesiados e então, foi realizada uma injeção intracardíaca de solução anestésica.

Após constatada a morte do animal, foi realizada a tricotomia da região dorsal e os tubos implantados foram localizados por palpação. A área do local do implante foi dissecada com lâmina de bisturi nº 15 juntamente com uma margem de tecido ao redor do tubo. A peça cirúrgica contendo o tecido cutâneo, corpo de prova e tecido subcutâneo foi distendida em papel cartão e fixada em solução de formol tamponado a 10% (Farmanilquima, Curitiba, Brasil). Cada espécime foi acondicionado em frasco unitário com identificação do animal, grupo e período experimental correspondente.

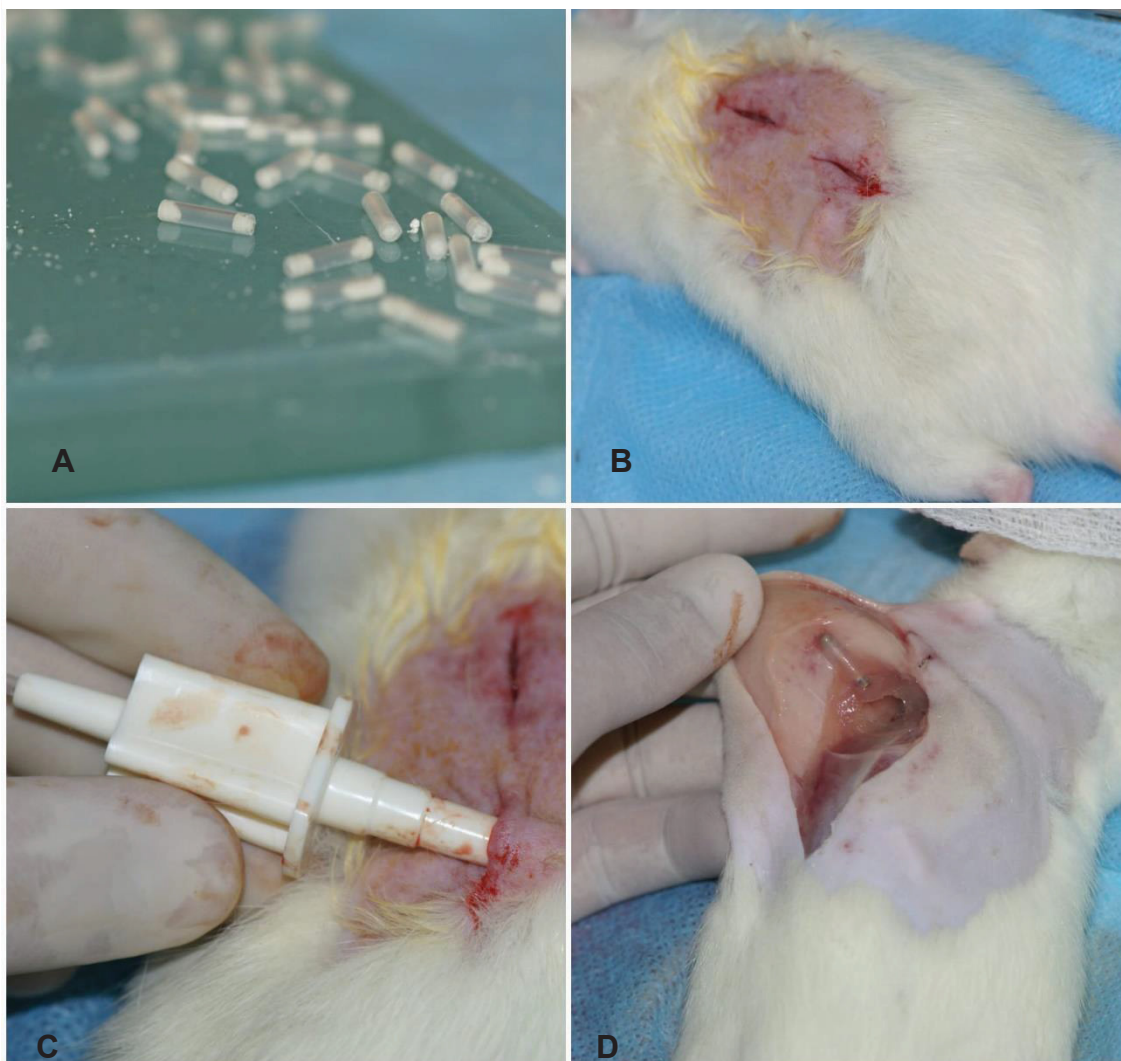
Após sete dias de fixação, as peças foram recortadas com navalha para a remoção do excesso de tecido. Os tubos de polietileno foram cuidadosamente removidos realizando-se uma incisão firme e única com lâmina de bisturi nº 15 em uma das laterais do tubo. O tecido ao redor do tubo com especial atenção às extremidades foi desprendido com o auxílio de uma pinça clínica. Para a desidratação, as peças foram armazenadas em álcool 70% por um período de 2 dias. Em seguida, foram submetidas a 3 banhos com álcool absoluto. Para a diafanização dos tecidos, as peças foram armazenadas em xilol (Farmanilquima, Curitiba, Brasil). Na sequência, as amostras foram banhadas e incluídas em Histosec (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) que é composto por parafina e resina plástica.

As peças incluídas foram cortadas em micrótomo rotativo automático Leica RM2265 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), obtendo cortes

semi-seriados com 5 micrometros de espessura, estendidos em banho Maria (40 a 50° C) e fixados em lâminas de vidro. De cada peça foram obtidas seis lâminas, com quatro cortes cada uma. Os cortes foram realizados no sentido longitudinal do tubo, para se obter as duas extremidades do mesmo. As lâminas foram coradas pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE).

Para analisar a reação provocada no tecido subcutâneo foram realizadas avaliações das lâminas por meio de um microscópio de luz Olympus BX41 (Olympus, Tóquio, Japão). Esta análise foi realizada nas extremidades do tubo implantado, na interface de contato do material com os tecidos. Os cortes corados com HE foram usados para as análises histológica descritiva e histomorfométrica.

Figura 5 - Procedimentos cirúrgicos. - (A) Tubos de polietileno com materiais. (B) Incisões longitudinais no dorso dos ratos. (C) Implantação de tubo de polietileno com uso de trocarte. (D) Dissecação, localização dos tubos e remoção do tecido para análise.



10. Análises histológicas

A descrição histológica foi realizada para identificar a resposta do tecido subcutâneo aos materiais testados. Foi utilizado um microscópio de luz com aumentos de 100 e 400x. A área avaliada foi a porção de tecido localizada na embocadura do tubo de polietileno, região dos tecidos que esteve em contato com os materiais testados. A análise foi realizada por meio de uma descrição dos fenômenos celulares vinculados à reação tecidual frente ao material testado. Foram considerados o infiltrado inflamatório (e os fenômenos correlatos) e o reparo.

11. Análise histomorfométrica

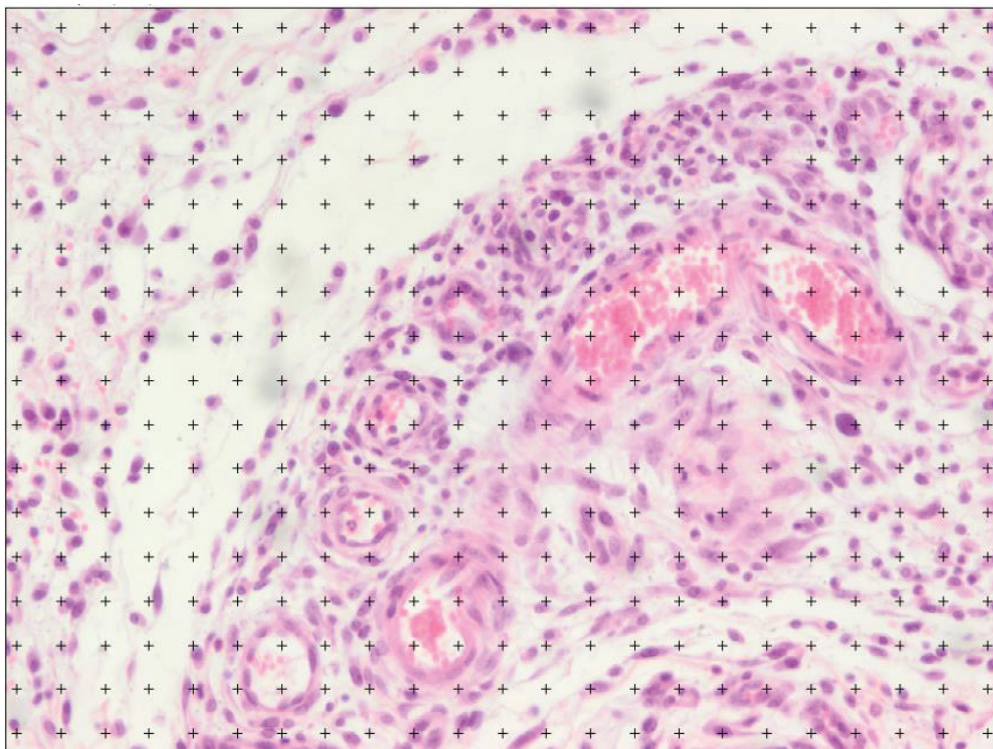
A análise histomorfométrica foi realizada com o uso de um microscópio de luz com aumento de 400x. A porção do tecido que permaneceu em contato com o material na extremidade do tubo foi avaliada. Três campos adjacentes foram capturados por meio do microscópio de luz com máquina digital Olympus DP25 (Olympus, Tóquio, Japão) obtendo-se imagens com resolução de 5.1 Megapixels. As análises foram realizadas pelo uso do software ImageJ (ImageJ, Bethesda, EUA).

Cada corte foi analisado aplicando-se a grade de cruz (Analyze> Tools> Grid > Crosses) com 391 pontos, e com auxílio da ferramenta de contagem (Point tool). Para cada célula inflamatória que coincidiu com o centro de uma cruz um ponto foi contado.

Então, foram classificados em escores, de acordo com a metodologia de estudos similares (GOMES-FILHO *et al.*, 2012; CINTRA *et al.*, 2017b; VALENTIM *et al.*, 2017; BUENO *et al.*, 2018), sendo: (0) - nenhuma ou poucas células; (1) - menos de 25 células; (2) - entre 25 e 125 células; e (3) - 125 ou mais células.

As prevalências dos escores foram convertidas em porcentagem, bem como estabelecidas suas medianas para cada grupo em cada período experimental.

Figura 6 - Contagem das células no software ImageJ.



APÊNDICE

APÊNDICE 1 – NORMAS PARA AUTORES DO PERIÓDICO ESCOLHIDO

Journal of Endodontics

General Points on Composition

Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (e.g., spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar or syntax. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the *JOE*:

The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c” below), or sentences with little to no transition within a paragraph.

Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983).” In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.

Sentences are stronger when written in the active voice, *i.e.*, the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation,” can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation.” Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.

Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)

Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method,” can be edited to “Formerly, endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation.” The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.

Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used,” can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study.”

To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.

Authors should be aware that the *JOE* uses iThenticate, plagiarism detection software, to assure originality and integrity of material published in the *Journal*. The use of copied sentences, even when present within quotation marks, is highly discouraged. Instead, the information of the original research should be expressed by new manuscript author’s own words, and a proper citation given at the end of the sentence. Plagiarism will not be tolerated and manuscripts will be rejected, or papers withdrawn after publication based on unethical actions by the authors. In addition, authors may be sanctioned for future publication.

Organization of Original Research Manuscripts

Please Note: *All abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (in bold), i.e., Introduction, Methods, Results, Conclusions, etc., and should not exceed more than 250 words in length.*

Title Page: The title should describe the major emphasis of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your

advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (*e.g.*, use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at icmje.org). The manuscript title, name and address (including email) of one author designated as the corresponding author. This author will be responsible for editing proofs and order reprints when applicable. The contribution of each author should also be highlighted in the cover letter.

Abstract: The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings, and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (*e.g.*, PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.

Introduction: The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be clearly described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to succinctly summarize the gap in knowledge that the study addresses. It is important to note that many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals. Therefore, authors should refrain from performing the extensive review of the literature, and discuss the results of the study in this section.

Materials and Methods: The objective of the materials and methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The four components of this section are the detailed description of the materials used and their components, the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. Thus, the reader should still be able to understand the method used in the experimental approach and concentration of the main reagents (*e.g.*, antibodies, drugs, etc.) even when citing a previously published method. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method

is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a **commercial product**, the manuscript must state that they either followed manufacturer's protocol or specify any changes made to the protocol. If the study used an *in vitro* model to simulate a clinical outcome, the authors must describe experiments made to validate the **model**, or previous literature that proved the clinical relevance of the model. Studies on **humans** must conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB/equivalent committee(s) approved the protocol and that informed consent was obtained after the risks and benefits of participation were described to the subjects or patients recruited. Studies involving **animals** must state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, drop-outs from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.

Results: Only experimental results are appropriate in this section (*i.e.*, neither methods, discussion, nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts, and Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings. The author may consider the use of supplemental figures, tables or video clips that will be published online. Supplemental material is often used to provide additional information or control experiments that support the results section (*e.g.*, microarray data).

Figures: There are two general types of figures. The first type of figures includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photos, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two columns-width figure (*i.e.*, about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing to emphasize the most important feature of each photomicrograph, but it greatly increases the total number of illustrations that you can present in your paper. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (*e.g.*, "A," "B," etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Jeger et al (J Endod 2012;38:884–888); Olivieri et al., (J Endod 2012;38:1007–1011); Tsai et al (J Endod 2012;38:965–970). Please note that color figures may be published at no cost to the authors and authors are encouraged to use color to enhance the

value of the illustration. Please note that a multi-panel, composite figure only counts as one figure when considering the total number of figures in a manuscript (see section 3, below, for the maximum number of allowable figures). The second type of figures is graphs (*i.e.*, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y-axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

Tables: Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not be necessary: Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).

% NaOCl	N/Group	% Inhibition of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100

% NaOCI	N/Group	% Inhibition of Growth
3	5	100

Discussion: This section should be used to interpret and explain the results. Both the strengths and weaknesses of the observations should be discussed. How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical leadership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions

Acknowledgments: All authors must affirm that they have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest should be disclosed. Any author for whom this statement is not true must append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Likewise, the sources and correct attributions of all other grants, contracts or donations that funded the study must be disclosed

References: The reference style follows Index Medicus and can be easily learned from reading past issues of the JOE. The JOE uses the Vancouver reference style, which can be found in most citation management software products. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits to the number of references for review articles.

Manuscripts Category Classifications and Requirements

Manuscripts submitted to the *JOE* must fall into one of the following categories. The abstracts for all these categories would have a maximum word count of 250 words:

CONSORT Randomized Clinical Trial-Manuscripts in this category must strictly adhere to the Consolidated Standards of Reporting Trials-CONSORT- minimum guidelines for the publication of randomized clinical trials. These guidelines can be found at [. These manuscripts have a limit of 3,500 words, \[including abstract,](#)

introduction, materials and methods, results, discussion, and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.

Review Article-Manuscripts in this category is either narrative articles, or systematic reviews/meta-analyses. Case report/Clinical Technique articles even when followed by the extensive review of the literature will be categorized as "Case Report/Clinical Technique". These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, discussion, and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.

Clinical Research (e.g., prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies, excluding the use of human teeth for technique studies). These manuscripts have a limit of 3,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.

Basic Research Biology (animal or culture studies on biological research on physiology, development, stem cell differentiation, inflammation or pathology). Manuscripts that have a primary focus on biology should be submitted in this category while manuscripts that have a primary focus on materials should be submitted in the Basic Research Technology category. For example, a study on cytotoxicity of a material should be submitted in the Basic Research Technology category, even if it was performed in animals with histological analyses. These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or 4 tables*.

Basic Research Technology (Manuscripts submitted in this category focus primarily on research related to techniques and materials used, or with potential clinical use, in endodontics). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 3 figures and tables*.

Case Report/Clinical Technique (e.g., report of an unusual clinical case or the use of cutting-edge technology in a clinical case). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or tables*. * Figures, if submitted as multi-panel figures must not exceed 1-page length. Manuscripts submitted with more than the allowed number of figures or tables will require the approval of the

JOE Editor or associate editors. If you are not sure whether your manuscript falls within one of the categories above, or would like to request preapproval for submission of additional figures please contact the Editor by email at jendodontics@uthscsa.edu. Importantly, adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript while maintaining its focus and significance. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor may reject manuscripts that exceed these limitations.