

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP**  
**Faculdade de Odontologia**  
**Campus Araraquara**

**Programa de Pós-Graduação em Odontologia**

**Naiana Viana Viola**

*Avaliação histológica e imuno-  
histoquímica do subcutâneo e do alvéolo  
dentário de ratos com implantes de cimento  
Portland, MTA e MTA experimental*

Araraquara  
2010

**Naiana Viana Viola**

*Avaliação histológica e imuno-histoquímica do  
subcutâneo e do alvéolo dentário de ratos com  
implantes de cimento Portland, MTA e MTA  
experimental*

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Odontologia-  
Endodontia, da Faculdade de  
Odontologia de Araraquara da  
Universidade Estadual Paulista, como  
requisito para obtenção do Título de  
Mestre em Odontologia.

*Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri*

**Orientador**

*Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho*

**Co-orientador**

Araraquara  
2010

Viola, Naiana Viana

Avaliação histológica e imuno-histoquímica do subcutâneo e do alvéolo dentário de ratos com implantes de cimento Portland, MTA e MTA experimental / Naiana Viana Viola.– Araraquara: [s.n.], 2010.  
134 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia

Orientador : Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

1. Imunoistoquímica 2. Endodontia 3. Teste de materiais 4.  
Ratos I. Título

**Naiana Viana Viola**

*Avaliação histológica e imuno-histoquímica do  
subcutâneo e do alvéolo dentário de ratos com  
implantes de cimento Portland, MTA e MTA  
experimental*

**Comissão Julgadora**

Dissertação para obtenção do grau de mestre

Presidente e Orientador: Prof Dr Paulo Sérgio Cerri

2º Examinador: Prof Dr Marco Antônio Húngaro Duarte

3º Examinador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eleny Zanella Balducci

Araraquara, 30 de março de 2010

## *Dados Curriculares*

**Naiana Viana Viola**

**Filiação:** João Geraldo Viola

Nirvana de A. Viana Viola

**Data de Nascimento:** 15/12/1981

**2001-2007:** Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Araraquara.

**2008-2010:** Curso de Pós Graduação, Mestrado em Odontologia - Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Araraquara.

**2009-2010:** Curso de Atualização em Endodontia, pela Associação Odontológica de Ribeirão Preto.

## *Dedicatória Especial*

Ao bom *Deus*, por sempre iluminar meu caminho, guiar meus passos e pela Graça de estar simplesmente viva, e de poder ter chegado até aqui. Sei que somente o Senhor tudo pode e que somente ao seu lado tudo de bom poderei ter.

Aos *pais*,

*Vocês são os grandes responsáveis por mais esta conquista!*

Ao meu pai *João Geraldo (Joza)*, pelo seu imenso amor e carinho constante. Homem extremamente inteligente, honesto, digno e competente em tudo que fez; e que com certeza passou suas virtudes aos seus filhos. Você pedia força e saúde para me ver formar na Faculdade, mas Deus não quis assim, pois ele tinha uma missão maior, precisava de você ao seu lado, para juntos estenderem as mãos sobre mim e me abençoar, alargar minhas fronteiras e me livrar de todo o mal. É por isto que sei que continuas “vivo” sempre ao meu lado, de uma forma muito mais poderosa, pois hoje você, é no céu grande luz, brilhando na imensidão e iluminando minha vida.

À minha mãe *Nirvana*, pelo seu amor incondicional, pela sua sempre e verdadeira amizade, pelo confiança e apoio em todas as minhas decisões e por sacrificar e dedicar toda a sua vida a mim e aos meus irmãos. A senhora é um exemplo de dignidade, honestidade, luta e força, enfim, de mãe e mulher. Hoje, mais do que nunca, tenho que te agradecer por ser esta pessoa tão completa: mãe e agora pai, companheira, educadora e minha melhor amiga. Sem a senhora eu nada seria!

À minha querida avó *Julieta*, a qual infelizmente já não se encontra mais entre nós, por sempre ter me ajudado, incentivado e apoiado meus estudos.

Aos meus irmãos e padrinhos, *Eliana e Adriano*, sempre incentivadores e orgulhosos de mim. Agradeço pelo carinho, amizade, companheirismo e que, mesmo a distância, sempre me ajudaram e torceram por mim.

Aos meus cunhados, **Neif e Vanessa**, pela amabilidade, carinho, apoio e por estarem sempre presentes na minha vida como grandes amigos.

A minha sobrinha e afilhada, **Helena**, minha mocinha linda, presente de Deus nas nossas vidas. Por sempre se orgulhar e se espelhar em sua madrinha, pelo seu carinho e amor tão puro e sincero. Te amo minha futura dentista!

Ao meu amor, **Giovanni**, pelo carinho, atenção, companheirismo, presença, paciência e confiança. Obrigado por sempre me apoiar, estimular e me compreender nos momentos difíceis, sempre lutando ao meu lado por minhas conquistas. Você é uma pessoa incrível que só enriquece e alegra a minha vida.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, por me acolher e acreditar em mim, pela sua dedicação e valiosa orientação durante o desenvolvimento deste trabalho. Um profissional empenhado e responsável, mas acima de tudo uma grande pessoa, a qual admiro muito. Meu sincero agradecimento pela sua amizade e por tudo que pude aprender ao seu lado.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho**, pela paciência e colaboração em acompanhar todos os ritmos deste trabalho e por tantos direcionamentos que me deu. Obrigada pela oportunidade e pela confiança.

À **Profa. Dra. Eleny Zanella Balducci**, grande amiga e professora que me ensinou os primeiros passos da pesquisa científica durante a minha graduação, além de sempre me apoiar e acreditar no meu trabalho

## *Agradecimentos Especiais*

À *Profa. Dra. Juliane M.G. Tanomaru*

Pelo seu apoio e colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Por estar sempre pronta a ajudar no que fosse preciso.

À *Profa. Dra. Estela Sasso Cerri*

Obrigada pelos ensinamentos e convívio durante meus estágios de docência na Histologia. Pela sua contribuição, orientação e sugestões durante a elaboração desta dissertação. Pelo exemplo de dedicação à pesquisa, pelo apoio, amizade e respeito com que sempre me tratou.

A minha grande amiga, *Vanessa*, uma irmã

Obrigada pela amizade sincera durante estes anos. Pelo companheirismo, conselhos e broncas, e por estar sempre ao meu lado me apoiando e ajudando. Por fim, obrigada por fazer parte da minha vida e da minha família.

Aos meus amigos, *Tatiane, Juliana, Felipe, Fabiano, Flávia, Rangelly, Bruna e Tamara* que embora não tenham contribuído diretamente, estão sempre ao meu lado me tirando da rotina e alegrando a minha vida.

À minha amiga e companheira de mestrado, *Carol*, pela sua amizade, companhia, apoio e incentivo em vários momentos importantes na minha vida.

A minha sogra e sogro, *Lila e Silvio*, pelo carinho, respeito, paciência e incentivo. Sempre me apoiando em todos os momentos.

Aos meus cunhados, *Lélis e Priscila*, pela amizade e companheirismo em muitos bons momentos durante estes anos.



## *Agradecimentos*

A Faculdade de Odontologia de Araraquara, na qual vivi os nove melhores anos de minha vida, agradeço nas pessoas do **Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla** (Diretor) e da **Profa. Dra. Andréia A. B. Montandon** (Vice-Diretora).

Aos professores do Departamento de Endodontia desta Instituição: **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert, Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho, Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo, Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard.** Meu respeito pelo aprendizado e pelas lições transmitidas tanto durante a graduação quanto no mestrado. Por terem despertado em mim a paixão pela Endodontia. Obrigado pela oportunidade de convívio, pelo companheirismo, amizade e pela contribuição na minha formação profissional.

Ao **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli** por fazer parte da minha formação durante a graduação e pós-graduação. Pelas sugestões durante o Exame Geral de Qualificação que contribuíram, e muito, para a melhora deste trabalho.

Aos colegas do curso de mestrado, **Carol, Roberta, Renata, Santiago, Geraldine e Paula**, pelo companheirismo e amizade.

Ao doutorando, **Guilherme**, por sua paciência, colaboração e atenção na elaboração final desta dissertação.

Ao **Luis Antônio Potenza e Pedro Sérgio Simões**, pela amizade e pelos ensinamentos na parte laboratorial. Pela dedicação e capricho durante todo o processamento histológico.

Aos colegas **Ana Paula, Breno, Flávia, Zé Paulo, Priscila e Renata** pela boa convivência, amizade e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Mara, Rosângela e Alexandre**, pelo profissionalismo e pela ajuda sempre que preciso.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara por toda ajuda e atenção que sempre colocaram à disposição.

*É muito bom passar por uma jornada destas e ter tanto a agradecer, e querer a tantos homenagiar... é muito bom dizer obrigada a tanta gente que, neste período, em que se é acometido de tantos surtos de tristeza, incapacidade, euforia, incerteza, cansaço e alegrias, consegue se manter simplesmente presente.*

*Por isso agradeço a todos aqueles que de alguma forma ajudaram na elaboração e na melhora desta dissertação contribuindo para que eu atingisse esta meta.*

*Este trabalho recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)-(Processon<sup>o</sup>2008/07455-5)*

## Sumário

Resumo.....	11
Abstract.....	15
1-Introdução .....	19
2-Revisão da Literatura .....	23
3-Proposição.....	39
4-Material e Método.....	41
4.1-Experimento .....	41
4.2-Processamento Histológico .....	46
4.3-Forma de Análise .....	47
4.3.1-Análise Morfológica e Morfométrica.....	47
4.3.2- Imuno-histoquímica para detecção de osteopontina e osteocalcina....	50
4.3.3- Técnica de von Kossa.....	51
5- Resultado .....	53
5.1- Implantes no subcutâneo .....	53
- Análise morfológica, imuno-histoquímica e von Kossa.....	53
- Densidade numérica de células inflamatórias no subcutâneo .....	73
5.2 – Implantes no alvéolo dentário .....	75
- Análise morfológica e imuno-histoquímica .....	75
- Densidade numérica de células inflamatórias no alvéolo dentário .....	91
6 – Discussão .....	92
6.1 – Implantes no subcutâneo .....	92
6.2 – Implantes no alvéolo dentário .....	101
7-Conclusão.....	105
8-Referências.....	107
Anexo.....	128

***RESUMO***

VIOLA NV. Avaliação histológica e imuno-histoquímica do subcutâneo e do alvéolo dentário de ratos com implantes de cimento Portland, MTA e MTA experimental. [Dissertação de Mestrado].

Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

## **Resumo**

Atualmente, dentre os materiais retrobturadores, destaca-se o Mineral Trióxido Agregado (MTA) e seus derivados. Devidos as suas boas propriedades biológicas e a necessidade de um cimento endodôntico mais próximo do ideal, modificações têm sido propostas ao MTA na tentativa de se obter um material obturador de canal radicular. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta biológica dos materias Portland, MTA e um material experimental à base de MTA (CE-MTA), no tecido subcutâneo e alvéolo dentário de ratos. Foram utilizados 80 ratos, divididos em 4 grupos: 1-Cimento Portland (CP); 2-MTA (Angelus); 3- CE-MTA e 4-Controle (tubo de polietileno vazio). Em cada animal, foram implantados dois tubos de polietileno, preenchidos ou não com material, no alvéolo dentário e no subcutâneo da região dorsal. Decorrido os períodos de 7, 14, 30 e 60 dias, os implantes juntamente com os tecidos adjacentes foram removidos, fixados e processados para inclusão em parafina. Os cortes do subcutâneo e do alvéolo dentário contendo os implantes corados com H&E, foram utilizados para análise morfológica e quantificação de células inflamatórias; alguns cortes foram submetidos a imuno-histoquímica para detecção de osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN) presentes durante a formação dos tecidos mineralizados. Cortes do subcutâneo contendo os implantes foram submetidos ao método de von Kossa, usado para identificar estruturas calcificadas. Os resultados mostraram que aos 7 dias todos os materiais promoveram uma moderada reação inflamatória no subcutâneo; aos 14 dias, verificou-se um aumento, embora não estatisticamente significativo, no número de células inflamatórias no grupo CE-MTA em

comparação aos demais grupos. No entanto, o número de células inflamatórias reduziu significativamente nos períodos de 30 e 60 dias, em todos os grupos. Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos contendo os materiais e o grupo controle, indicando que os materiais avaliados são biocompatíveis. Imuno-reatividade à OPN e OCN foi observada em células da cápsula adjacente aos diferentes materiais (CP, MTA e CE-MTA), a partir do período de 14 dias. Considerando que no grupo controle não foi detectada qualquer imuno-positividade, é possível sugerir que os materiais avaliados possam induzir as células do subcutâneo a expressar o fenótipo de células ósseas (“osteoblast-like cells”). Estruturas positivas ao von Kossa foram observadas nos adjacente aos implantes dos grupos MTA, CP e CE-MTA, nos períodos de 7, 14 e 30 dias. Estes resultados indicam, portanto, que os materiais induzem, inicialmente, a formação de estruturas calcificadas; estas estruturas devem representar os depósitos de carbonato de cálcio. No alvéolo dentário, embora a reação inflamatória foi intensa em todos os grupos nos diferentes períodos, foi observada a neoformação de trabéculas ósseas junto às paredes do alvéolo. Osteoblastos exibindo imuno-positividade à OPN e OCN indicam que os materiais não interferiram na expressão osteogênica, embora a presença dos tubos de polietileno atrasou a reparação do alvéolo. Portanto, os nossos resultados indicam que o CE-MTA apresentou resposta tecidual semelhante aos materiais MTA e CP. Além disso, nossos resultados imuno-histoquímicos sugerem que os materiais CP, MTA e CE-MTA, possivelmente, exerçam um papel osteoindutor, desde que algumas células do subcutâneo expressaram o fenótipo de “osteoblast-

like cells”. Além disso, estes materiais foram capazes de induzir a formação de estruturas calcificadas em sítio ectópico, i.e. subcutâneo.

**Palavras chaves:** Imunoistoquímica; endodontia; teste de materiais; biocompatibilidade; ratos.



# ***ABSTRACT***

VIOLA NV. Histologic and immunohistochemical analysis of the subcutaneous tissue and the dental alveolus of rats with implants of Portland cement, MTA and MTA experimental. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

## **Abstract**

Currently, among the filling materials, the Mineral trioxide aggregate (MTA) and its derivatives stands. Due to its good biological properties and the need for a sealer closest to the ideal, changes have been proposed to the MTA in an attempt to get a filling material for root canal. The purpose of this study was to evaluate the biological response of the materials Portland, MTA and MTA-based experimental cement in subcutaneous tissue and tooth socket of rats. Were used 80 rats divided into 4 groups: 1-Portland cement (PC), 2-MTA (Angelus), 3 - CE-MTA and 4-Control (polyethylene tubes empty). In each animal, polyethylene tubes were implanted into dorsal subcutaneous and in the tooth socket. After 7, 14, 30 and 60 days, fragments of the subcutaneous and of the maxilla containing the implants with surrounding tissues were removed, fixed, processed and embedded in paraffin. H&E-stained sections of the subcutaneous and tooth socket with the polyethylene tubes were used for morphological analysis and quantification of inflammatory cells, some sections were submitted to immunohistochemistry for detection of osteopontin (OPN) and osteocalcin (OCN), typical non-collagen proteins of the mineralized tissues. von Kossa method, used to identify calcified structures, was performed in the subcutaneous sections. Our results showed that, in the period of 7 days, a moderate inflammatory reaction was observed in the all groups; at 14 days, although not statistically significant, the number of inflammatory cells in the CE-MTA group was higher than other groups. However, the number of inflammatory cells decreased significantly in the periods of 30 and 60 days in all groups in

comparasion to initial periods. Moreover, significant differences were not found between the groups containing materials (PC, MTA and CE-MTA) and the control group indicating, therefore, that these materials are biocompatible. Immunoreactivity to OPN and OCN was observed in the cells of the connective tissue adjacent to the different materials (PC, MTA and CE-MTA), from the period of 14 days. Whereas in the control group did not detect any immuno-positivity, it is possible to suggest that the studied materials can induce the cells of subcutaneous to express the phenotype of bone cells (osteoblast-like cells). von Kossa-positive structures were observed in the groups MTA, CP and CE-MTA, at 7, 14 and 30 days. Therefore, these results indicate that the MTA-based materials induce initially, the formation of calcified structures; these structures may represent deposits of calcium carbonate. In the tooth socket, although the inflammatory reaction was intense in all groups in different periods, the neofomation of bone was observed on the walls of tooth socket. Osteoblasts showing immuno-positivity for OPN and OCN indicate that the materials did not affect the osteogenic expression, although the presence of polyethylene tubes delayed the repair of the tooth socket. Therefore, our results indicate that the CE-MTA cement showed tissue response similar to MTA and PC materials. In addition, our immunohistochemical findings suggest that the PC, MTA and CE-MTA materials play a role osteoinductive role, since some cells in the subcutaneous expressed the phenotype of "osteoblast-like cells". Moreover, the materials were able to induce the formation of calcified structures in the subcutaneous, in an ectopic site.

**Key words:** Immunohistochemistry; endodontics, materials testing, rats.

# ***INTRODUÇÃO***

# 1 Introdução

Os materiais usados para obturar os canais devem apresentar certas características que possibilitem a sua utilização<sup>47</sup>. Sendo assim, os cimentos endodônticos devem cumprir as seguintes exigências: ser bacteriostático, promover selamento apical e lateral, resistir à umidade, ser radiopaco e ser biocompatível. Além disso, o material deve ser estéril, de fácil inserção e remoção<sup>14</sup>.

O desenvolvimento de novos materiais obturadores é importante uma vez que a maioria dos materiais existentes é susceptível a microinfiltração apical e coronária<sup>23, 37 59, 78, 101, 114</sup>. A infiltração coronária foi identificada como uma das principais causas da persistência dos problemas periapicais e fracassos de tratamentos endodônticos<sup>15, 101, 114, 137</sup>.

O MTA original - ProRoot (Dentsply Tulsa dental, Tulsa, OK) - foi introduzido como material selador de comunicações de superfícies dentárias externas, reparações de perfurações e como material retro-obturador em cirurgiasarendodônticas<sup>132</sup>. Quando os resultados dos estudos científicos e clínicos demonstraram boa resposta biológica ao material, outros usos para o MTA começaram a serem explorados. O MTA é eficaz como material de capeamento pulpar e em pulpotomias, em reparações de reabsorções radiculares internas e externas, e também, é indicado para promover a indução do fechamento do ápice, em dentes jovens com problemas endodônticos e rizogênese incompleta<sup>116, 134</sup>.

O MTA é um material estéril, radiopaco em função da presença de óxido de bismuto, não sensível à umidade e à contaminação por sangue, além de proporcionar reparo biológico<sup>5,72, 129, 131-133</sup>.

Atualmente, buscando aperfeiçoar as propriedades físico-químicas, sem, contudo, alterar as propriedades biológicas, as pesquisas buscam avaliar os efeitos de vários aditivos à composição do MTA<sup>44</sup> e do Cimento Portland (CP)<sup>32, 38, 46</sup>, os quais apresentam características muito semelhantes<sup>34</sup>, tendo como objetivo a formulação de um cimento endodôntico o mais próximo do ideal, proporcionando resultados clínicos seguros e satisfatórios.

O uso do MTA como material obturador pode fornecer benefícios favorecendo o prognóstico do dente endodonticamente tratado<sup>14</sup>.

A partir de modificações na formulação do MTA e CP, vários cimentos endodônticos estão sendo desenvolvidos e estudados para serem utilizados como cimentos obturadores dos canais radiculares<sup>7,38,44-46</sup>. Estes novos cimentos ainda se encontram em fase experimental e necessitam de estudos para comprovação de sua efetividade diante de todas as propriedades físicas, químicas e biológicas necessárias a um cimento endodôntico obturador.

Portanto, considerando-se a possibilidade de modificações na formulação do MTA com acréscimo de aditivos e veículos visando a sua adaptação para uso em obturações de canais radiculares, este estudo teve como objetivo avaliar a resposta tecidual ao implante de um material experimental á base de MTA (CE-MTA) em diferentes sítios, subcutâneo e alvéolo dentário, com o objetivo de

verificar a biocompatibilidade deste material e compará-lo com o MTA e o CP, materiais já existentes no mercado.

# ***REVISÃO DA LITERATURA***



## **2 Revisão da Literatura**

Para um cimento endodôntico ser considerado ideal, deve apresentar as seguintes propriedades: bicompatibilidade, selamento marginal, permitir ou induzir o processo de reparo e neoformação óssea, apresentar atividade antimicrobiana, ser de fácil manipulação e aplicação, não ser solúvel nos fluídos corporais após o endurecimento, ser radiopaco, assim como ser de baixo custo (Abedi, Ingle<sup>1</sup> 1995; Morinaga et al.<sup>86</sup> 2003; Torabinejad et al.<sup>133</sup> 1994).

O MTA surgiu para a Odontologia em 1993, desenvolvido pelo professor Mahmoud Torabinejad na Universidade de Loma Linda, nos Estados Unidos, com o objetivo de selar comunicações entre o dente e a superfície externa (Lee et al.<sup>72</sup> 1993).

O MTA foi introduzido para ser usado em perfurações radiculares patológicas ou iatrogênicas, bem como em obturações retrógradas (Lee et al.<sup>72</sup> 1993; Torabinejad et al.<sup>132</sup> 1993). A natureza hidrofílica das partículas do MTA permite seu uso na presença de umidade (Torabinejad et al.<sup>132</sup> 1993) proporcionando selamento (Al- Hezaimi et al.<sup>2</sup> 2005; Pitt Ford et al.<sup>99</sup> 1995; Torabinejad et al.<sup>131</sup> 1995) e adaptação marginal (Xavier et al.<sup>145</sup> 2005), superiores aos demais materiais. O MTA também tem sido usado em capeamentos pulpaes ou pulpotomias, tanto em humanos como em modelos experimentais em animais, demonstrando notável sucesso, semelhante àqueles obtidos com hidróxido de cálcio (Andelin et al.<sup>3</sup> 2003; Chacko, Kurikose<sup>22</sup> 2006; Faraco, Holland<sup>36</sup> 2001; Menezes et al.<sup>83</sup> 2004).

Em 2001, o MTA-Angelus (Ângelus, Londrina, PR, Brasil) foi introduzido no mercado dental brasileiro. Este material é composto por 80% de cimento Portland e 20% de óxido de bismuto. O sulfato de cálcio foi removido da composição do MTA para acelerar o tempo de presa (Angelus). Recentemente, a cor deste produto também foi trocada pela coloração branca, recebendo o nome comercial de MTA Branco (MTAB) (Angelus). Além de ser considerado material indicado em casos de perfurações, também é indicado como material retrobturador, em casos de reabsorções, pulpotomias e no tratamento de dentes com rizogênese incompleta. Todas essas indicações são possíveis, visto ser o MTA um material biocompatível, com pH alcalino em torno de 12,5, boa atividade antimicrobiana, excelente adaptação marginal, baixa solubilidade, baixa infiltração bacteriana, resistência ao deslocamento e baixa citotoxicidade (Duarte et al.<sup>31</sup> 2003; Santos et al.<sup>110</sup> 2005; Sipert et al.<sup>119</sup> 2005; Sluyk et al.<sup>120</sup> 1998).

Entretanto, o MTA possui propriedades físico-químicas que são inferiores às ideais. O cimento resultante da mistura do pó com água é difícil de ser manipulado (Bortoluzzi et al.<sup>18</sup> 2006; Torabinejad et al.<sup>130</sup> 1995); sua consistência granular dificulta sua inserção nas cavidades (Kogan et al.<sup>63</sup> 2006; Lee et al.<sup>71</sup> 2004); seu tempo de trabalho é inferior a 4 min.(Matt et al.<sup>81</sup> 2004) e seu tempo de presa é extenso, o que favorece sua solubilidade, desintegração ou desalojamento do material (Kogan et al.<sup>63</sup> 2006). Além disso, para ativar a presa do cimento necessita-se de umidade adicional (Torabnejad et al.<sup>130</sup> 1995) e por fim, seu custo é relativamente alto (Menezes et al.<sup>83</sup> 2004).

Em 1824, Joseph Aspdin<sup>1</sup> patenteou um produto denominado Cimento Portland (CP), obtido a partir da calcinação da mistura de rochas calcárias provenientes da localidade de Portland, na Inglaterra, e materiais silico-argilosos. O produto calcinado, depois de finamente moído, apresentava propriedades aglomerantes quando misturado à água. A argamassa obtida apresentava maior facilidade de trabalho, capacidade aglomerante e estabilidade. A partir de então, a fabricação e as características físico-químicas do cimento têm evoluído constantemente (Tavares, Luiz<sup>127</sup> 1994).

Os materiais utilizados na composição dos cimentos estão assim definidos:

1) clínquer Portland – produto constituído em sua maior parte de silicatos de cálcio com propriedades hidráulicas; 2) gesso – sulfato de cálcio; 3) escória de alto forno – produto do tratamento do minério de ferro em forno alto, obtido sob forma granilada por resfriamento brusco; 4) materiais pozolânicos – materiais silicosos ou silico-aluminosos que possuem pouca ou nenhuma atividade aglomerante, mas quando finalmente divididos e na presença de água, reagem com hidróxido de cálcio, à temperatura ambiente, para formar compostos com propriedades hidráulicas; 5) materiais carbonáticos – materiais finalmente divididos, constituídos, em sua maior parte, de carbonato de cálcio (Tavares, Luiz<sup>127</sup> 1994).

No final do século passado, o CP foi referenciado como um material de composição química e propriedades físicas semelhantes ao MTA, desencadeando

---

<sup>1</sup>Joseph Aspidin apud Barbosa AVH, Casal C, Nascimento ACA, Valverde DFS, Valverde RS, Sobral APV. Propriedades do Cimento Portland e sua Utilização na Odontologia: Revisão de Literatura. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2007; 7: 89-94.

reações teciduais similares quando estudado em modelos animais, porém com custo bastante inferior (Estrela et al.<sup>34</sup> 2000).

Tendo em vista que a manutenção de um dente, em condições fisiológicas satisfatórias, é, ou deveria ser uma das principais e mais freqüentes atividades diárias do cirurgião dentista, a utilização de um material odontológico que apresenta propriedades físicas, químicas e biológicas satisfatórias, com custo acessível à população economicamente desfavorável (Estrela et al.<sup>34</sup> 2000), torna compreensível a importância e o interesse sempre crescente pela evolução dos estudos em torno do CP.

Levando-se em consideração os relatos sobre a semelhança de composição química entre o MTA e o CP, foi objetivo de um estudo avaliar a biocompatibilidade do CP. Células da linhagem odontoblástica (MG-63) foram cultivadas na presença do CP e do MTA. Foi observada a neoformação de matriz extracelular nas culturas dos dois materiais. Experimentos utilizando os mesmos materiais para capeamentos diretos, após exposição pulpar em ratos, mostraram resposta semelhante ao *in vitro*; em alguns casos, foi possível visualizar a aposição de dentina reparadora (Wucherpfenning, Green<sup>144</sup> 1999).

Avaliando o comportamento da polpa de dentes de cães após pulpotomia e proteção do tecido remanescente com MTA e CP, foi relatado resultado semelhante para os dois materiais, sendo observada formação de dentina tubular em quase todas as amostras. Concluiu-se, portanto, que quando empregados diretamente sobre a polpa dentária, os dois cimentos possibilitam a formação de dentina (Holland et al.<sup>51</sup> 2001).

Um estudo em cavidades confeccionadas em mandíbulas de preás avaliou a biocompatibilidade de CP e do MTA. A análise dos resultados constatou reparo ósseo, além de resposta inflamatória mínima adjacente aos implantes dos materiais testados (Saidon et al.<sup>109</sup> 2003).

A semelhança entre o MTA e o CP sugere que alguns dos recursos utilizados para melhoria das características físicas e químicas do CP possam ser utilizados no cimento MTA. A adição de agentes aceleradores reduz o tempo de presa do CP e um dos agentes utilizados mais comumente é o cloreto de cálcio. Sendo assim, a adição de 5% de cloreto de cálcio ao MTA reduziu o tempo de presa de 50 min (MTA misturado com água estéril) para 25 minutos (Kogan et al.,<sup>63</sup> 2006), possibilitando uma melhora da capacidade seladora (Ber et al.<sup>13</sup> 2007; Bortoluzzi et al.<sup>16</sup> 2008).

Estudos comparando o MTA ao CP relataram que o CP tem os constituintes principais em comum com MTA. Alguns destes componentes são: óxido de cálcio e sílica. MTA também contém óxido de bismuto, o qual aumenta sua radiopacidade; este componente está ausente no CP (Estrela et al.<sup>34</sup> 2000; Torabinejad et al.<sup>130</sup> 1995). O MTA e CP têm propriedades radiográficas, macro e microscópicas quase que idênticas (Wucherpfenning, Green<sup>144</sup> 1999). MTA e CP induzem a precipitação de cálcio quando colocados em tubos de dentina implantados no subcutâneo de ratos, sugerindo que estes materiais são semelhantes (Holland et al.<sup>52</sup> 2001). MTA e CP também são semelhantes no que se refere às propriedades antimicrobianas (Torabinejad et al.<sup>129</sup> 1995).

A ação antimicrobiana do MTA, CP, pasta de hidróxido de cálcio, Sealapex e Dycal foi avaliada sobre quatro espécies de bactérias – *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas auruginosa*, *Bacillus subtilis* e o fungo *Candida albicans*, além de uma mistura de todos eles. Os elementos químicos do MTA e de dois CP (Portland cement Itaú e Portland cement Liz) também foram analisados. Os resultados mostraram que todos os materiais testados apresentam alguma atividade antimicrobiana, sendo que a pasta de hidróxido de cálcio foi superior a todos os outros materiais sobre todos os micro-organismos testados (Estrela et al.<sup>34</sup> 2000).

Recentemente, um estudo comparou a habilidade do MTA e CP em prevenir a infiltração coronária através do reparo de perfurações de furca em molares de humanos utilizando um modelo de infiltração polimicrobiano. Os dentes foram extraídos e incubados a 37°C em meio de cultura contendo saliva. Após 50 dias de incubação, observou-se que oito (53%) das quinze amostras do MTA e nove (60%) das quinze amostras do CP estavam completamente contaminadas. Os resultados não foram diferentes estatisticamente e foi concluído que ambos os materiais demonstram uma habilidade similar em selar perfurações de furca (De Deus et al.<sup>27</sup> 2006).

Avaliando a citomorfologia dos osteoblastos e a produção de citocinas na presença do MTA, observou-se que, aparentemente, o MTA oferece um substrato biologicamente ativo para células ósseas e estimula a produção de interleucinas: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (Koh et al.<sup>64</sup> 1998; Koh et al.<sup>65</sup> 1997).

Em relação às propriedades biológicas, estudos demonstraram que o MTA promove uma resposta tecidual favorável, caracterizada pela presença de moderada resposta inflamatória nos períodos iniciais, a qual tende a diminuir após 30 ou 60 dias. Geralmente, é relatado que o MTA é circundado por uma cápsula fibrosa e induz a formação de tecido mineralizado (Bernabé et al.<sup>12</sup> 2005; Pitt Ford et al.<sup>99</sup> 1995). Outros trabalhos comprovaram que por ser um material biocompatível, o MTA possibilita reparo em diversas situações, induzindo à deposição de tecido dentinário, cementário e ósseo (Holland et al.<sup>51</sup> 2001; Torabinejad et al.<sup>135</sup> 1998).

Apesar da biocompatibilidade dos cimentos MTA e CP, o último apresenta baixa radiopacidade. Assim, foi adicionado ao cimento Portland iodofórmio para melhorar sua radiopacidade e, posteriormente, comparada a biocompatibilidade em relação ao MTA (ProRoot); os resultados revelaram que a adição do iodofórmio ao CP não promoveu diferenças significantes na resposta inflamatória entre os materiais (Morais et al.<sup>84</sup> 2006).

Sendo a baixa radiopacidade uma das maiores desvantagens do CP, um estudo recente avaliou a hipótese de que um Cimento Experimental contendo CP e óxido de bismuto teria a mesma biocompatibilidade que os materiais MTA e CP, e radiopacidade semelhante ao MTA. Para determinar suas características foram comparados com os demais cimentos: composição química, radiopacidade, citotoxicidade e reação tecidual, as quais não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, sugerindo que o Cimento Experimental poderia substituir o MTA (Hwang et al.<sup>56</sup> 2009).

Outro estudo recente avaliou a radiopacidade do CP associado a diferentes agentes radiopacificadores como: óxido de bismuto, óxido de zinco, óxido de chumbo, subnitrito de bismuto, carbonato de bismuto, sulfato de bário, iodofórmio, tungstênio de cálcio e óxido de zircônia. Todas as substâncias testadas apresentaram maior radiopacidade que a dentina e potencial para serem utilizadas como agentes radiopacificadores do CP. Entretanto, a possibilidade destes agentes interferirem com as propriedades químicas, físicas e biológicas do CP, deverão ser investigadas antes da utilização clínica ser recomendada (Duarte et al.<sup>32</sup> 2009).

Com o objetivo de acelerar a presa foi adicionado cloreto de cálcio aos materiais: ProRoot MTA, MTA Branco e CP, avaliando a influência no pH e na liberação de íons cálcio; os resultados mostraram que a adição do cloreto de cálcio ao MTA melhorou suas propriedades físico-químicas; a adição de cloreto de cálcio aos materiais facilita o processo de manipulação por exigir menor quantidade de água (Bortoluzzi et al.<sup>17</sup> 2006). Foi demonstrado também, que a adição de 3% de NaOCl (cloreto de sódio) gel ao MTA melhorou seu tempo de presa (Kogan et al.<sup>63</sup> 2006). Além disso, a adição de cloreto de cálcio aos cimentos MTA, ProRoot MTA, MTA-Angelus e CP branco radiopaco, promoveu melhora na capacidade seladora dos três tipos de cimento (Bortoluzzi et al.<sup>18</sup> 2006). O cloreto de cálcio não alterou as propriedades biológicas do MTA, pois permitiu a formação de barreira de tecido mineralizado quando utilizado após pulpotomia (Bortoluzzi et al.<sup>16</sup> 2008).



A fim de melhorar as propriedades antimicrobianas, foram realizados estudos, nos quais se adicionou clorexidina ao MTA, o que proporcionou aumento da atividade antimicrobiana e, aparentemente, não interferindo nas propriedades biológicas (Stowe et al.<sup>123</sup> 2004; Sumer et al.<sup>124</sup> 2006).

A análise da atividade antimicrobiana do MTA branco (Angelus), com um material experimental contendo aluminato de cálcio, revelou que os dois materiais impediram a contaminação bacteriana. Além disso, como materiais retrobturadores foram eficientes no selamento dos canais, evitando a contaminação por *Enterococcus faecalis* no período avaliado, o qual foi de 30 dias (Jacobovitz et al.<sup>58</sup> 2009).

O MTA branco misturado ao Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Hidrogênio Fosfato de Sódio), implantado no subcutâneo de ratos, apresentou resultados mais favoráveis que o MTA branco, verificando que a adição de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ao MTA branco tornou o material mais biocompatível do que o MTA branco sozinho (Lotfi et al.<sup>76</sup> 2009).

A resposta do tecido conjuntivo de rato após o implante subcutâneo de tubos de polietileno e dentina contendo os materiais MTA-Angelus e *Light-cure* MTA (experimental), no qual a formulação consiste de resina hidrofílica, que se acredita ser biocompatível, e ingredientes ativos do cimento Portland, demonstrou que a reação inflamatória foi similar em ambos os materiais. Entretanto, o MTA experimental (*Light-cure*) não estimulou a formação de tecido mineralizado (Gomes-Filho et al.<sup>44</sup> 2008).

No intuito de confirmar a formação de tecido mineralizado, algumas técnicas têm sido aplicadas, entre estas técnicas estão: quantificação de fosfato e

de cálcio (Gerstenfeld et al.<sup>41</sup> 1987), difração de raios-X (Bellows et al.<sup>11</sup> 1987; Rey et al.<sup>102</sup> 1995), espectrometria (Iwamoto et al.<sup>57</sup> 1993), entre outras. Apesar de estas técnicas serem aceitáveis para verificação de formação de tecido mineralizado, muitos pesquisadores não têm acesso aos instrumentos para sua realização. Outra técnica, relativamente simples, usada com certa frequência para avaliar a formação de tecido calcificado é a técnica de von Kossa, a qual avalia a precipitação de cálcio sobre material orgânico, originando nódulos de calcificação (Bellows et al.<sup>11</sup> 1987; Bonewald et al.<sup>15</sup> 2003; Chen et al.<sup>24</sup> 1995; Gerstenfeld et al.<sup>41</sup> 1987; Gomes-Filho et al.<sup>44</sup> 2008; Gomes-Filho et al.<sup>46</sup> 2009; Lomri et al.<sup>75</sup> 1988; Marsh et al.<sup>80</sup> 1995; Owen et al.<sup>96</sup> 1990; Ueno et al.<sup>139</sup> 1992). Assim, a presença de nódulos de calcificação após implantes de tubos de dentina preenchidos com MTA e outros materiais retrobturadores foi observada em subcutâneo de ratos por meio da técnica de von Kossa (Gomes-Filho et al.<sup>44</sup> 2008; Gomes-Filho et al.<sup>45</sup> 2009; Gomes-Filho et al.<sup>46</sup> 2009; Holland et al.<sup>55</sup> 2006).

Alguns trabalhos avaliaram a biocompatibilidade e a deposição de tecido mineralizado no subcutâneo, através da técnica de von Kossa e de luz polarizada, verificando áreas de calcificação distrófica positiva (Gomes-Filho et al.<sup>44</sup> 2008; Gomes-Filho et al.<sup>46</sup> 2009; Holland et al.<sup>54</sup> 2002; Morais et al.<sup>84</sup> 2006); enquanto outros avaliaram a neoformação óssea em defeitos em tíbias de ratos e mandíbula de porcos (Torabinejad et al.<sup>135</sup> 1998) e em mandíbulas de ratos (Nascimento et al.<sup>90</sup> 2007) e os resultados fortaleceram as características biológicas do cimento MTA.

Recentemente, um estudo avaliou e comparou de forma qualitativa e quantitativa a resposta inflamatória e o potencial de formação óssea após implantes de tubos de polietileno preenchidos com um novo hidróxido de cálcio contendo um selador (MBPc) e ProRoot MTA, em um novo modelo de estudo, no osso alveolar de ratos. Os resultados demonstraram que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os materiais, mostrando que ambos tiveram respostas biológicas similares (Cintra et al.<sup>26</sup> 2006).

Diferentes métodos são utilizados para avaliar a biocompatibilidade dos materiais endodônticos (Moretton et al.<sup>85</sup> 2000; Rowe<sup>106</sup> 1967; Safavi et al.<sup>108</sup> 1989), no entanto, o método de implantes em alvéolo dentário tem sido utilizado por alguns autores (Cintra et al.<sup>26</sup> 2006; Okamoto<sup>92</sup> 1964). Tem-se sugerido que o alvéolo dentário pode constituir-se num sítio adequado para estudar a biocompatibilidade de materiais, pois após a extração dental, remanescentes do ligamento periodontal permanecem no interior da cavidade óssea (DeGroot et al.<sup>28</sup> 1995; Lin et al.<sup>74</sup> 1994; Nary, Okamoto<sup>89</sup> 1996). Considerando que o ligamento periodontal contém não somente fibroblastos, porém também células mesenquimais indiferenciadas, os materiais implantados no alvéolo poderiam estimular a diferenciação destas células e possibilitar a formação de tecido mineralizado (Cintra et al.<sup>26</sup> 2006).

A neoformação de constituintes da matriz orgânica dos tecidos mineralizados pode ser avaliada por imuno-histoquímica para detectar as diversas proteínas existentes, como osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, entre outras (Garcia<sup>39</sup> 1999; Lao et al.<sup>98</sup> 2006; Penteado et al.<sup>70</sup> 2005). A osteocalcina é

um peptídeo secretado pelos osteoblastos, condrócitos hipertróficos e odontoblastos (Saraiva, Lazaretti-Castro<sup>112</sup> 2002; Vieira<sup>140</sup> 1999). É uma das proteínas não-colágenas mais abundantes, a qual é depositada em quantidades significativas pelos osteoblastos durante a formação da matriz óssea. A osteocalcina é constituída por 49 aminoácidos, sendo três constituídos por ácido gama-carboglutâmico (Gla), que confere a osteocalcina a peculiaridade de se ligar ao cálcio. As funções da osteocalcina são ainda mal definidas, apesar de sua estrutura indicar interação com cálcio e com cristais de hidroxiapatita (Vieira<sup>140</sup> 1999). Estudos indicam também que a osteocalcina participa no início do processo de mineralização (Owen et al.<sup>96</sup> 1990). Portanto, a osteocalcina tem sido usada como um marcador de osteoblasto maduro (Owen et al.<sup>96</sup> 1990; Saraiva, Lazaretti-Castro<sup>112</sup> 2002; Vieira<sup>140</sup> 1999).

Osteopontina é uma glicoproteína secretada com uma estrutura de vários domínios e funções características de uma proteína da matriz extracelular. OPN contém arginina-glicina-aspartato (RGD), que promove a adesão celular, bem como uma clivagem da trombina, e sítios de ligação para heparina e cálcio (Giachelli, Steiz<sup>43</sup> 2000). Embora normalmente expressa em osso e rim, níveis de osteopontina são elevados durante a cicatrização da ferida e inflamação na maioria dos tecidos estudados (Denhardt et al.<sup>29</sup> 2001; Giachelli, Steiz<sup>43</sup> 2000; Liaw et al.<sup>73</sup> 1995; Lund et al.<sup>77</sup> 2009).

Estudos revelaram a osteopontina como um regulador e sinalizador da adesão e migração celular, capaz de estimular a sobrevivência de várias células: mesenquimais, epiteliais e inflamatórias, além de ser um regulador potente da

formação óssea e da calcificação ectópica (Giachelli, Steiz<sup>43</sup> 2000; Liaw et al.<sup>73</sup> 1995). Com base nestes estudos, um quadro geral da osteopontina como um importante regulador da biomineralização e da inflamação está emergindo, sendo que uma das funções da osteopontina nestas situações é a sua capacidade de regular a função dos macrófagos e células derivadas, ou seja, os osteoclastos (Denhardt et al.<sup>29</sup> 2001; Giachelli, Steiz<sup>43</sup> 2000).

A osteopontina é altamente expressa em tecidos mineralizados, inclusive osso e dentina. Foram propostas pelo menos três funções da osteopontina em tecidos calcificados, baseado em achados *in vitro* e *in vivo*: 1) regulação da adesão de células ósseas; 2) regulação da função dos osteoclastos; e 3) regulação da mineralização da matriz óssea (Gericke et al.<sup>40</sup> 2005).

Osteopontina é sintetizada por osteoblastos e osteoclastos, e é encontrada na matriz osteóide, bem como lâminas que limitam a matriz e linhas cementárias do osso. Osteopontina facilita a adesão de ambos os tipos de células à matriz óssea e estimula os osteoclastos, através da interação com a integrina  $\alpha_v\beta_3$ , a migrarem e reabsorverem osso. Osteopontina imobilizada na matriz óssea mineralizada também atua para inibir o acúmulo de bioapatita através de interação física com crescimento de cristais. A osteopontina solúvel liberada por ambas as células, osteoblastos e osteoclastos, pode regular negativamente monócitos que são as células precursoras dos osteoclastos, talvez como um condutor, parte de um *feedback* negativo. Um conjunto similar de funções pode ser previsto para osteopontina na regulação da calcificação ectópica. Neste caso, as células mesenquimais, como as do músculo liso ou células intersticiais valvulares, podem

utilizar a osteopontina para a adesão e estas células podem elaborar uma “matriz componente de mineralização” com condições/características de doença. Osteopontina também pode funcionar para mobilizar e regular as células derivadas dos monócitos, incluindo macrófagos e células multinucleadas gigantes que são capazes de fagocitar e/ou reabsorverem os nódulos de calcificação ectópica. Finalmente, osteopontina ligada aos depósitos minerais ectópicos pode inibir o crescimento de cristais (Giachelli, Steiz<sup>43</sup> 2000).

O MTA adicionado à cultura de osteoblastos estimulou a proliferação destas células, as quais exibiram alta expressão para as proteínas de colágeno tipo I, osteocalcina e sialoproteína óssea (Tani-Ishii et al.<sup>126</sup> 2007).

A biocompatibilidade às células ósseas (MG63) e a expressão de marcadores ósseos foram comparados após o tratamento com um cimento a base de silicato e cálcio (CS) e MTA. Os resultados demonstraram que na presença do CS e MTA as células exibiram a expressão de genes para colágeno tipo I, sialoproteína óssea, osteocalcina e osteopontina. Ambos os materiais foram biocompatíveis e aparentaram ter efeito osteocondutor nas células ósseas (Chen et al.<sup>25</sup> 2009).

Atualmente, o intuito de muitos estudos é formular um material a base de MTA ou cimento Portland para ser utilizado não apenas como material retrobturador, mas principalmente como cimento obturador dos canais radiculares. Desta forma, vários componentes estão sendo adicionados a estes cimentos já existentes e conseqüentemente, vários testes biológicos, químicos e físicos estão sendo realizados no intuito de comprovar a sua possível utilização clínica (Asgary

et al.<sup>7</sup> 2008; Gandolfi et al.<sup>38</sup> 2008; Gomes-Filho et al.<sup>45</sup> 2009; Gomes-Filho et al.<sup>46</sup> 2009; Santos et al.<sup>111</sup> 2008).

A partir de modificações na formulação do MTA, recentemente foi desenvolvido e lançado na Argentina o cimento endodôntico Endo CPM Sealer (EGEO S.R.L. Bajo licencia MTM Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina); CPM significa “Cimento de Portland Modificado”. Segundo o fabricante, o Endo CPM Sealer apresenta características especiais de escoamento, plasticidade, aderência, tamanho das partículas, pH, tolerância biológica, biocompatibilidade e propriedade osteogênica. O Endo CPM Sealer é indicado para utilização como cimento obturador de canais radiculares, podendo ser usado também em perfurações radiculares ou de furca e como material retrobturador.

Avaliando a resposta tecidual frente a implantes de Endo CPM Sealer, Sealapex e MTA Angelus no subcutâneo de ratos, os resultados demonstram que o Endo CPM Sealer foi biocompatível e estimulou a mineralização (Gomes-Filho et al.<sup>46</sup> 2009).

As propriedades físicas e composição química de um novo cimento endodôntico (new experimental Cement- NEC) foram comparadas ao MTA. Foi verificado que a composição química de ambos os materiais são diferentes e que, entretanto, o NEC exibiu propriedades físicas aceitáveis para um cimento endodôntico (Asgary et al.<sup>7</sup> 2008).

A resposta celular foi avaliada frente à utilização de um novo CP, o qual é uma mistura de CP com solução de articaína, para formar uma pasta. Os resultados revelaram que o cimento preparado com articaína permitiu o

crescimento das células ósseas, apresentando propriedades para ser utilizado como material para retrobturações e obturação de canais radiculares (Gandolfi et al.<sup>38</sup> 2008).

Outro novo cimento endodôntico está sendo desenvolvido para tentar obter todas as propriedades necessárias. Este possui em sua fórmula CP em gel, e foi denominado de Cimento Endodôntico Rápido (CER). Um estudo recente comparou a resposta tecidual ao MTA Angelus e ao CER, através de implantes de tubo de polietileno em subcutâneo de ratos. Os resultados mostraram semelhante resposta inflamatória em ambos os materiais, além da presença de tecido mineralizado. Sendo possível concluir que o CER foi biocompatível e estimulou a mineralização (Gomes-Filho et al.<sup>45</sup> 2009). Outro estudo avaliou o tempo de presa e o coeficiente de expansão térmica dos cimentos CER e MTA – Angelus. As análises estatísticas mostraram diferenças no tempo de presa e no coeficiente de expansão entre os dois materiais. O tempo de presa do CER foi inferior ao do MTA, além do que o CER teve coeficiente de expansão semelhante ao da dentina, diminuindo a contaminação e proliferação de micro-organismos (Santos et al.<sup>111</sup> 2008).

Sendo assim, devido aos inúmeros estudos experimentais que relatam as boas propriedades do MTA e do CP quando comparados aos materiais já existentes, as atuais pesquisas, na tentativa de obter um cimento obturador de canais radiculares, estão formulando e testando vários cimentos experimentais à base de MTA ou CP, os quais possam apresentar propriedades biológicas, químicas e físicas que proporcionem uma obturação o mais próxima da ideal.



***PROPOSIÇÃO***

### **3 Proposição**

O presente estudo visou à avaliação histológica de um material experimental à base de MTA (CE-MTA) em diferentes sítios, subcutâneo e alvéolo dentário, com o objetivo de verificar as propriedades biológicas deste material e compará-lo com o MTA e o Cimento Portland, cimentos já existentes no mercado. Para atingir este propósito, foi realizada análise morfológica, morfométrica e imuno-histoquímica.

# ***MATERIAL E MÉTODO***

## **4 Material e Método**

### **4.1 Experimento**

O protocolo referente a presente pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Processo nº 18/2008) (Anexo).

Foram utilizados 80 ratos (*Rattus Norvegicus* Holtzman) de aproximadamente 250 gramas, os quais foram mantidos em gaiolas individuais em ambiente climatizado e com ciclo de luz de 12 horas. Para sedação e anestesia foi utilizada a associação dos fármacos: Ketamina-80mg/kg (Avenco Inc., Fort Dodge, IA) e Xilazina-4mg/kg (Mobay Corp., Shawnee, KS). Assim, os animais receberam injeção intraperitoneal contendo 0,04mL/100g de Xilazina e 0,08mL/100g de Ketamina. Uma dosagem suplementar de anestésico foi administrada sempre que necessário.

Os animais foram divididos equitativamente em quatro grupos:

**Grupo CP** – Cimento Portland Branco (Quadro 1);

**Grupo MTA** – Mineral Trióxido Agregado (Quadro 1);

**Grupo CE-MTA<sup>2</sup>** – MTA associado a componentes resinosos (Quadro1);

**Grupo Controle** – Tubos de polietileno vazios

---

<sup>2</sup> O cimento **CE-MTA** foi desenvolvido pelos Professores Dr Mário Tanomaru Filho e Dra Juliane Guerreiro Tanomaru do Departamento de Odontologia Restauradora – Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. A finalidade é obter um cimento obturador de canais radiculares à base de MTA, o qual contém adicionalmente em sua composição alguns componentes resinosos. Para avaliar a sua possível utilização estão sendo realizados estudos relacionados à avaliação de suas propriedades biológicas, físicas e químicas.

**Quadro 1:** Composição química dos materiais utilizados nos implantes

<b>MATERIAIS</b>	<b>COMPOSIÇÃO</b>
<b>CP- CPB- 40</b> estrutural Votoran, Votorantin cimentos, Camargo Correa Cimentos S.A., Pedro Leopoldo, MG	fosfato de cálcio, óxido de cálcio e sílica
<b>MTA</b> – Angelus, Londrina, PR	80% de cimento Portland e 20% de óxido de bismuto
<b>CE-MTA</b>	Óxidos minerais, radiopacificador e componentes resinosos

Antes do implante, os materiais foram preparados de acordo com as instruções de seus fabricantes e colocados no interior de tubos de polietileno, previamente esterilizados em óxido de etileno<sup>44</sup>, mantendo ambas extremidades abertas. No subcutâneo foram utilizados tubos de polietilenos de 10mm de comprimento x 1,6mm de diâmetro e no alvéolo, os tubos foram de 3mm de comprimento x 1,6mm de diâmetro<sup>26</sup> (Figura 1A). Cada animal recebeu 2 implantes, com o mesmo material, sendo um na região do subcutâneo e outro no alvéolo dentário. O material cirúrgico utilizado para realizar os implantes foi previamente esterilizado (Figura 1B).

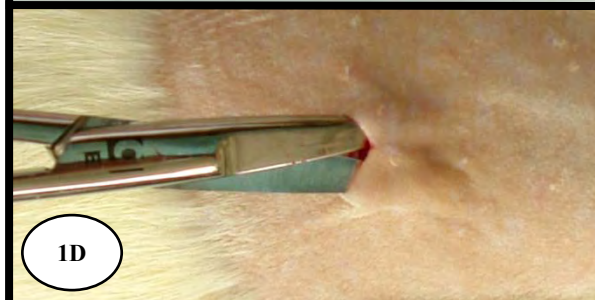
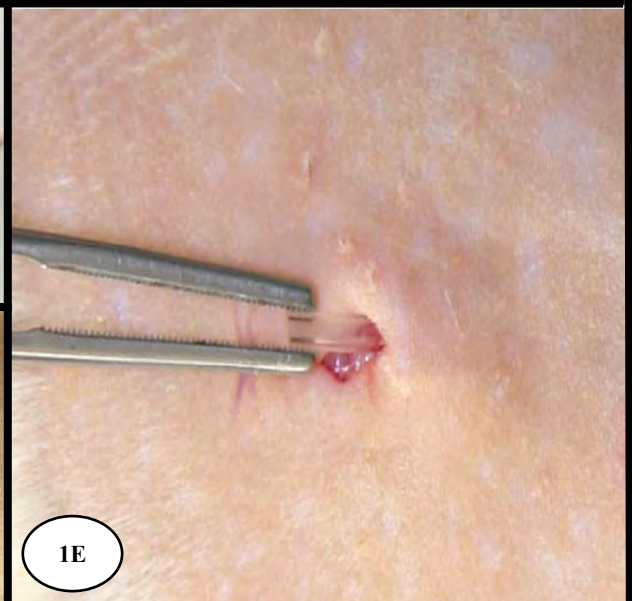
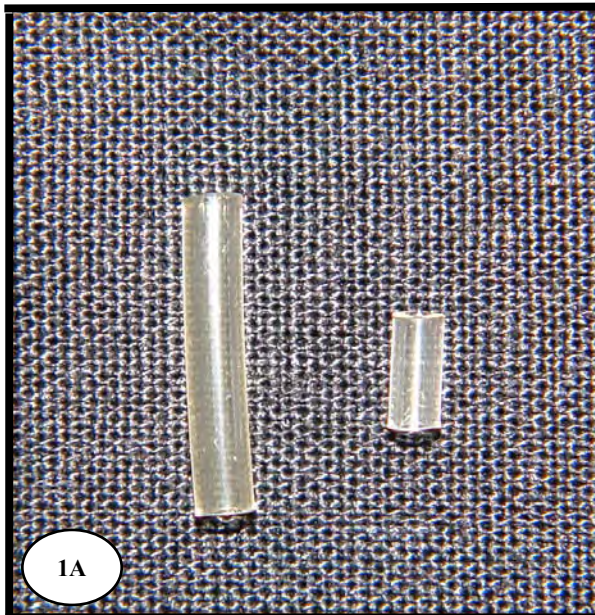
Após a tricotomia (Figura 1C) e assepsia com solução de iodo a 5% da região dorsal do animal, realizou-se uma incisão de 2cm com bisturi de lâmina 15, orientando-se na direção da cabeça para a cauda. O tecido foi divulsionado, criando-se uma bolsa em um dos lados da incisão, na qual foi implantado o tubo de polietileno preenchido ou não com material (Figuras 1D, 1E e 1F). O local da incisão foi suturado em pontos simples utilizando fio de seda (Seda 4-0, ETHICON, São José dos Campos, SP-Brasil) (Figura 1G).

Subsequentemente, a extração do incisivo superior esquerdo foi realizada, no mesmo animal, utilizando-se um Holleback 3S e uma pinça hemostática curva (Figura 1B). Com o animal posicionado em decúbito dorsal realizou-se a sindesmotomia, subluxação e extração do elemento dentário como descrito por Okamoto<sup>93</sup> (Figuras 2A - 2F). Após a extração e hemostasia, o implante foi inserido no alvéolo com auxílio de uma pinça clínica pediátrica (Figura 2G). O tecido gengival foi suturado, pela união de suas bordas, em pontos simples (Seda 4-0, ETHICON, São José dos Campos, SP–Brasil), objetivando uma sutura o mais oclusiva possível (Figura 2H).

Foi administrado como analgésico pós-operatório, durante 3 dias, o ácido acetil salicílico na dosagem de 120-300mg/Kg por via oral, como recomendado (Canadian Council on Animal Care -CCAC).

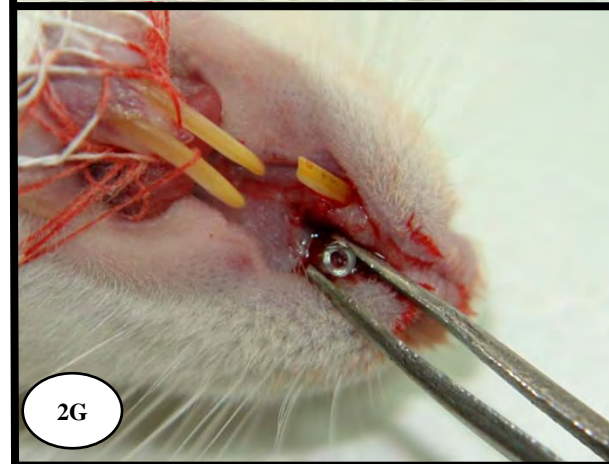
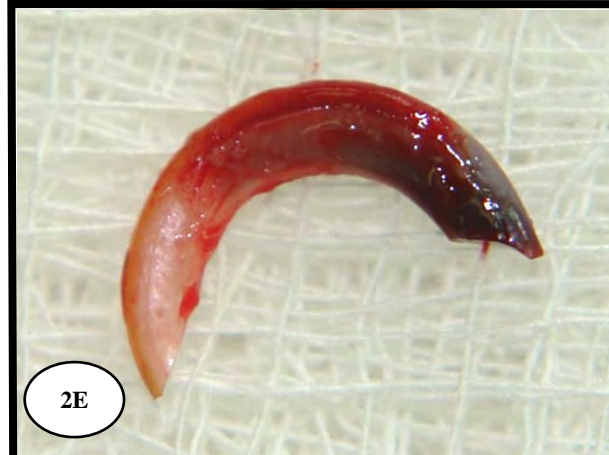
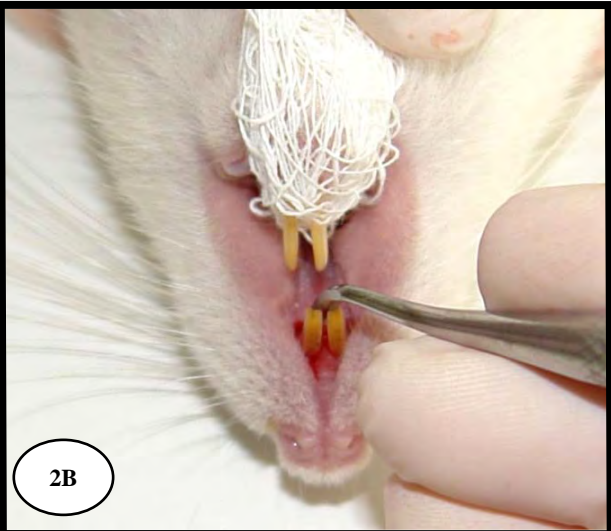
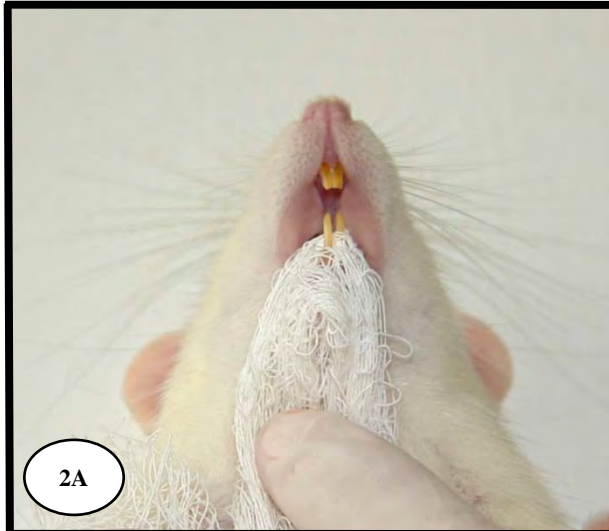
Devido a realização dos procedimentos cirúrgicos no alvéolo, os animais receberam alimentação pastosa por 4 dias, após este período retornaram a alimentar-se com ração granulada (Guabi Nutri Labor, Brasil).

**FIGURAS 1A – 1G** – Seqüência cirúrgica da inserção do implante no subcutâneo da região dorsal do rato. A **fig. 1A** detalhe ampliado dos tubos de polietileno. Na esquerda tubo utilizado no subcutâneo com 1cm de comprimento/1,6mm de diâmetro e na direita tubo utilizado no alvéolo com 3mm de comprimento/1,6mm de diâmetro. Na **fig. 1B** mostra os instrumentos utilizados nos procedimentos cirúrgicos do subcutâneo e do alvéolo dentário: seringa de vidro de irrigação tipo Luer-Lock (5mL), cuba cirúrgica, porta agulha tipo Mayo – Hegar com ponta de vídea, pinça hemostática curva tipo Kelly, tesoura cirúrgica, pinça clínica pediátrica, pinça Dietrich, Hollembach 3 e 3S e cureta de Lucas. A **fig. 1C** mostra o animal em decúbito ventral, pronto para inicializar o procedimento cirúrgico. Na **fig. 1D**, incisão e posterior divulsão dos tecidos para criar uma loja/bolsa cirúrgica para inserção do implante. A **fig 1E** mostra o momento da inserção do tubo de polietileno na região dorsal. A **fig. 1F** mostra o tubo implantado no subcutâneo (seta). Na **fig. 1G** mostra o local suturado com ponto simples, finalizando o procedimento cirúrgico no subcutâneo.





**FIGURAS 2A – 2H** – Seqüência cirúrgica da inserção do implante no alvéolo dentário do rato. A **fig. 2A** mostra o animal em decúbito dorsal, mantendo-se a cavidade oral aberta com o auxílio de uma gaze presa aos incisivos inferiores. Na **fig. 2B** está sendo realizada a sindesmotomia e luxação do incisivo superior esquerdo com o auxílio do Holleback 3 e 3S. A **fig. 2C** mostra o grau de luxação obtido no elemento dental. A **fig. 2D** detalha a exodontia propriamente dita com o auxílio de uma pinça hemostática curva. A **fig. 2E** mostra o elemento dental removido. Na **fig. 2F**, detalhe do alvéolo após a exodontia do elemento dental sem curetagem do alvéolo. A **fig. 2G** mostra a inserção do tubo de polietileno no alvéolo com o auxílio de uma pinça clínica pediátrica. Na **fig. 2H** mostra o local suturado com um ponto simples finalizando o procedimento cirúrgico.



## **4.2 Processamento Histológico**

Decorrido os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, os animais de cada grupo foram sacrificados com 600mg/kg de hidrato de cloral (Vetec, Duque de Caxias – RJ, Brasil). Os tubos implantados no subcutâneo da região dorsal, juntamente com os tecidos adjacentes foram removidos e fixados em formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2. Após 48 horas de fixação, as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina, para obtenção de cortes longitudinais dos implantes no subcutâneo.

Em relação aos implantes alveolares, as porções das maxilas contendo os implantes foram removidas, reduzidas e imediatamente colocadas em formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M e pH ajustado para 7,2. Após 48 horas de fixação, os espécimes foram descalcificados em EDTA 7% tamponado com fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2), durante aproximadamente 60 dias. Posteriormente, os fragmentos foram lavados em água corrente, desidratados em etanol, diafanizados em xilol, e embebidos em parafina; as peças foram incluídas de maneira a obter cortes sagitais do alvéolo dentário com o implante.

Após a inclusão em parafina, os tubos foram removidos e com o auxílio de um micrótomo (Microm, modelo HM 325) foram obtidos cortes sagitais, com 6µm de espessura, dos implantes com os tecidos adjacentes.

### **4.3 Forma de Análise**

#### **4.3.1 Análise Morfológica e Morfométrica**

##### ***- Análise Morfológica***

Os cortes semi-seriados dos fragmentos oriundos dos implantes do subcutâneo e do alvéolo foram aderidos às lâminas de vidro e corados com Hematoxilina & Eosina (H&E). Estes cortes corados com H&E foram utilizados para a descrição morfológica e morfométrica da resposta tecidual nas regiões adjacentes ao material implantado.

Na análise morfológica, foi avaliada a presença de células inflamatórias e células gigantes multinucleadas, o tipo de cápsula e presença de partículas do material dispersas na cápsula formada adjacente à superfície do implante.

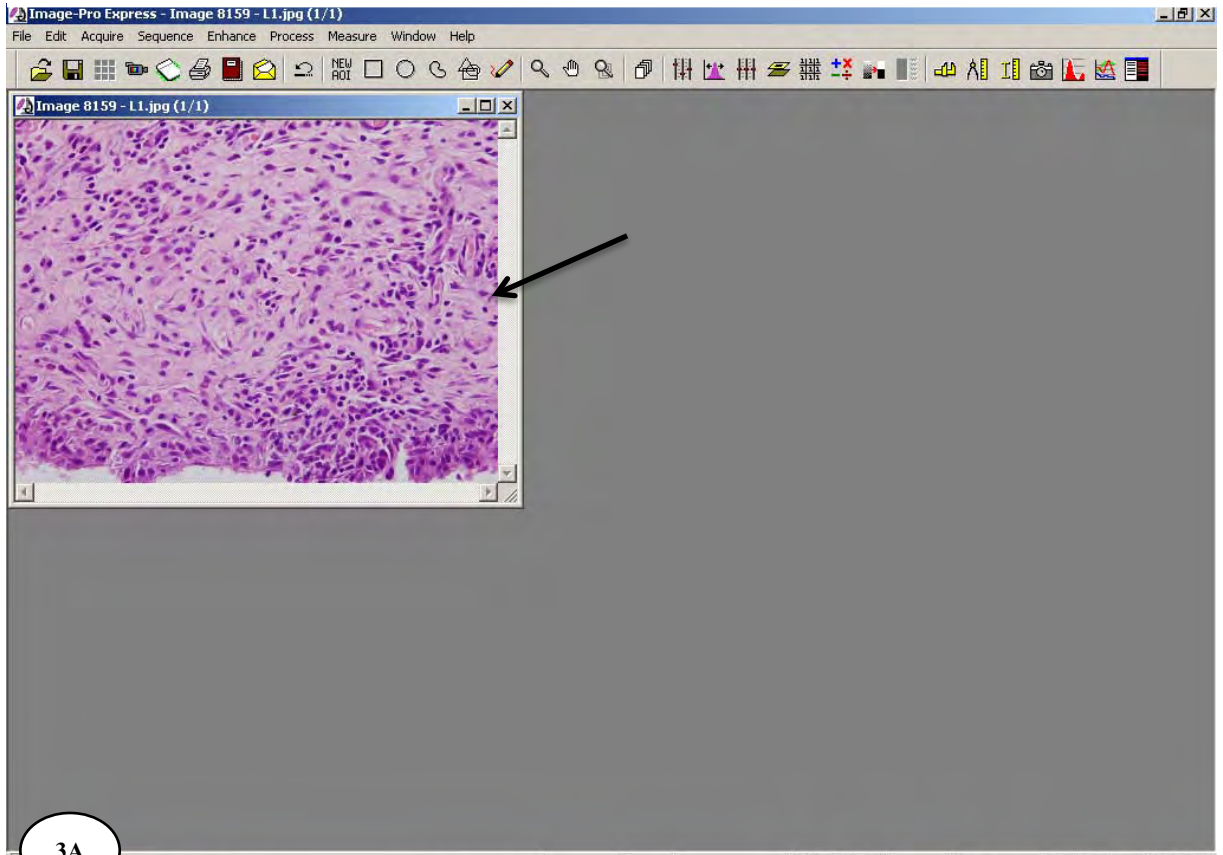
##### ***- Análise Morfométrica***

Com o objetivo de avaliar a reação inflamatória, o número de células inflamatórias situadas no tecido adjacente ao material implantado, tanto no subcutâneo como no interior do alvéolo foi estimado. A quantificação de células inflamatórias foi realizada a partir dos cortes corados com H&E. Foram quantificados três cortes de cada local (03 cortes do subcutâneo e 03 do alvéolo) por animal, mantendo-se um intervalo mínimo de 100 µm entre os cortes. Com auxílio de uma câmera (DP-71, Olympus – Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus, modelo BX-51), em aumento de 40X, imagens do tecido adjacente aos materiais implantados foram capturadas. Posteriormente, com um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus – Japão), foi realizada a contagem de células inflamatórias em cada corte, numa área teste de aproximadamente 0,09mm<sup>2</sup> do tecido adjacente ao material implantado (Figuras

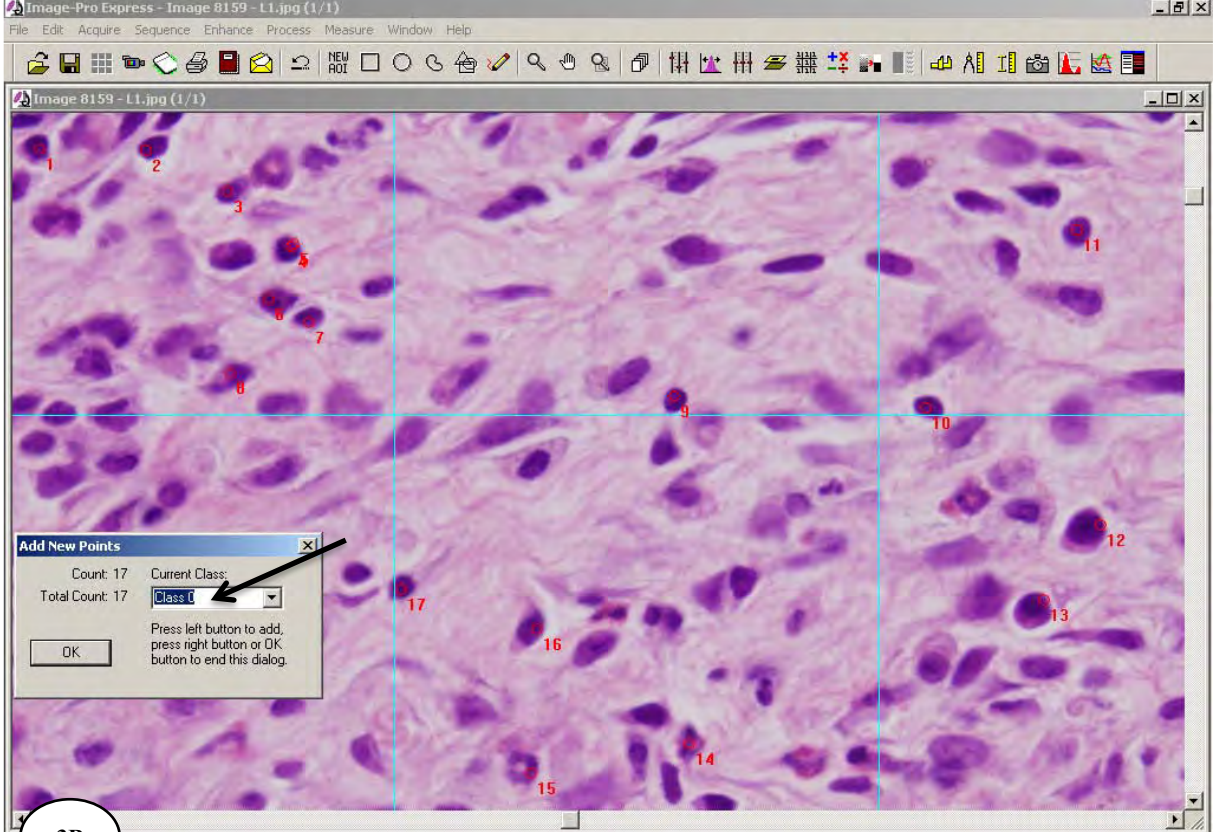
3A e 3B). O valor total de células inflamatórias computado de cada implante (obtido a partir das áreas dos três cortes) foi dividido pela área total ( $0,27\text{mm}^2$ ) obtendo-se, assim, um valor de células inflamatórias/ $\text{mm}^2$ . Ao final, foi estabelecida uma média para cada grupo experimental de acordo com o período experimental e o material estudado.

Os resultados obtidos pela análise morfométrica foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA). Aos dados foi aplicado o teste estatístico paramétrico ANOVA, o qual comparou os diferentes grupos entre si dentro de cada período experimental; quando observada diferença significativa em nível de 5%, foi realizada a comparação entre os materiais pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Em alguns casos, quando ocorreu falha da normalidade, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação dos materiais. Quando os dados apresentaram diferença significativa em nível de 5%, foi realizada a comparação entre os grupos, dois a dois, pelo teste de Dunn.

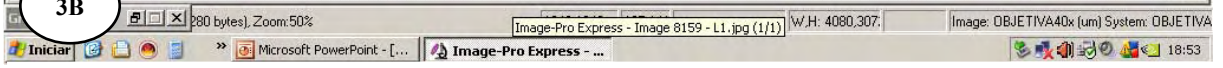
**FIGURAS 3A - 3B** – Imagens do programa Image – Pro Express 6.0, Olympus – Japão, utilizado para quantificação das células inflamatórias. A **fig. 3A** mostra a tela inicial do programa, na tela menor (seta) a imagem que será analisada. Na **fig. 3B** mostra a imagem ampliada através do zoom, com uma grade aplicada sobre ela para orientar durante a quantificação das células. Na janela lateral (seta) quantificação das células inflamatórias, as quais também são demarcadas na própria imagem.



3A



3B



#### **4.3.2 Imuno-histoquímica para detecção de osteopontina e osteocalcina**

Cortes aderidos às lâminas silanizadas dos implantes no subcutâneo e no alvéolo dentário, foram desparafinizados e hidratados. Em seguida, os cortes foram incubados com 1% de Soro Albumina Bovino (BSA) contendo 1% de Triton-X 100 (Sigma-Aldrich, Alemanha) para recuperação antigênica, durante uma hora, em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram mergulhadas no peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 5%, durante 20min, para inativação da peroxidase endógena. Subsequentemente às lavagens com tampão fosfato de sódio (PBS 50mM + 200mM NaCl pH 7,3), os cortes foram incubados com soro bovino a 2% (BSA), durante 30min. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-osteopontina humana (R&D Systems, Minneapolis, USA) produzida em camundongo ou em anti-osteocalcina humana (R&D Systems, Minneapolis, USA) também produzida em camundongo, ambas diluídas em tampão fosfato de sódio (PBS 50mM + 200mM NaCl pH 7,3), na titulação de 1:200 e 1:150, respectivamente. Após a incubação durante aproximadamente 16 horas, a temperatura de 4°C, os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo (*Kit Vectastain ABC system, Vector laboratories Inc., USA*) por 35 min, a temperatura ambiente. Subseqüentemente a lavagem em PBS, os cortes foram incubados com o complexo avidina-biotina (ABC kit - Vector Laboratories Inc., USA) durante 35 min. Posteriormente à lavagem em tampão, a reação foi revelada com 0,06% de DAB (3,3´ - diaminobenzidin, Sigma-Aldrich, Alemanha) diluída em tampão fosfato de sódio e os cortes foram, então, contracolorados com



hematoxilina de Carazzi e montados em meio resinoso (*Permunt®*, *Fisher Scientific, New Jersey, USA*). Como controle negativo, alguns cortes contendo os implantes no subcutâneo e no alvéolo dentário foram submetidos ao mesmo procedimento, porém, os cortes foram incubados em soro bovino sem o anticorpo primário.

#### **4.3.3 Técnica de von Kossa**

Cortes dos fragmentos dos implantes no subcutâneo foram também submetidos à técnica de von Kossa, para detectar uma possível precipitação de fosfato no tecido adjacente ao material<sup>9, 60</sup>. Após desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos na solução de Nitrato de Prata a 5%, durante 1 hora, sob a ação de uma lâmpada incandescente (100 Watts). As lâminas foram lavadas em água destilada por 3 min e em seguida, imersas em solução de Hipossulfito de Sódio a 5% por 5 min. Em seguida, os cortes foram novamente lavados em água destilada por 5 min e então corados pelo Picrosirius e montados em meio resinoso (*Permunt®*, *Fisher Scientific, New Jersey, USA*).

Cortes de tíbia de camundongos recém-nascidos foram utilizados como controle positivo da reação de von Kossa. Como controle negativo, alguns cortes dos implantes no subcutâneo, após a desparafinização e hidratação foram descalcificados em solução de EDTA a 7% durante, aproximadamente 16 horas, e submetidos ao método de von Kossa.

***RESULTADO***

## **5 Resultado**

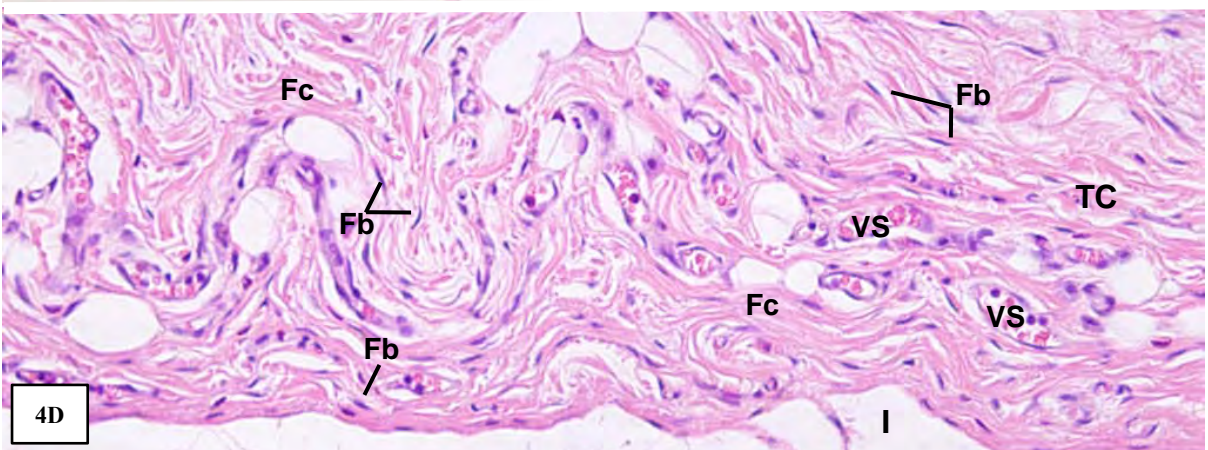
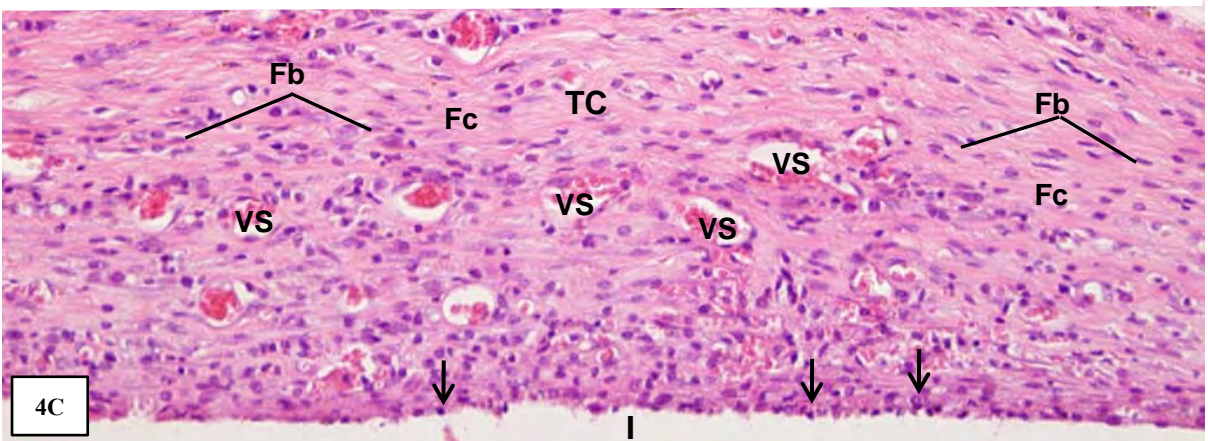
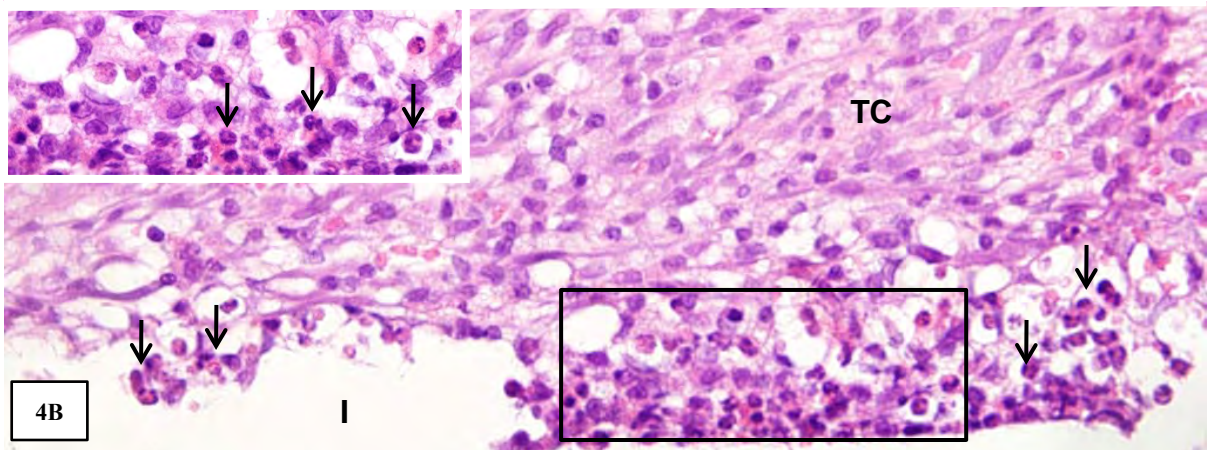
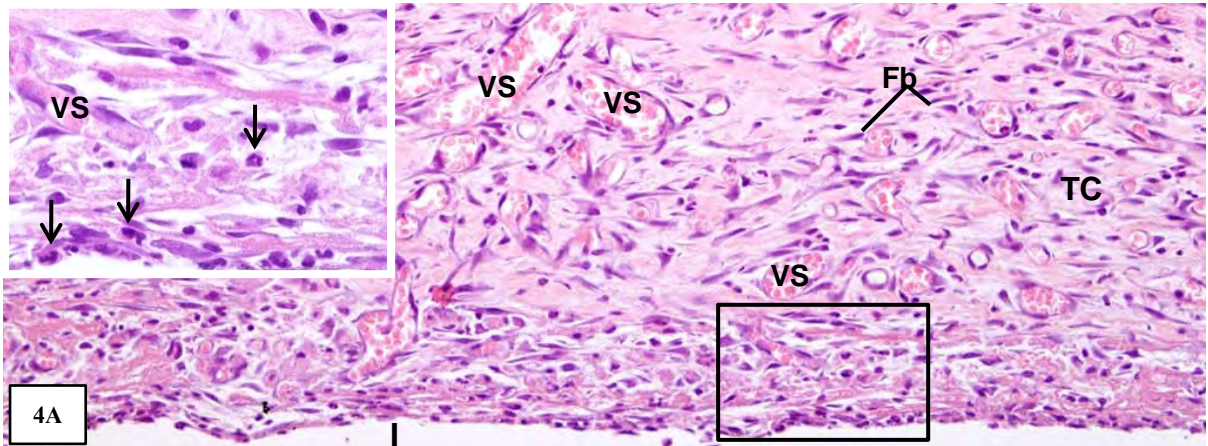
### **5.1 Implantes no subcutâneo**

#### **- Análise morfológica, imuno-histoquímica e von Kossa**

##### ***Grupo Controle***

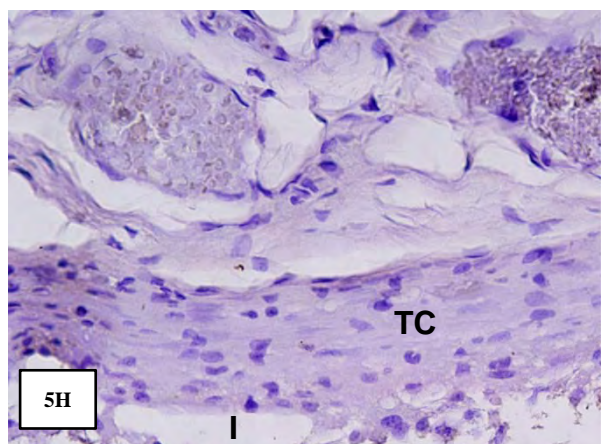
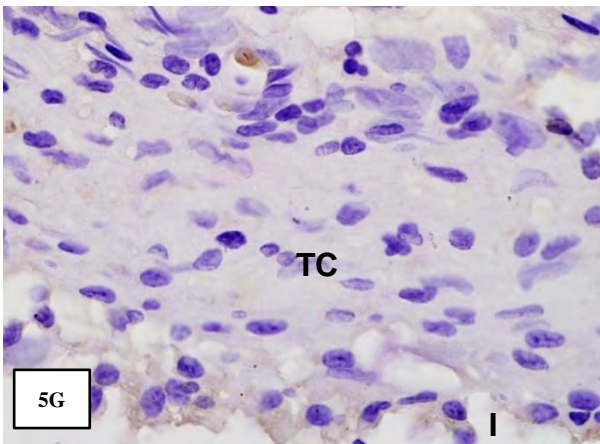
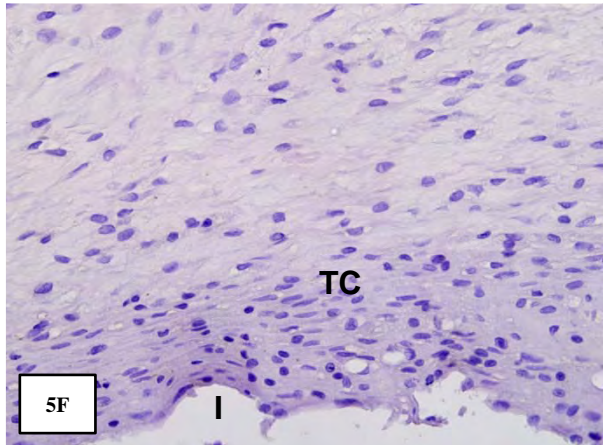
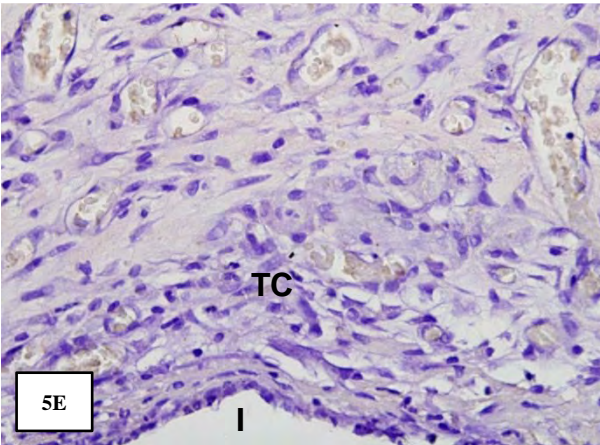
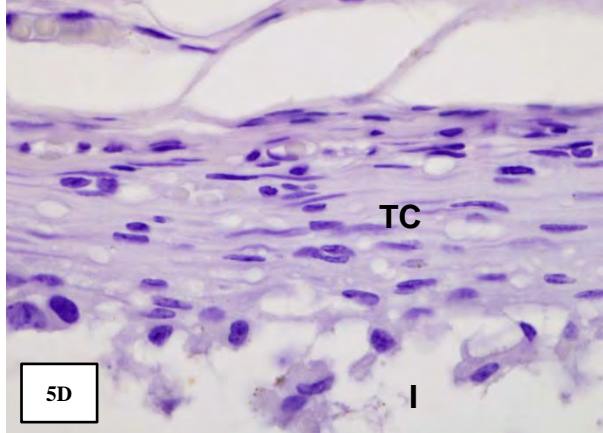
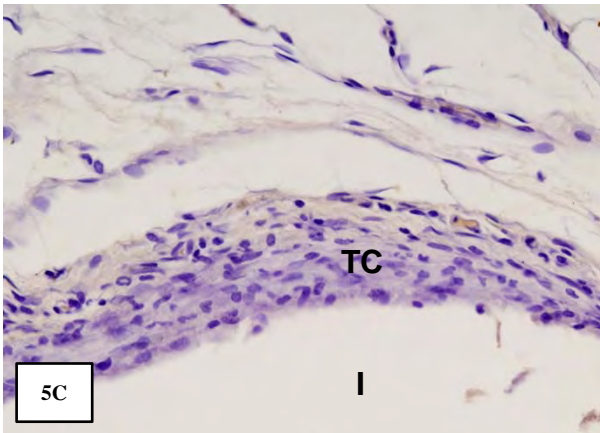
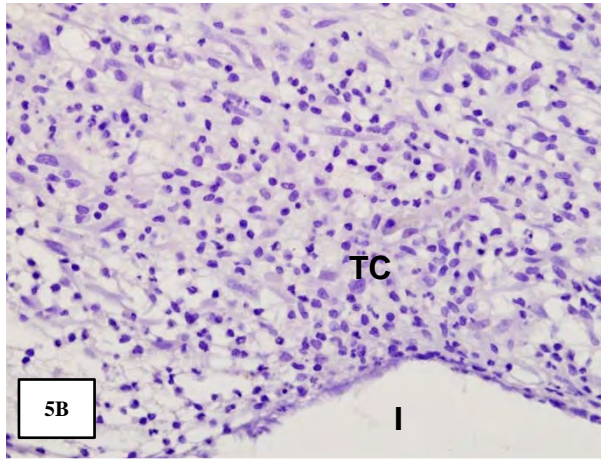
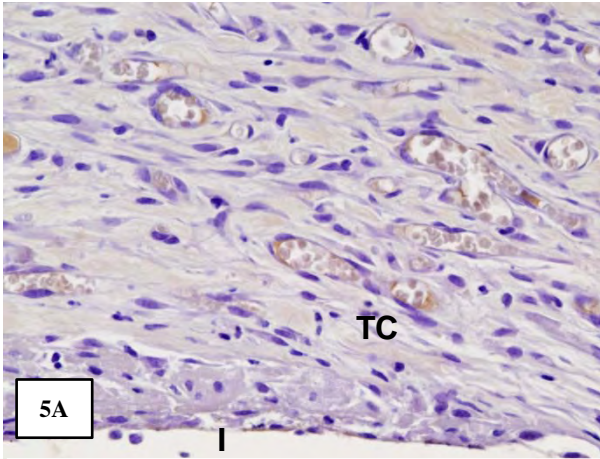
A análise morfológica revelou que, aos 7 dias, o tecido conjuntivo o qual circundava a extremidade dos tubos de polietileno exibiu duas porções distintas: uma porção interna, intimamente associada à luz do tubo, e uma porção externa. O tecido conjuntivo da porção interna da cápsula mostrou diversas células inflamatórias, em sua maior parte neutrófilos, e grande quantidade de vasos sanguíneos. Na porção externa, a cápsula exibiu numerosos fibroblastos entre feixes de fibras colágenas e escassas células inflamatórias (Figura 4A). No período de 14 dias, a cápsula de tecido conjuntivo ainda apresentava inúmeras células inflamatórias, principalmente neutrófilos, situados na porção da cápsula, adjacente a luz do tubo implantado (Figura 4B). Aos 30 dias, uma aparente redução do processo inflamatório foi observada na cápsula a qual circundava a extremidade do tubo; as escassas células inflamatórias estavam situadas, principalmente, na superfície interna da cápsula, ou seja, voltada para a luz do tubo de polietileno. Além disso, o tecido conjuntivo junto à extremidade do tubo, altamente vascularizado, apresentava fibroblastos situados entre feixes de fibras colágenas (Figura 4C). Após 60 dias ao implante, a cápsula estava constituída por um tecido conjuntivo organizado exibindo diversos fibroblastos entre os vários feixes de fibras colágenas, além de apresentar vasos sanguíneos (Figura 4D).

**FIGURAS 4A – 4D** – Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes com os tubos vazios (Grupo Controle), as quais foram coradas com H&E. **Fig. 4A** (7dias) – a cápsula (TC), adjacente à luz do tubo implantado (I), é constituída por um tecido conjuntivo contendo inúmeros vasos sanguíneos (VS). Na porção interna da cápsula, diversos neutrófilos (setas) estão situados entre os vasos sanguíneos (VS), como pode ser observado no *inset*. O tecido conjuntivo (TC) na porção externa da cápsula exhibe numerosos fibroblastos (Fb). 260x; *inset*: 520x. **Fig. 4B** (14 dias) – o tecido conjuntivo (TC) adjacente ao tubo implantado (I) contém inúmeras células inflamatórias (setas), na porção interna da cápsula. 395x. O *inset*, maior aumento da área demarcada, mostra vários neutrófilos (setas) situados na porção da cápsula adjacente à luz do tubo implantado. 610x. Na **fig. 4C** (30 dias), a cápsula de tecido conjuntivo (TC) adjacente ao implante (I), apresenta-se com muitos vasos sanguíneos (VS) e escassas células inflamatórias (setas) situadas, principalmente, junto à luz do tubo implantado. Diversos fibroblastos (Fb) estão dispostos entre os feixes de fibras colágenas (Fc). 280x. **Fig. 4D** (60 dias) – mostra a cápsula constituída por um tecido conjuntivo (TC) adjacente ao implante (I), exibindo diversos fibroblastos (Fb) entre os feixes de fibras colágenas (Fc). VS, vasos sanguíneos. 300x.



Os cortes dos implantes no subcutâneo submetidos às reações imuno-histoquímicas para detecção de osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN) não apresentaram células imuno-positivas para OPN (Figuras 5A-5D) e para OCN (Figuras 5E-5H) na cápsula adjacente as extremidades dos tubos de polietileno, nos diferentes períodos. Além disso, estruturas positivas ao von Kossa também não foram observadas na cápsula adjacente aos implantes dos tubos de polietileno no subcutâneo (dados não ilustrados).

**FIGURAS 5A - 5H** – Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes do grupo controle (tubo de polietileno vazio), as quais foram submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de OPN (Figs. 5A-5D) e OCN (Figs. 5E-5H) e contracoradas com hematoxilina. As **figs. 5A, 5B, 5C e 5D** mostram as células do tecido conjuntivo (TC) adjacente à luz do tubo (I) negativas a imuno-histoquímica para detecção de OPN, nos períodos de 7, 14, 30 e 60 dias após ao implante, respectivamente. Fig. 5A: 260x; Fig. 5B: 220x; Fig. 5C: 210x; Fig. 5D: 660x. As **figs. 5E (7 dias), 5F (14 dias), 5G (30 dias) e 5H (60 dias)** mostram porções da cápsula de tecido conjuntivo (TC) adjacente à luz do tubo implantado (I) exibindo células negativas a imuno-histoquímica para detecção de OCN. Fig. 5E: 230x; Fig. 5F: 200x; Fig. 5G: 200x; Fig. 5H: 270x.

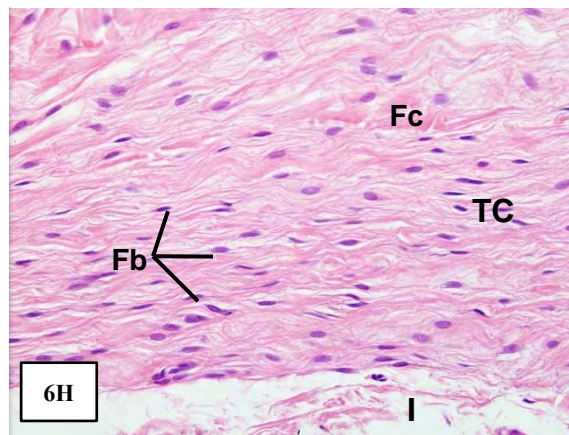
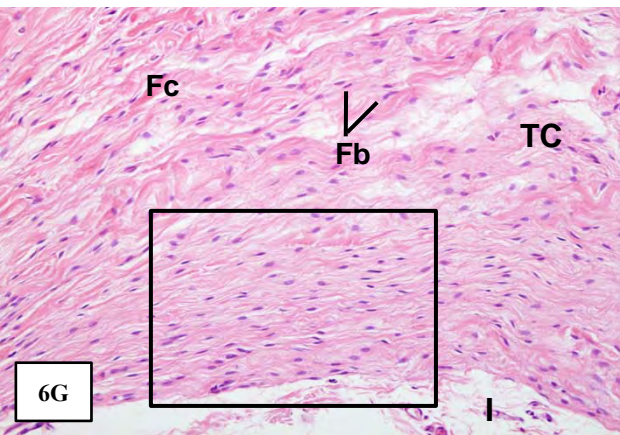
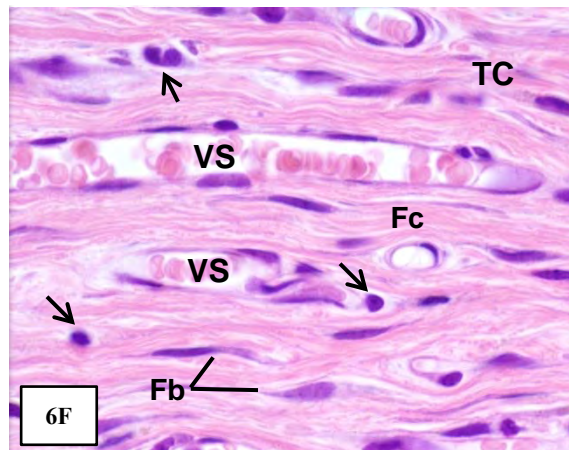
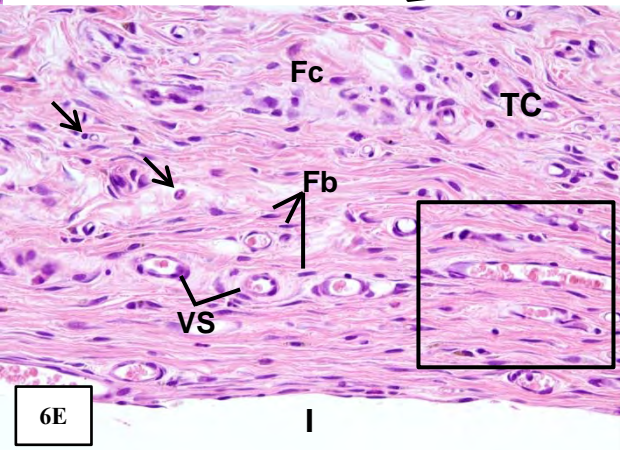
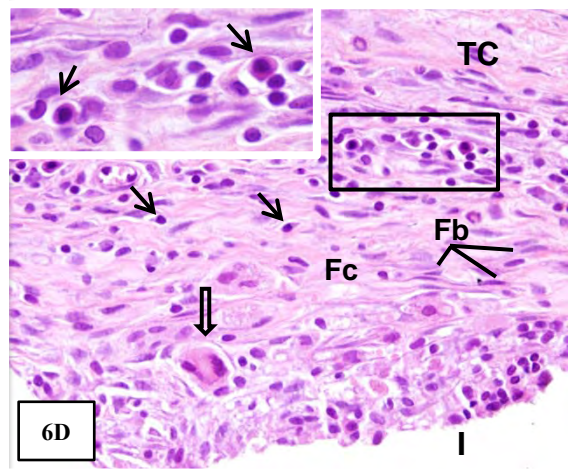
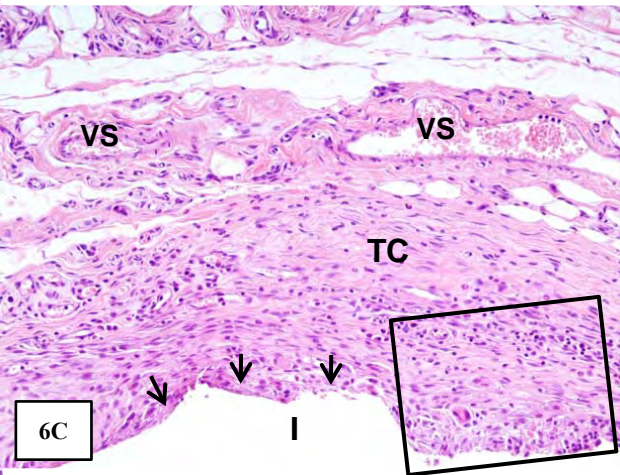
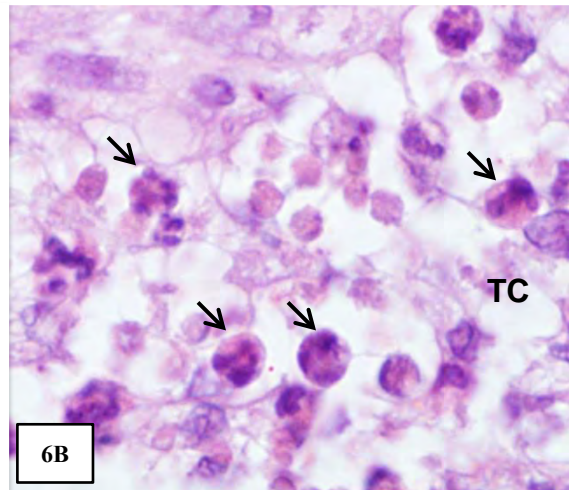
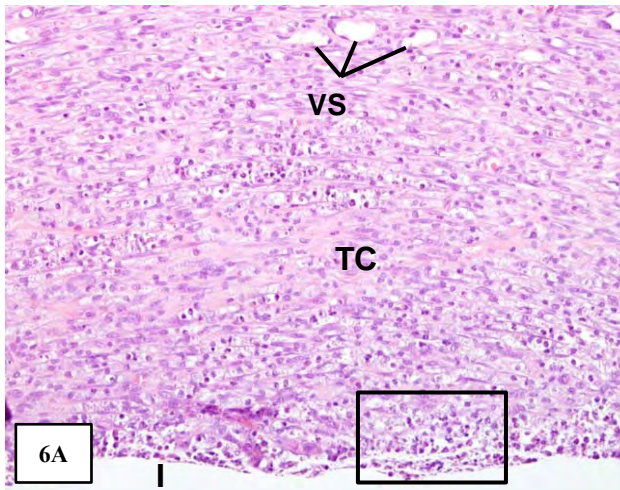




**Grupo CP**

Aos 7 dias, o grupo CP apresentou a porção interna da cápsula de tecido conjuntivo exibindo diversas células polimorfonucleares, com predomínio de neutrófilos, principalmente na extremidade adjacente ao material implantado; em sua porção externa, a cápsula apresentou um grande número de vasos sanguíneos em meio aos feixes de fibras colágenas (Figuras 6A e 6B). Uma espessa cápsula de tecido conjuntivo altamente vascularizado foi verificada aos 14 dias após o implante; frequentemente, a superfície interna da cápsula, adjacente ao espaço preenchido com o CP, apresentava-se irregular (Figura 6C). Embora o processo inflamatório ainda persistisse, as células inflamatórias geralmente apresentavam-se agrupadas em determinadas áreas da cápsula; além disso, evidente predomínio de linfócitos e macrófagos foi verificado em comparação as demais células inflamatórias. Células gigantes multinucleadas foram também observadas entre os fibroblastos e as fibras colágenas da cápsula (Figura 6D). Aos 30 dias, diversos fibroblastos, exibindo núcleo com cromatina frouxa indicativa de células em atividade de síntese, foram observados na cápsula; por outro lado, escassas células inflamatórias, geralmente situadas próximas aos vasos sanguíneos, foram encontradas (Figuras 6E e 6F). Geralmente, no período de 60 dias, a cápsula apresentou-se constituída por um tecido conjuntivo denso, isto é, contendo predomínio de fibras colágenas, envolvendo a extremidade do tubo preenchido com o CP; células inflamatórias estavam praticamente ausentes, inclusive na porção interna da cápsula, adjacente ao material implantado (Figuras 6G-6H).

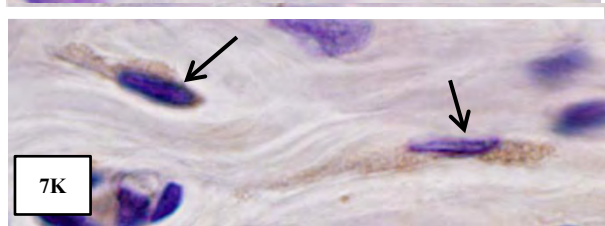
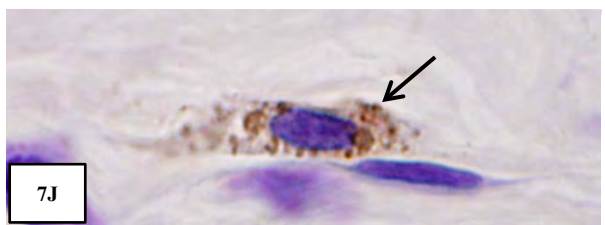
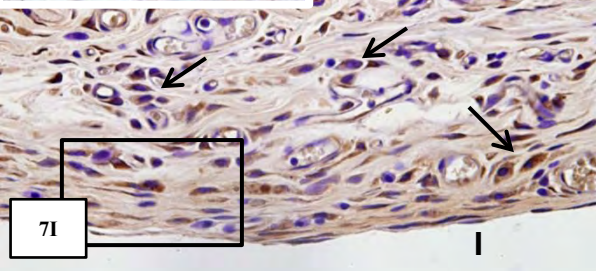
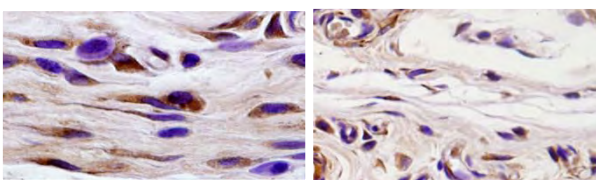
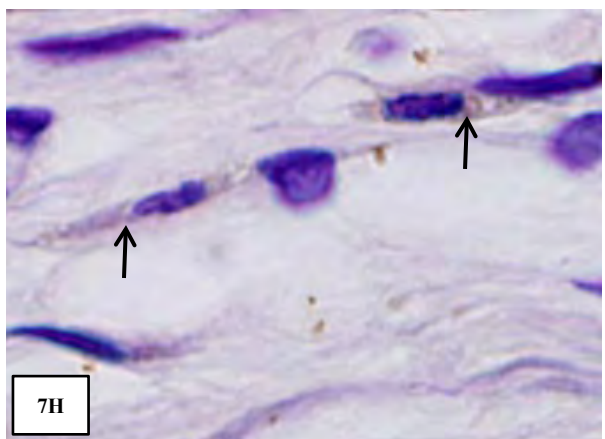
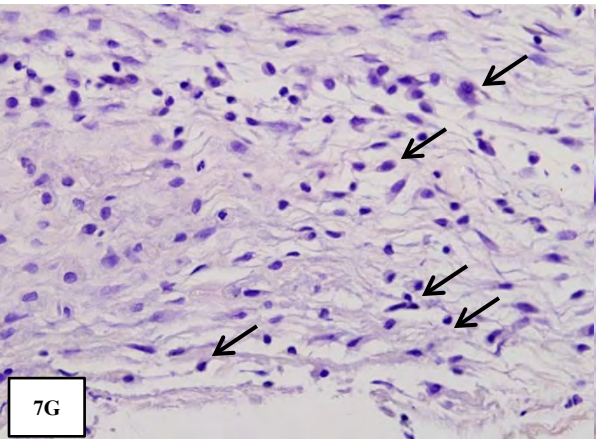
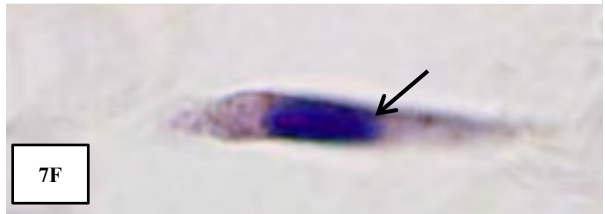
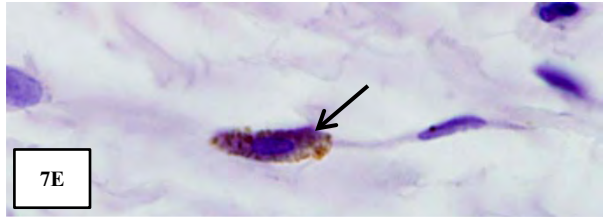
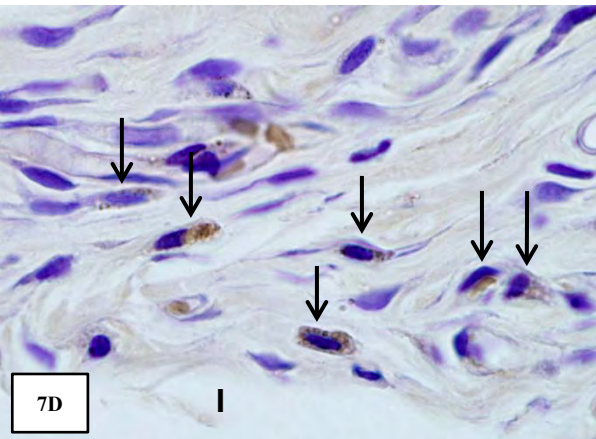
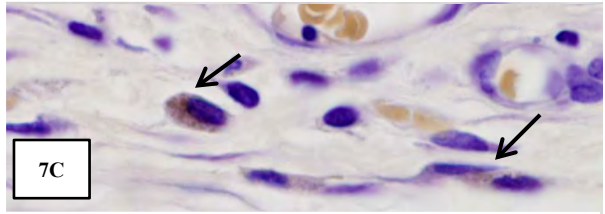
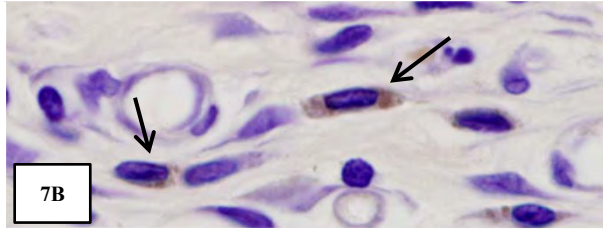
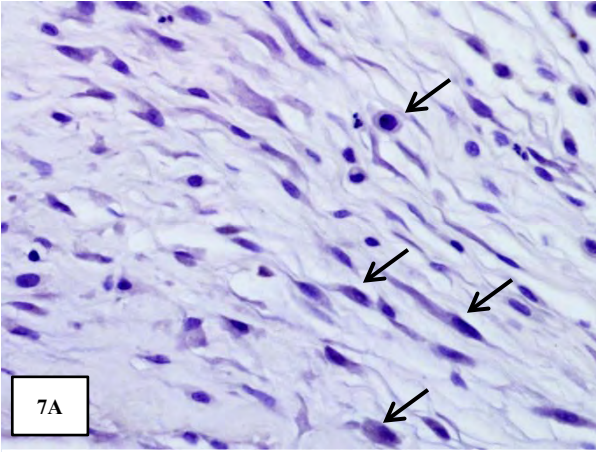
**FIGURAS 6A – 6H** – Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes com cimento Portland (CP), as quais foram coradas com H&E. A **fig. 6A** mostra a cápsula de tecido conjuntivo (TC) adjacente à luz do tubo implantado (I), após 7 dias. A porção interna da cápsula exhibe diversos polimorfonucleares adjacentes ao espaço do material implantado (I). O tecido conjuntivo da porção externa da cápsula exhibe um grande número de vasos sanguíneos (VS). 135x. A **fig. 6B**, área demarcada na fig. 6A, mostra a extremidade da cápsula (TC) adjacente ao material implantado, com presença predominante de neutrófilos (setas). 1440x. **Fig 6C (14 dias)** – mostra uma espessa cápsula de tecido conjuntivo (TC) junto à extremidade do tubo implantado (I). A superfície da cápsula adjacente ao cimento CP apresenta-se irregular (setas); na porção interna da cápsula, o tecido conjuntivo apresenta alguns fibroblastos e fibras colágenas circundando a extremidade do tubo (I). A porção mais externa da cápsula contém vasos sanguíneos com luz evidente (VS) 135x. A **fig. 6D**, área demarcada da fig. 6C, mostra a porção interna da cápsula exibindo diversas células inflamatórias (setas) e célula multinucleada gigante (seta vazada) entre os fibroblastos (Fb) e fibras colágenas (Fc). O *inset*, mostra em maior aumento, células inflamatórias mononucleadas (setas), principalmente macrófagos e linfócitos, situadas na cápsula. 260x; *Inset*: 635x. A **fig. 6E** mostra a cápsula de tecido conjuntivo (TC) adjacente à luz do tubo implantado (I), após 30 dias. A cápsula exhibe escassas células inflamatórias (setas) entre os fibroblastos (Fb) e os evidentes feixes de fibras colágenas (Fc); o tecido conjuntivo contém vários vasos sanguíneos (VS). 205x. A **fig. 6F**, área demarcada em 6E, mostra a abundante quantidade de fibras colágenas (Fc) entre os fibroblastos (Fb) e vasos sanguíneos (VS); escassas células inflamatórias (setas), próximas aos vasos sanguíneos (VS), são observadas. 610x. **Fig. 6G (60 dias)** – mostra a cápsula (TC) adjacente ao material implantado (I) constituída por tecido conjuntivo com grande quantidade de fibras colágenas (Fc) e fibroblastos (Fb). 135x. Na **fig. 6H**, detalhe da área demarcada na fig. 5G, mostra a porção interna da cápsula (TC) exibindo diversos fibroblastos (Fb) entre os feixes de fibras colágenas (Fc); note a ausência de células inflamatórias nesta porção da cápsula. I, espaço do tubo implantado. 190x.



A reação imuno-histoquímica para OPN mostrou a cápsula de tecido conjuntivo com células negativas, aos 7 dias após o implante (Figura 7A); aos 14 dias, alguns fibroblastos do tecido conjuntivo, adjacente ao material implantado, mostraram citoplasma corado em castanho, ou seja, positivos à imuno-reação para detecção de OPN (Figuras 7B e 7C); aos 30 e 60 dias, forte imuno-marcação para OPN foi frequentemente detectada em diversos fibroblastos da cápsula adjacente ao material implantado (Figuras 7D-7F). A expressão de OCN nas células da cápsula de tecido conjuntivo, também, foi negativa no período de 7 dias (Figura 7G); aos 14 dias, ocasionalmente alguns fibroblastos exibiram fraca positividade a reação imuno-histoquímica para detecção de OCN (Figura 7H). No entanto, a cápsula apresentou diversos fibroblastos exibindo forte imuno-marcação à OCN, principalmente, na sua porção mais interna, adjacente ao material após 30 dias ao implante (Figura 7I); no período de 60 dias foi observado uma positividade difusa no citoplasma dos fibroblastos da cápsula adjacente ao material implantado (Figuras 7J e 7K).

Os cortes do subcutâneo contendo os tubos de polietileno com CP submetidos à reação histoquímica de von Kossa exibiram escassas áreas positivas na cápsula adjacente aos implantes (dados não ilustrados).

**FIGURAS 7A - 7K** – Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes com cimento Portland, as quais foram submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de OPN (Figs. 7A–7F) e OCN (Figs. 7G-7K) e contracoradas com hematoxilina. A **fig. 7A** mostra o tecido conjuntivo com células negativas (setas) à imuno-histoquímica para detecção de OPN, após 7 dias ao implante. 275x. As **figs. 7B e 7C** mostram forte marcação citoplasmática nos fibroblastos (setas) presentes na cápsula após 14 dias ao implante. Fig. 7B: 1140x; Fig. 7C: 1010x. Na **fig. 7D**, 30 dias após o implante, diversos fibroblastos exibem positividade à imuno-histoquímica (setas). I, espaço do tubo implantado. 860x. As **figs. 7E e 7F** mostram fibroblastos (setas) exibindo marcação positiva a OPN na cápsula após 60 dias ao implante. Fig. 7E: 1225x; Fig. 7F: 1225x. A **fig. 7G** mostra células negativas a imuno-histoquímica para detecção de OCN (setas) no tecido conjuntivo, após 7 dias ao implante. 220x. Na **Fig. 7H**, período de 14 dias, fibroblastos exibem fraca positividade à imuno-histoquímica (setas). 2140x. Na **fig. 7I**, diversos fibroblastos exibindo positividade à imuno-histoquímica para OCN (setas) estão presentes na cápsula após 30 dias ao implante. Note que a cápsula, próxima ao material implantado (I), exhibe fibroblastos com forte positividade citoplasmática (*inset*). 210x; 490x (*inset*). Nas **figs. 7J e 7K**, difusa imuno-positividade é observada nos fibroblastos da cápsula formada após 60 dias ao implante (setas). Fig. 7J: 1750x; Fig. 7K: 1430x.

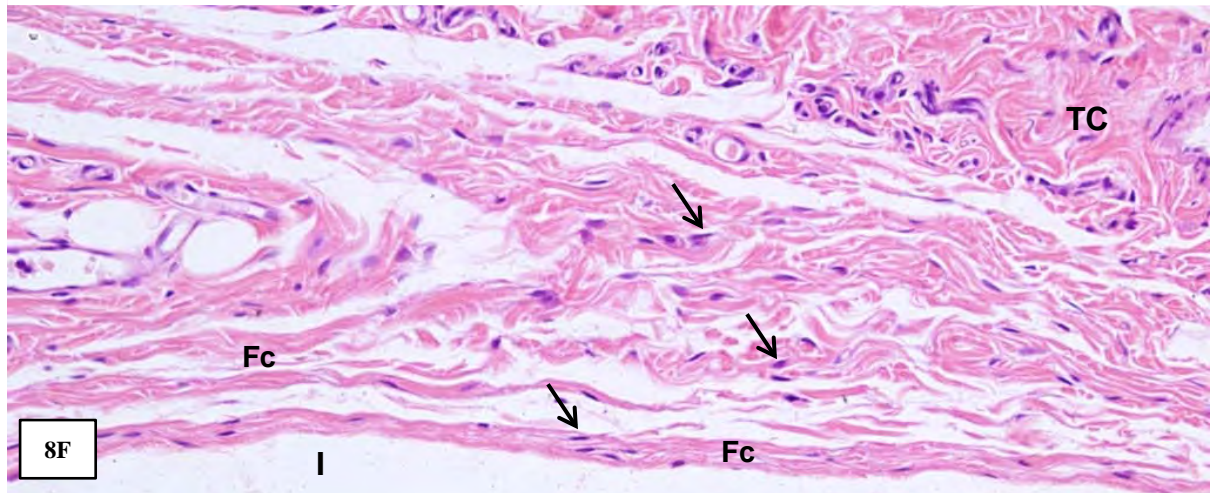
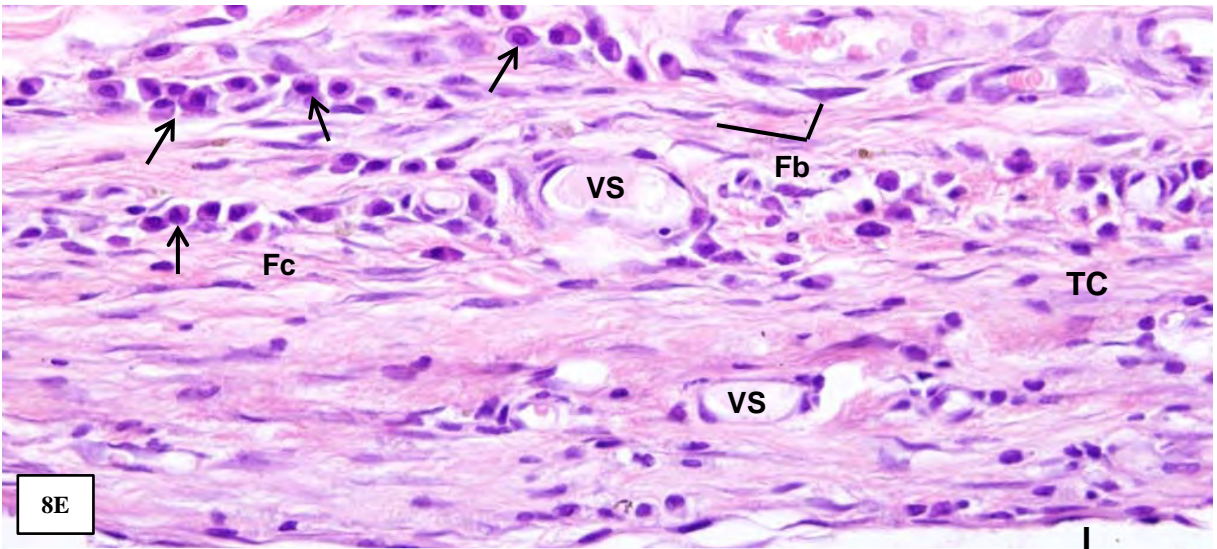
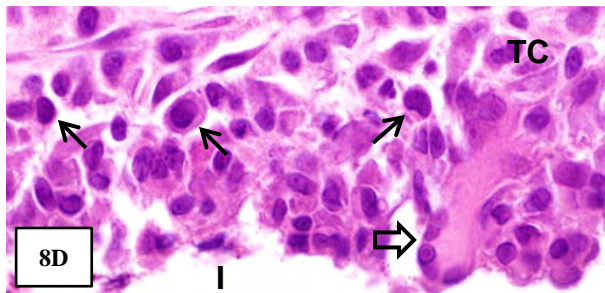
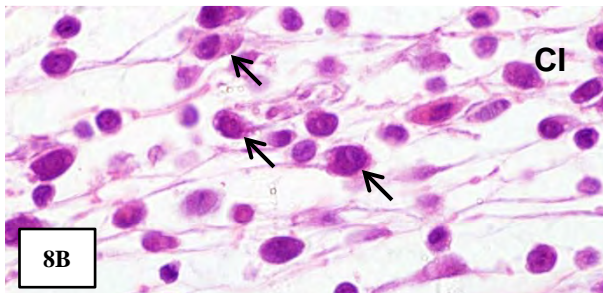
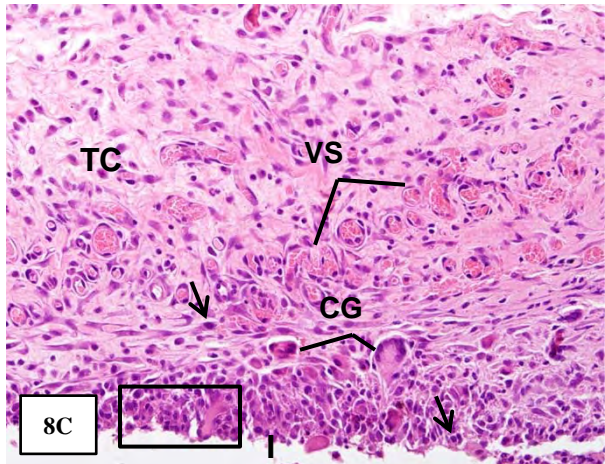
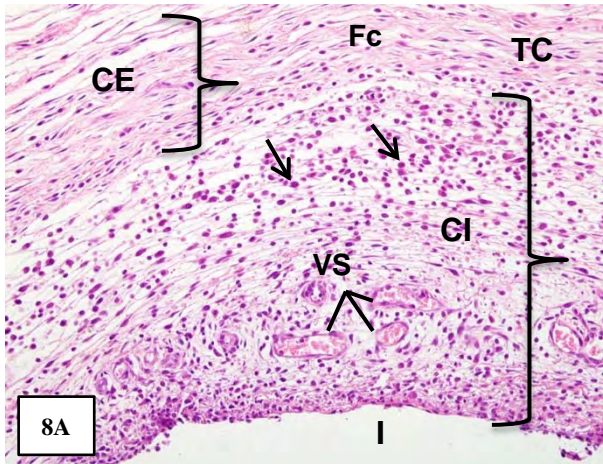


**Grupo MTA**

A análise morfológica dos cortes dos implantes de MTA no subcutâneo revelou que, aos 7 dias, a cápsula, adjacente a extremidade do tubo implantado, exibiu geralmente duas camadas distintas: uma camada interna, ricamente vascularizada, contendo diversos macrófagos e linfócitos entre alguns neutrófilos e um camada externa, na qual o tecido conjuntivo continha diversos fibroblastos entre os feixes de fibras colágenas; nesta porção externa, poucas células inflamatórias foram encontradas (Figuras 8A e 8B). Após 14 dias, a cápsula de tecido conjuntivo mostrou, na sua porção mais interna, diversas células inflamatórias mononucleadas, principalmente macrófagos e linfócitos, e células multinucleadas gigantes em íntimo contato com a superfície do material implantado; em continuidade a esta porção rica em células inflamatórias, numerosos vasos sanguíneos, principalmente capilares, estavam presentes. A cápsula, na sua porção externa, apresentou-se constituída por tecido conjuntivo contendo diversos fibroblastos entre as fibras colágenas (Figura 8C e 8D). A cápsula que envolve a extremidade do tubo com MTA, após 30 dias ao implante, mostrou um tecido conjuntivo contendo muitos fibroblastos, fibras colágenas e vasos sanguíneos. As células inflamatórias, presentes em menor quantidade, estavam agrupadas geralmente próximas aos vasos sanguíneos; neste período, o processo inflamatório apresentou-se, portanto, aparentemente diminuído em relação aos períodos iniciais, e constituído, principalmente, por linfócitos e plasmócitos (Figura 8E). No período de 60 dias, um tecido conjuntivo contendo fibroblastos situados entre os evidentes feixes de fibras colágenas revestia a superfície do tubo de polietileno preenchido com MTA (Figura 8F).

**FIGURAS 8A – 8F** – Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes com cimento MTA, as quais foram coradas com H&E. A **fig. 8A (7 dias)** mostra a cápsula (TC), adjacente à extremidade do tubo implantado (I) exibindo duas camadas distintas: uma porção interna (CI) e uma externa (CE). A camada interna da cápsula (CI) contém diversas células inflamatórias (setas) e vasos sanguíneos (VS); na porção “CE” da cápsula, o tecido conjuntivo apresenta fibroblastos entre os feixes de fibras colágenas (Fc); nesta porção, poucas células inflamatórias são encontradas. 140x. A **fig. 8B (7 dias)** mostra, em maior aumento, células inflamatórias mononucleadas (setas), principalmente macrófagos e linfócitos, na camada interna da cápsula (CI). 705x. A **fig. 8C (14 dias)** mostra a cápsula de tecido conjuntivo (TC) exibindo na sua porção interna diversas células inflamatórias (setas) e células multinucleadas gigantes (CG). Na sua porção externa da cápsula (TC), o tecido conjuntivo apresenta-se ricamente vascularizado (VS). I, espaço do tubo implantado (I). 191x. **Fig. 8D (14 dias)** mostra, em maior aumento, a área demarcada na fig. 8C (TC) evidenciando as células inflamatórias mononucleadas (setas), principalmente macrófagos e linfócitos, e uma célula multinucleada gigante (seta vazada). 745x. Na **fig. 8E**, a cápsula (TC) que envolve a extremidade do tubo com MTA (I), após 30 dias ao implante, é constituída por um tecido conjuntivo contendo fibroblastos (Fb), fibras colágenas (Fc) e presença de vasos sanguíneos (VS). Note que as células inflamatórias (setas) estão agrupadas e estão representadas, principalmente, por linfócitos e plasmócitos. 425x. A **fig. 8F (60 dias)** mostra a cápsula com um tecido conjuntivo organizado (TC) com muitas fibras colágenas (Fc) e fibroblastos (setas). I, espaço do tubo implantado. 310x.



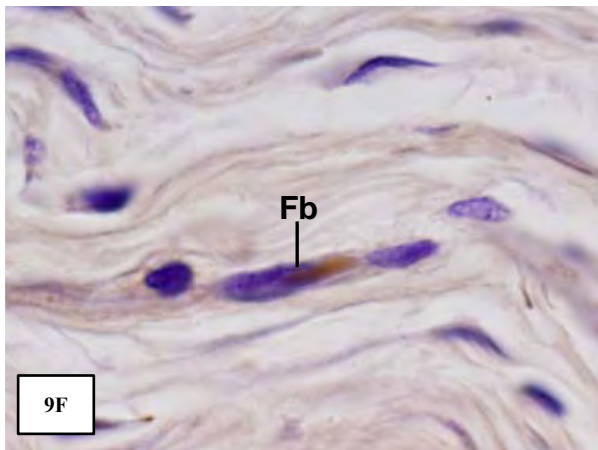
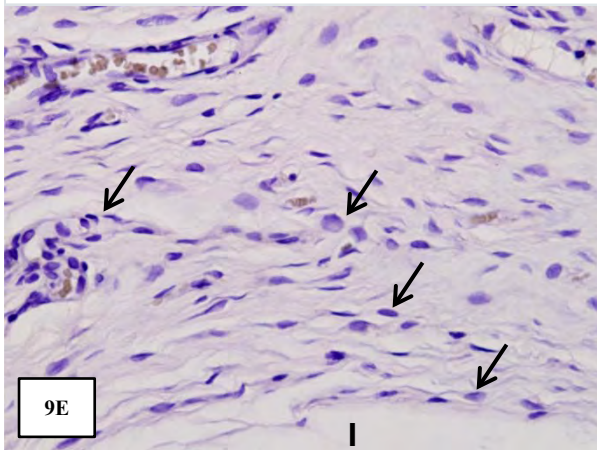
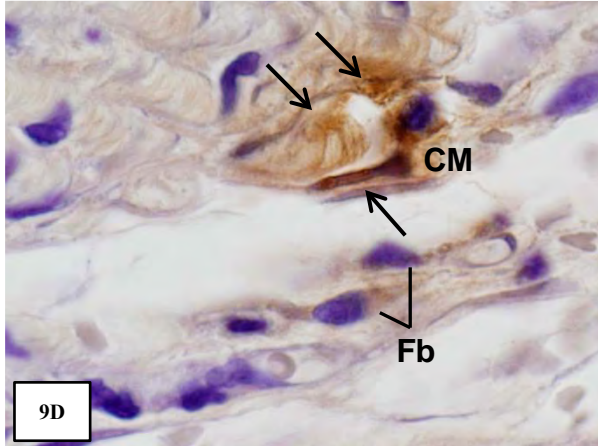
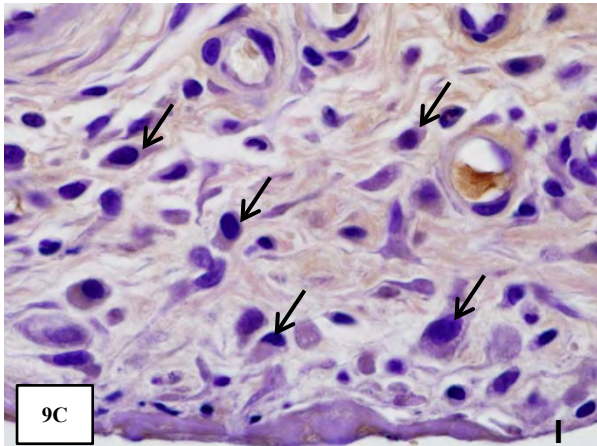
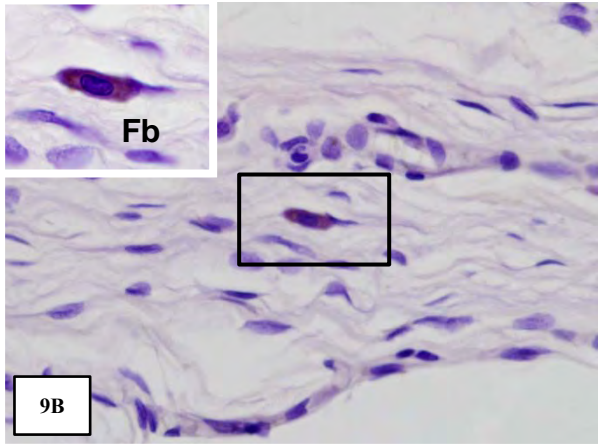
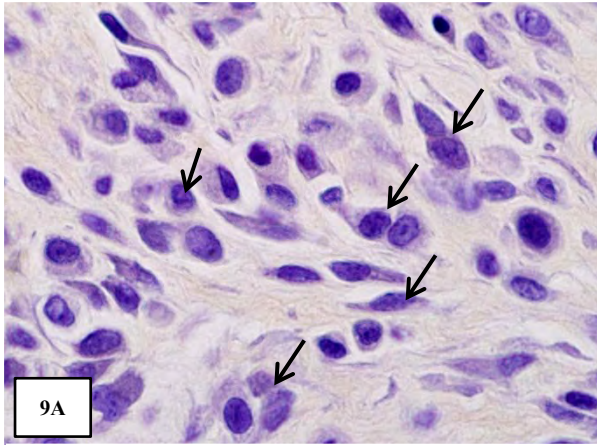


A análise dos cortes de porções do subcutâneo contendo os tubos de polietileno preenchidos com MTA submetidos a reação imuno-histoquímica revelou que aos 7, 14 e 30 dias, as células da cápsula não expressaram imuno-positividade para OPN (Figura 9A). Escassos fibroblastos exibindo forte imuno-positividade citoplasmática foram ocasionalmente observados na cápsula adjacente ao material, após 60 dias ao implante (Figura 9B). Em relação à detecção de OCN, aos 7 dias, as células mostraram-se negativas à reação imuno-histoquímica (Figura 9C). No período de 14 dias, algumas células da cápsula expressaram positividade a OCN; além disso, algumas regiões da matriz extracelular do tecido conjuntivo apresentaram-se fortemente imuno-marcadas (Figura 9D). No entanto, as células foram geralmente negativas à detecção de OCN nos períodos de 30 e 60 dias; raros fibroblastos exibindo imuno-positividade citoplasmática foram encontrados no tecido conjuntivo, adjacente ao material implantado (Figuras 9E e 9F).

Os cortes de porções do subcutâneo contendo os implantes com MTA exibiram áreas positivas ao von Kossa, identificadas como uma precipitação corada em preto (Figuras 12A-12C), semelhante às áreas em calcificação na diáfise do osso longo de camundongo, usado como controle positivo da reação (Figura 12H). Nos períodos de 7 e 14 dias, estruturas extensas com aspecto reticular e fortemente positivas ao von Kossa, coradas em preto, foram observadas na porção mais interna da cápsula, em íntima justaposição à superfície do material (Figuras 12A e 12B). Embora algumas áreas positivas ao von Kossa foram também encontradas aos 30 dias, a positividade geralmente foi restrita a uma

delgada faixa na superfície interna da cápsula em contato com o material (Figura 12C). Depósitos positivos ao von Kossa não foram detectados na cápsula formada após 60 dias aos implantes (dados não ilustrados).

**FIGURAS 9A – 9F** – Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes de MTA, as quais foram submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de OPN (Figs. 9A-9B) e OCN (Figs. 9C-9F) e contracoradas com hematoxilina. A **fig. 10A** mostra células no tecido conjuntivo (setas), após 7 dias ao implante, negativas à imuno-histoquímica. 815x. A **fig. 9 B** mostra um fibroblasto (Fb) exibindo positividade à reação imuno-histoquímica (corado em castanho) no tecido conjuntivo, após 60 dias ao implante. 525x. O *inset*, detalhe da área demarcada, revela o citoplasma do fibroblasto fortemente imuno-positivo à OPN. 860x. A **fig. 9C** mostra as células negativas (setas) à reação para detecção de OCN, no tecido conjuntivo após 7 dias ao implante. I, espaço do tubo implantado. 685x. **Fig. 9D** (período de 14 dias) – forte positividade é observada no citoplasma de uma célula arredondada mononucleada (CM); forte imunomarcação é também observada na matriz extracelular (setas) adjacente à célula “CM”. O fibroblasto (Fb) exibe fraca marcação citoplasmática. 1140x. A **fig. 9E** mostra células negativas à imuno-histoquímica para detecção de OCN (setas), aos 30 dias após o implante. I, espaço do tubo implantado. 525x. A **fig. 9F** (período de 60 dias) mostra marcação positiva à OCN no citoplasma de um fibroblasto (Fb). 1290x.



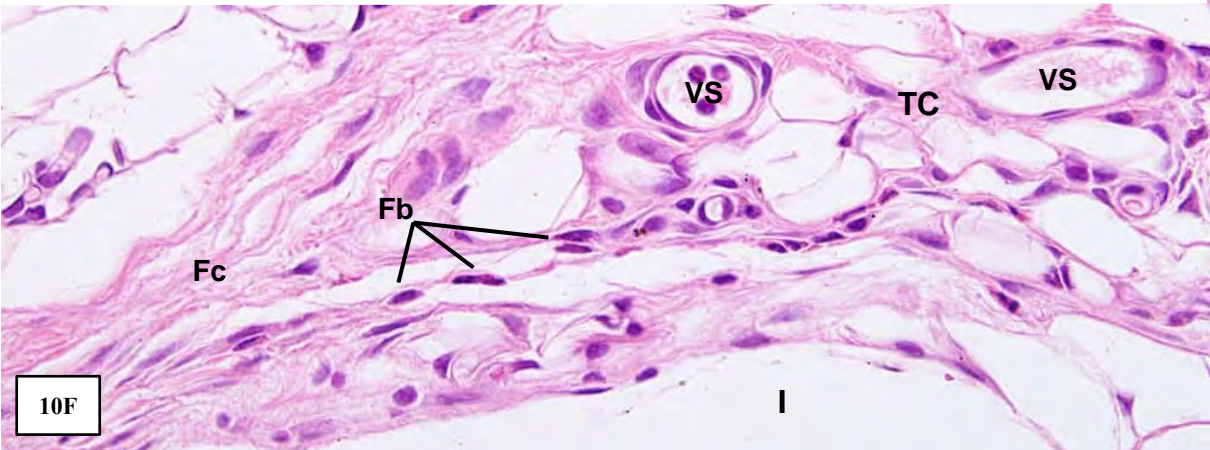
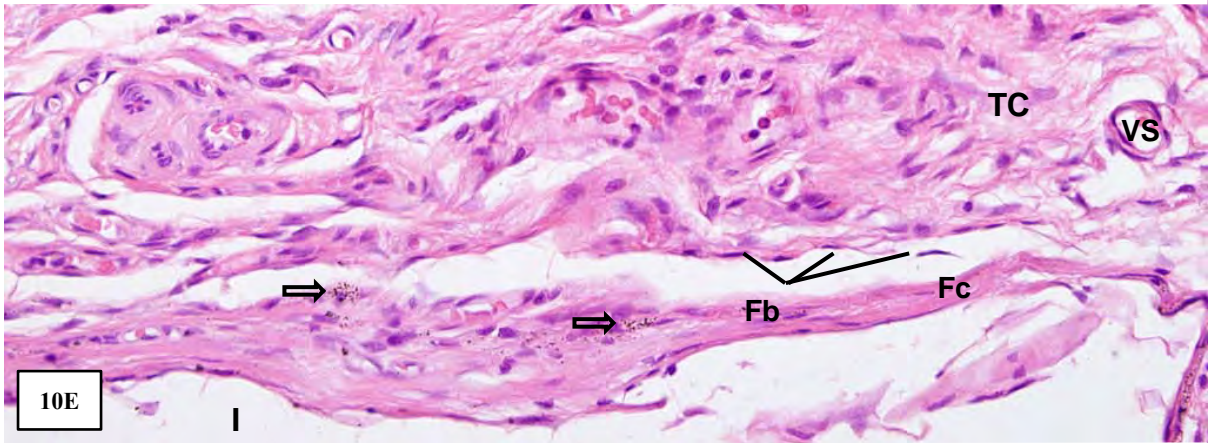
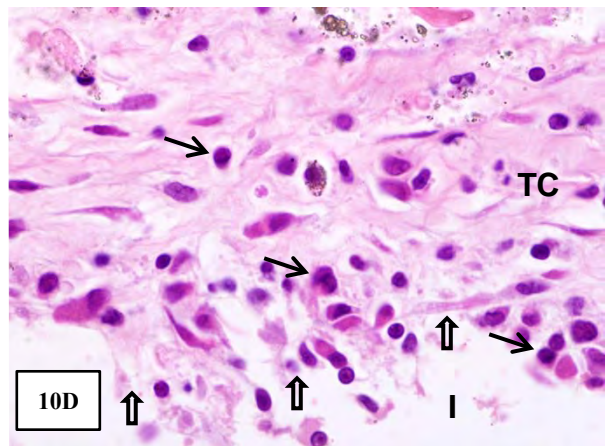
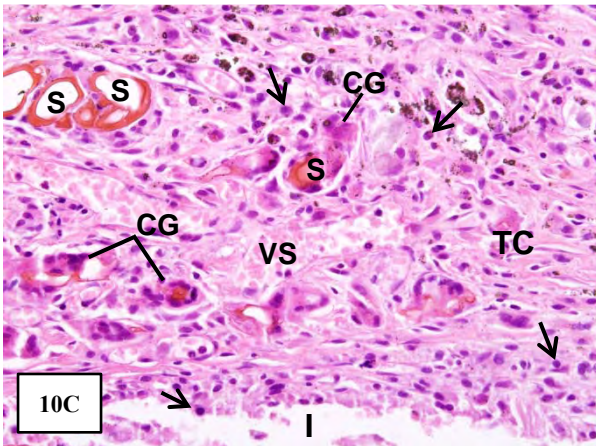
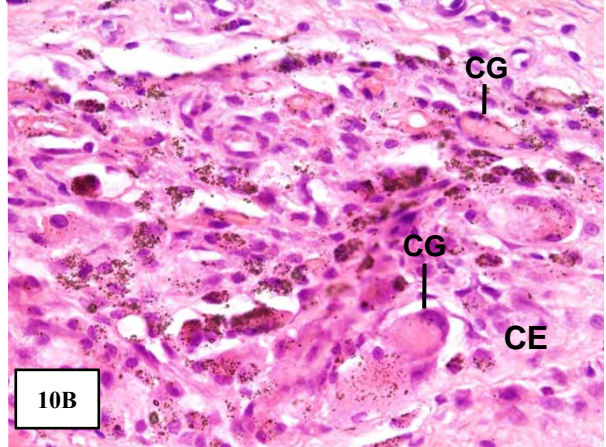
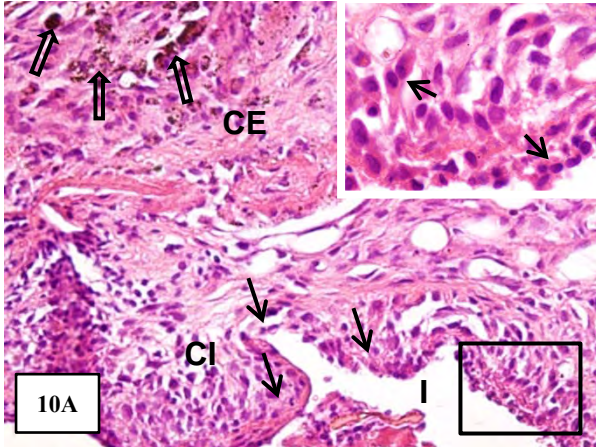
**Grupo CE-MTA**

A análise dos cortes de porções do subcutâneo contendo os tubos de polietileno com o CE-MTA revelou, aos 7 dias após o implante, uma cápsula de tecido conjuntivo apresentando sua extremidade interna com contorno irregular. Na porção interna, diversas células inflamatórias mononucleadas, principalmente macrófagos e linfócitos, foram observadas em íntimo contato com o material. Frequentemente, partículas do material implantado, com formato de grânulos de cor castanha, foram encontrados dispersos na cápsula, principalmente, em sua porção mais externa; algumas destas partículas estavam parcialmente circundadas por células gigantes multinucleadas (Figuras 10A e 10B). A cápsula, aos 14 dias, mostrou a superfície interna com acentuado contorno irregular; diversos linfócitos e células gigantes multinucleadas estavam presentes no tecido conjuntivo ricamente vascularizado. Partículas de material (exibindo cor castanha), caracterizadas como delgados grânulos, persistiram dispersos entre os demais componentes do tecido conjuntivo (Figuras 10C e 10D). Estruturas com formato arredondado ou ovóide exibindo forte acidofilia (coradas em vermelho pela eosina) foram também encontradas na cápsula, próximas ao material implantado; estas estruturas acidófilas às vezes apresentaram-se como uma massa densamente corada, outras se apresentaram coradas somente na sua periferia. Ocasionalmente, estas estruturas estavam, parcialmente, circundadas por células gigantes multinucleadas (Figura 10C). No período de 30 dias, a cápsula mostrou uma evidente redução no processo inflamatório, apesar da presença de pequenos grânulos de material ainda dispersos no tecido conjuntivo. A cápsula estava bem estruturada, com feixes de fibras colágenas entremeados por fibroblastos (Figura

10E). Após 60 dias ao implante, a cápsula adjacente ao material apresentou-se constituída por um tecido conjuntivo frouxo, contendo fibroblastos entre as fibras colágenas e vasos sanguíneos (Figura 10F).

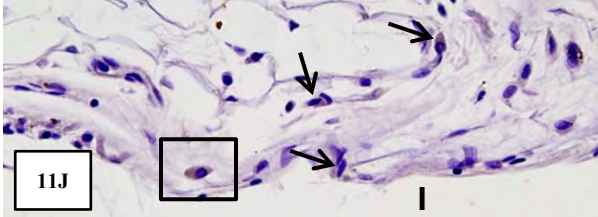
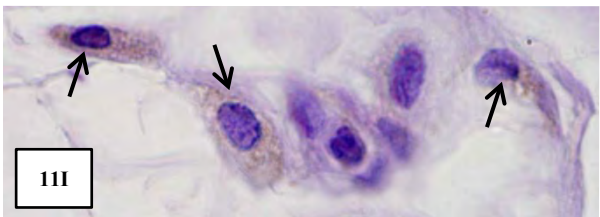
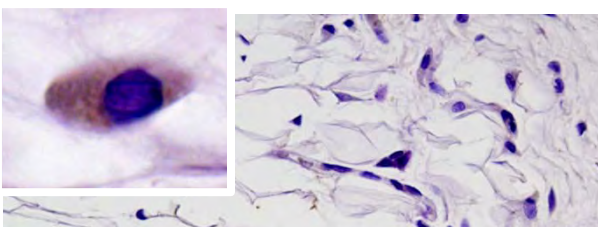
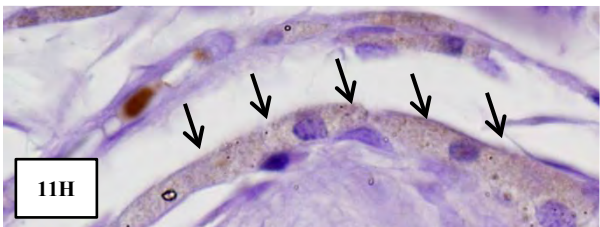
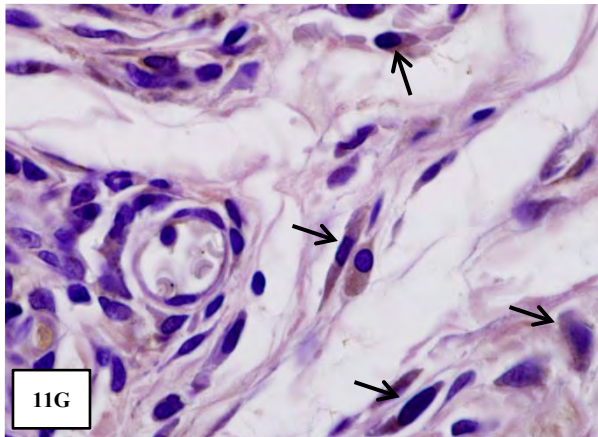
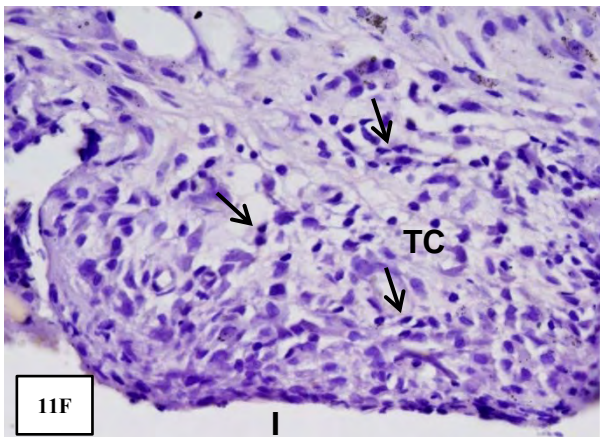
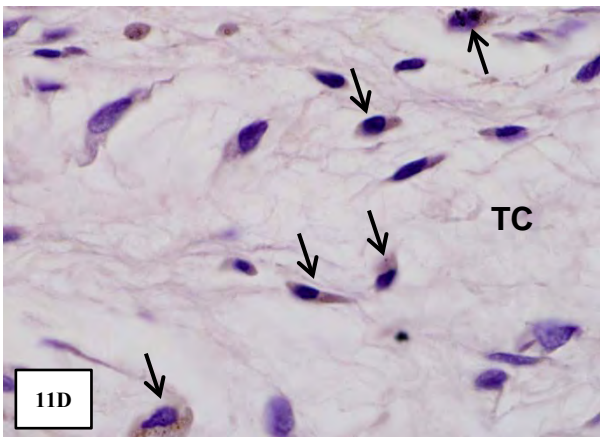
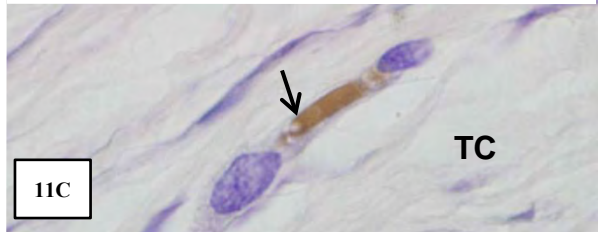
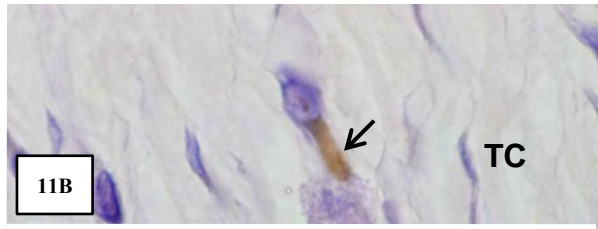
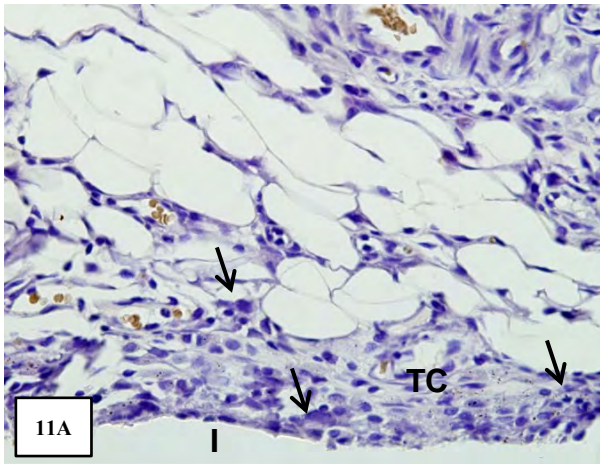
**FIGURAS 10A – 10F** – Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes com o CE-MTA, as quais foram coradas com H&E. A **fig. 10A** (7 dias) mostra o contorno irregular da cápsula (setas) na sua superfície adjacente ao espaço do material implantado (I). A porção mais interna da cápsula (CI) contém diversas células mononucleadas (setas), predominantemente, macrófagos e linfócitos, como pode ser observado no *inset*. Partículas de material (setas vazadas), exibindo formato de grânulos e com cor castanha, aparecem dispersas na porção externa da cápsula (CE). 215x; *inset* 505x. A **fig. 10B** mostra, em maior aumento, parte da porção externa da cápsula (CE) com as partículas de material (em castanho), parcialmente, circundadas por células gigantes (CG). 260x. **Fig. 10C** (14 dias) – a cápsula (TC), adjacente ao espaço do tubo implantado (I), é constituída por um tecido conjuntivo contendo células inflamatórias (setas) e células gigantes (CG). Note a presença de partículas de material (em castanho) dispersas na cápsula (TC) e estruturas arredondadas e ovóides exibindo a porção periférica fortemente acidófila (S). VS, vaso sanguíneo. 200x. A **fig. 10D** (14 dias) mostra, em maior aumento, parte da porção interna da cápsula (TC); a superfície da cápsula justaposta ao espaço do material implantado (I) apresenta-se irregular (setas vazadas). Diversos linfócitos (setas) e partículas do material (grânulos em castanho) são observados na cápsula (TC). 660x. A **fig. 10E** mostra a cápsula de tecido conjuntivo (TC), aos 30 dias após o implante, exibindo diversos fibroblastos (Fb) entre os feixes de fibras colágenas (Fc). Pequenos grânulos castanhos de material (seta vazada) estão dispersos na cápsula (TC). VS, vasos sanguíneos. I, espaço do tubo implantado. 350x. **Fig. 10F** (60 dias) – a cápsula (TC) adjacente ao material implantado (I) é constituída por um tecido conjuntivo frouxo, contendo fibroblastos (Fb) entre as fibras colágenas (Fc) e vasos sanguíneos (VS). 395x.





A análise dos cortes submetidos à reação imuno-histoquímica para detecção de OPN, revelou que, aos 7 dias, as células do tecido conjuntivo adjacente ao material não expressaram imuno-reatividade a osteopontina (Figura 11A). No período de 14 dias, no entanto, porções da cápsula exibiram alguns fibroblastos com marcação citoplasmática positiva (Figuras 11B e 11C). Aos 30 dias, diversos fibroblastos exibindo imuno-positividade citoplasmática foram frequentemente observados na cápsula adjacente ao material (Figura 11D). Fibroblastos exibindo conspícua marcação citoplasmática foram também encontrados na cápsula envolvendo o material após 60 dias ao implante (Figura 11E). No que se refere à imuno-histoquímica para detecção de OCN, aos 7 dias, as células da cápsula também não expressaram qualquer imuno-reatividade (Figura 11F). Em contraposição, aos 14 dias, verificou-se a presença de diversos fibroblastos, fortemente positivos à OCN, em meio as fibras colágenas da cápsula de tecido conjuntivo adjacente ao material (Figura 11G). Geralmente, diversas células exibindo marcação citoplasmática fraca e difusa estavam presentes no tecido conjuntivo da cápsula após 30 dias ao implante no subcutâneo (Figuras 11H e 11I). No período de 60 dias, algumas células situadas na porção interna da cápsula exibiram imuno-positividade à OCN, dentre elas, algumas apresentaram conspícua imuno-reatividade, enquanto outras exibiram imuno-marcação fraca e difusa (Figura 11J).

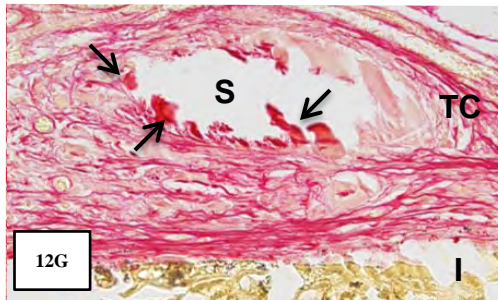
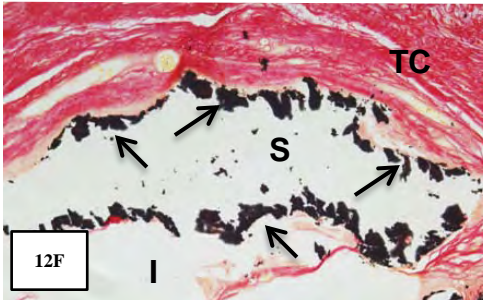
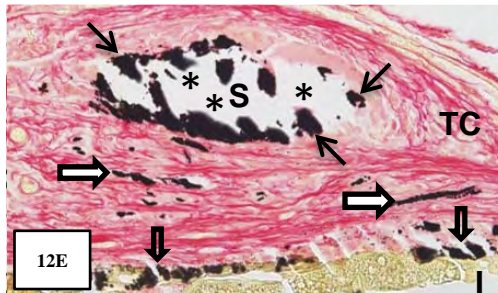
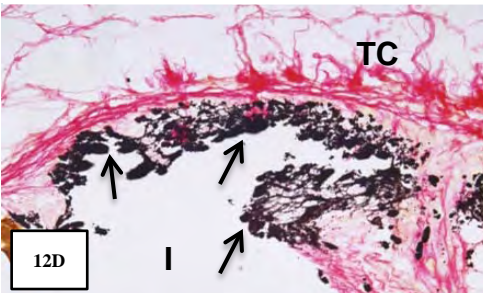
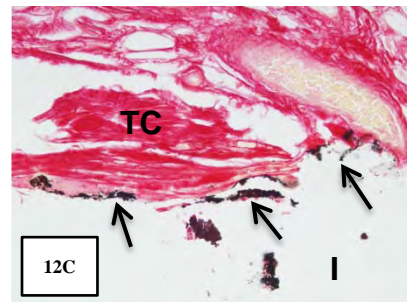
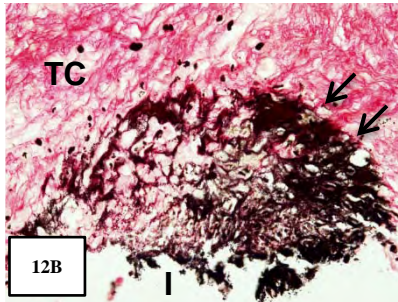
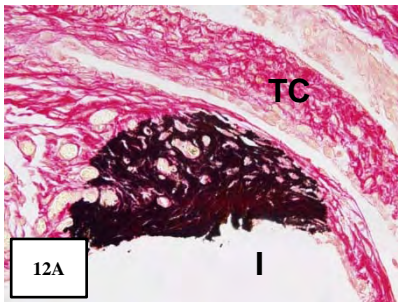
**FIGURAS 11A – 11J** – Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo os implantes de CE-MTA, as quais foram submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de OPN (Figs. 11A-11E) e OCN (Figs. 11F-11J) e contracoradas com hematoxilina. A **fig. 11A** mostra células negativas (setas) a imuno-histoquímica para OPN no tecido conjuntivo (TC) adjacente ao tubo implantado (I) após 7 dias. 220x. As **figs. 11B e 11C** mostram porções da cápsula (TC) adjacente ao implante após 14 dias. Fibroblastos exibem marcação citoplasmática positiva a OPN (setas). 1140x. **Fig. 11D** – diversos fibroblastos (setas) exibindo positiva marcação a OPN são observados na cápsula de tecido conjuntivo (TC) formada aos 30 dias. 780x. A **fig. 11E** mostra grânulos fortemente marcados à OPN difusos no citoplasma de um fibroblasto (seta) presente na cápsula (TC) após 60 dias ao implante. 770x. A **fig. 11 F** mostra uma porção da cápsula (TC) exibindo células negativas (setas) a imuno-histoquímica para detecção de OCN, aos 7 dias após o implante. I, espaço do tubo implantado. 260x. **Fig. 11G** – uma porção da cápsula após 14 dias ao implante mostra diversos fibroblastos (setas) fortemente positivos à marcação de OCN. 745x. Nas **figs. 11H e 11I** marcação citoplasmática fraca e difusa (setas) é observada nas células da cápsula após 30 dias ao implante. Fig. 11H: 900x; Fig. 11I: 1225x. A **fig. 11J**, porção da cápsula após 60 dias ao implante, mostra algumas células (setas) exibindo marcação positiva à OCN. O *inset* evidencia a forte marcação citoplasmática no fibroblasto localizado na porção interna da cápsula, região demarcada. I, espaço do tubo implantado. 1715x.



Os cortes de porções do subcutâneo, contendo os implantes com o CE-MTA, submetidos ao método histoquímico para detecção de calcificação (método de von Kossa) apresentaram regiões da cápsula impregnadas em preto, ou seja, positivas ao método (Figuras 12D-12F); note que estas áreas positivas ao von Kossa, impregnadas em preto, são semelhantes às regiões em calcificação da diáfise do osso longo usado como controle positivo (Figura 12H). No período de 7 dias, estruturas impregnadas em preto foram observadas na superfície interna da cápsula, em íntimo contato com o material. Os depósitos positivos ao von Kossa mostraram formato irregular, muitas vezes constituindo uma rede difusa sobre o tecido conjuntivo (Figura 12D). Estruturas extensas com formato ovóide exibindo positividade ao von Kossa foram encontradas na cápsula adjacente aos implantes, após 14 dias. Estas estruturas frequentemente exibiram um material impregnado em preto situado na sua periferia e uma porção central, aparentemente vazia. Depósitos von Kossa positivos na matriz extracelular do tecido conjuntivo e na superfície da cápsula, em íntimo contato com restos do material implantado foram também observados (Figura 12E). Estruturas irregulares exibindo difusa marcação ao von Kossa foram também observadas na superfície interna da cápsula após 30 dias aos implantes (Figura 12F). Os cortes subsequentes aos contendo as estruturas positivas quando foram imersos em EDTA e, posteriormente, submetidos ao von Kossa (controle negativo) mostraram que as mesmas estruturas foram negativas à reação histoquímica (Compare as Figuras 12E e 12G). Aos 60

**FIGURAS 12A – 12H** – Fotomicrografias de porções do subcutâneo contendo implantes de MTA (figs. 12A-12C), MTA-experimental (figs. 12D-12G) e tíbia de camundongo (fig. 12H) as quais foram submetidas à técnica de von Kossa e contracoradas com picrossirius.

**Fig. 12A** - uma estrutura densa exibindo positividade ao von Kossa (corado em preto) está presente no tecido conjuntivo (TC) adjacente ao MTA após 7 dias ao implante. I, espaço do tubo implantado. 130x. A **fig. 12B** mostra uma estrutura irregular exibindo positividade ao von Kossa (setas) na porção da cápsula adjacente (TC) ao MTA após 14 dias ao implante. I, espaço do tubo implantado. 130x. A **fig. 12C**, 30 dias após o implante com MTA, revela estruturas positivas ao von Kossa (setas) na porção mais interna da cápsula (TC), em íntimo contato com o material. I, espaço do tubo implantado. 130x. Na **fig. 12D**, a porção interna da cápsula (TC) exibe marcação difusa ao von Kossa (setas), após 7 dias ao implante. I, espaço do tubo implantado. 110x. Na **fig. 12 E**, uma estrutura “S”, situada na cápsula aos 14 dias após o implante do CE-MTA, exibe na sua periferia positividade ao von Kossa (setas). Note que a porção central da estrutura “S” está aparentemente vazia (asteriscos). Estruturas alongadas (setas brancas) exibindo positividade ao von Kossa são também observadas no tecido conjuntivo da cápsula (TC); algumas estruturas positivas ao von Kossa estão presentes na superfície interna cápsula (setas vazadas). I, espaço do tubo implantado. 165x. A **fig. 12F** mostra, aos 30 dias, uma estrutura de formato irregular “S”, situada na superfície interna da cápsula (TC), exibindo difusa marcação positiva junto à sua periferia (setas). I, espaço do tubo implantado. 110x. A **figura 12 G** mostra um corte subsequente ao da fig. 12E, o qual foi submetido a descalcificação, usado como controle negativo. Note que as regiões da estrutura “S”, anteriormente positivas ao von Kossa (fig. 12E), apresentam-se não marcadas (setas); a porção mais interna da cápsula, adjacente ao material, e o tecido conjuntivo também não exibem positividade. I, espaço do material implantado. 165x. Na **figura 12H**, o osso longo da tíbia, no início da ossificação, usado como controle positivo, mostra forte positividade ao von Kossa na diáfise (seta). E, epífises. 645x.



**- Densidade numérica de células inflamatórias no subcutâneo**

No grupo Controle, os resultados morfométricos (Tabela 1) mostraram uma alta densidade de células inflamatórias nos períodos iniciais (7 e 14 dias), principalmente no período de 14 dias. Entretanto, nos períodos de 30 e 60 dias, a densidade de células reduziu gradativamente, atingindo um valor mínimo aos 60 dias.

Nos grupos CP e MTA, a densidade de células inflamatórias também foi maior nos períodos iniciais (7 e 14), principalmente no período de 7 dias. Em comparação a este período, houve uma pequena redução na densidade de células, no período de 14 dias, e uma significativa redução aos 30 e 60 dias (Tabela 1).

Semelhantemente ao grupo Controle, o grupo CE-MTA apresentou um aumento significativo de células inflamatórias no período de 14 dias. Entretanto, a densidade numérica destas células diminuiu significativamente nos períodos de 30 e 60 dias (Tabela 1).

Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos, quando estes foram comparados entre si em um mesmo período (Tabela 1)



**Tabela 1** - Densidade numérica de células inflamatórias na cápsula adjacente aos implantes no subcutâneo, nos diferentes períodos experimentais

<i>Períodos (dias)</i>	<b>Grupos</b>			
	<i>Controle</i>	<i>CP</i>	<i>MTA</i>	<i>CE-MTA</i>
<b>7</b>	510,4±122	722,2±233,4	677,1±79	556,2±244
<b>14</b>	779,2± 310	632±178,1	663± 246,6	955,5±141,2
<b>30</b>	493,4± 117,5	397,2± 122	389,6± 167	386,7±191
<b>60</b>	203± 50,6	267,4± 76,4	255± 71,3	246,6±126

M±D.P. (média ± desvio padrão)

Diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes períodos:

Controle - 14 >60

CP - 7>30 e 60; CP - 14>60

MTA - 7>30 e 60; MTA - 14>60

CE-MTA - 14>7, 30 e 60

Análises estatísticas entre os diferentes grupos:

(Controle= CP= MTA= CE-MTA;  $p > 0,05$ )

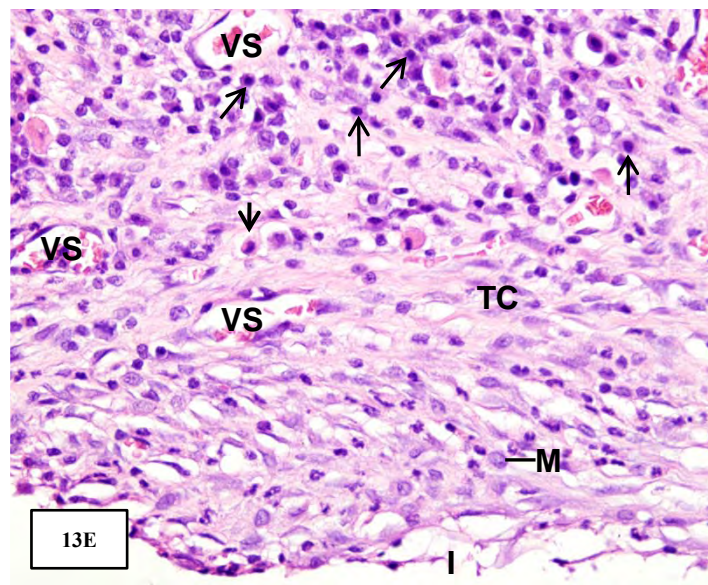
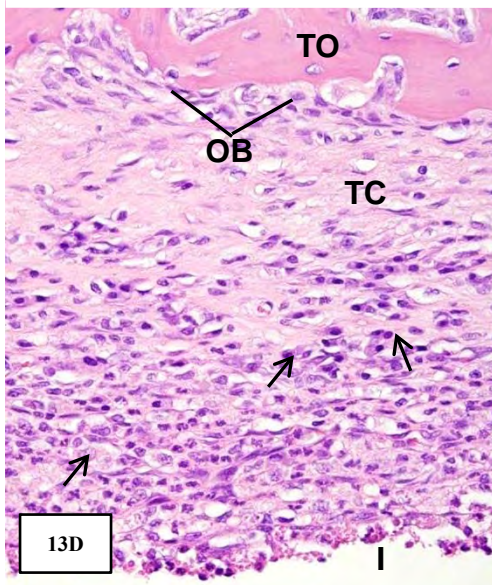
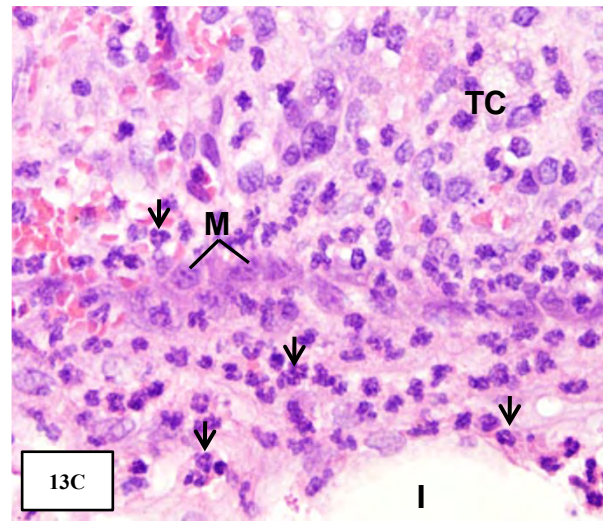
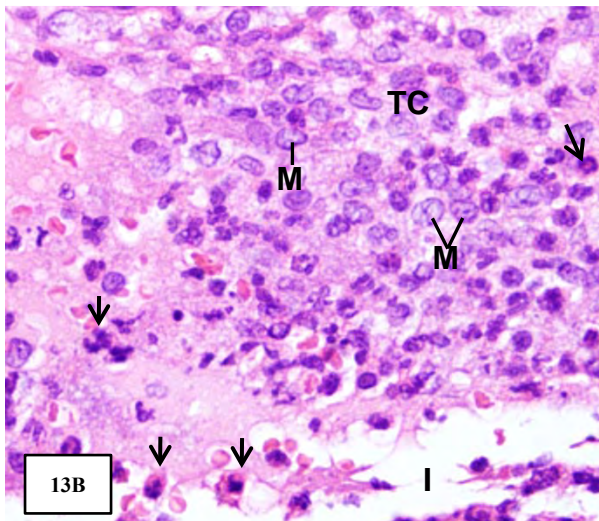
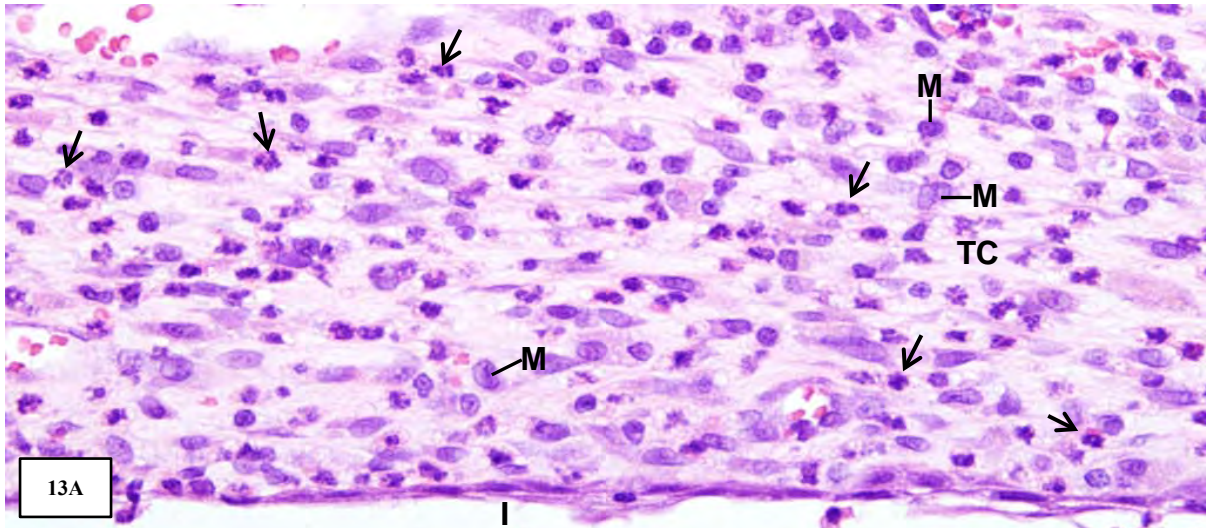
## **5.2 Implantes no alvéolo dentário**

### **- Análise morfológica e imuno-histoquímica**

#### ***Grupo Controle***

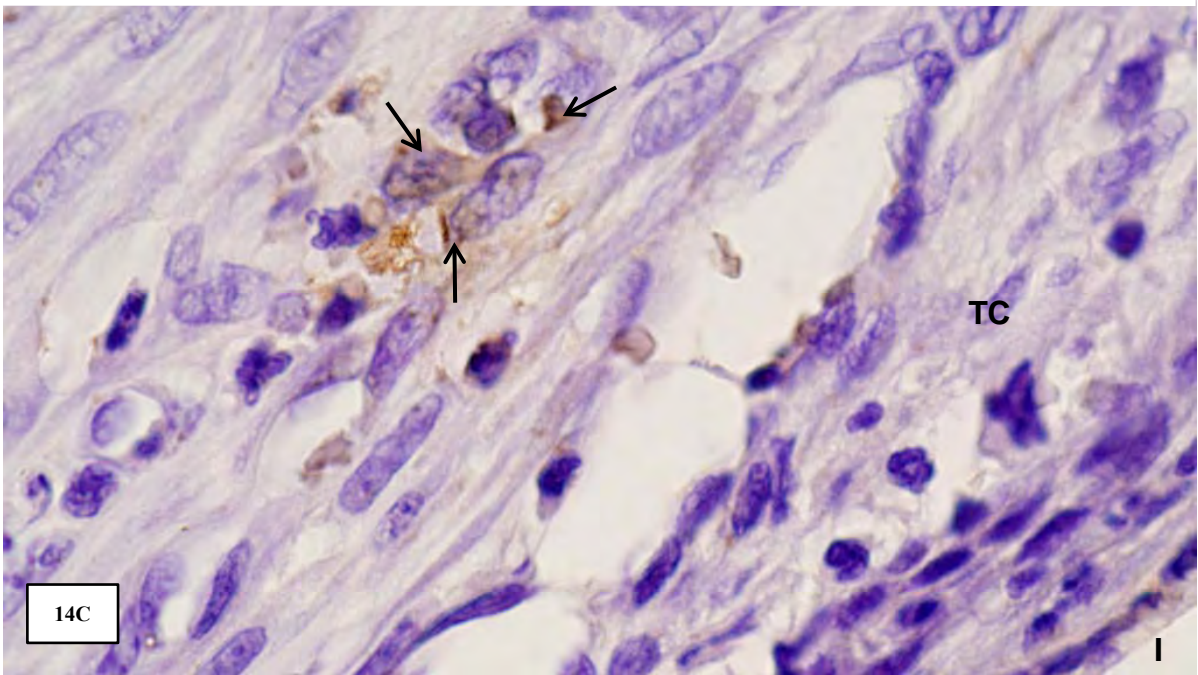
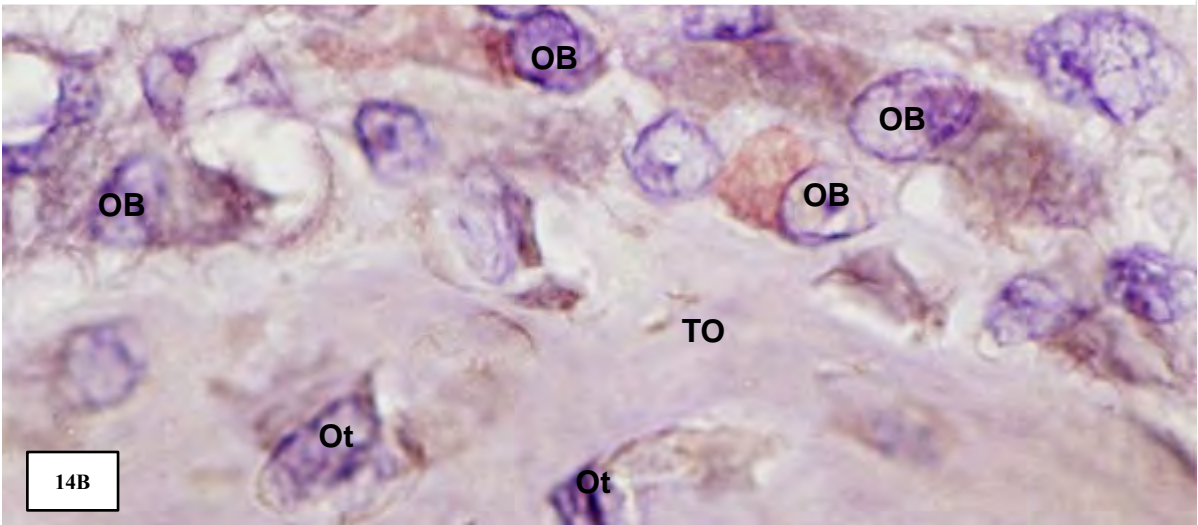
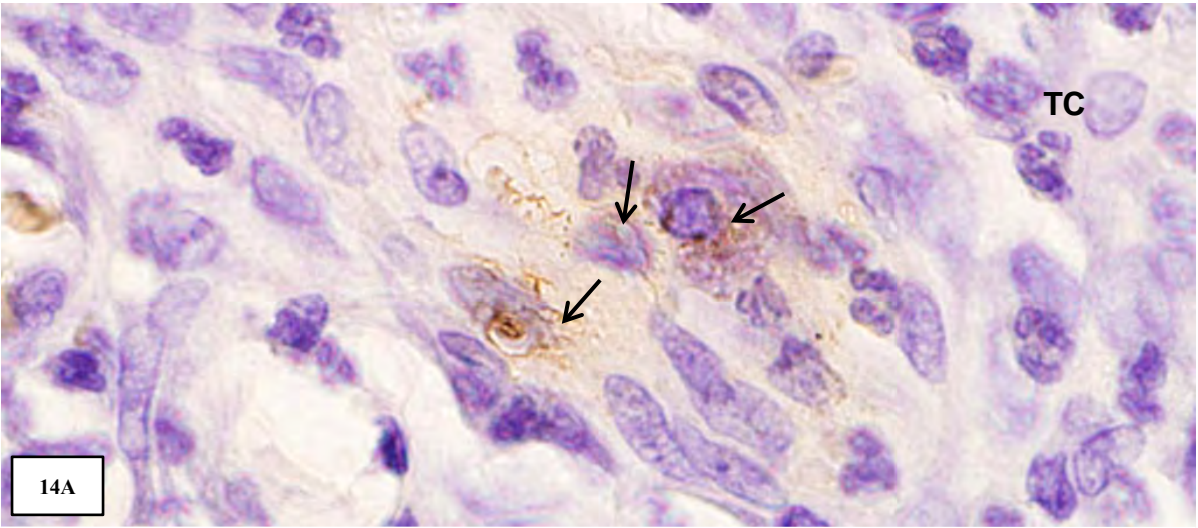
Aos 7 dias após o implante do tubo de polietileno no alvéolo dentário, o tecido conjuntivo adjacente à luz do tubo apresentou células inflamatórias, entre elas, vários neutrófilos e alguns macrófagos (Figura 13A). Nos períodos de 14 e 30 dias, a cápsula que envolvia os tubos implantados exibiu numerosas células inflamatórias, principalmente, neutrófilos e macrófagos (Figuras 13B e 13C). A cápsula formada aos 60 dias mostrou uma aparente redução no processo inflamatório; no entanto, células inflamatórias, principalmente macrófagos, ainda persistiam em algumas porções da cápsula (Figuras 13D e 13E). Tecido ósseo em formação exibindo osteoblastos posicionados em sua periferia foi observado nas paredes laterais do alvéolo dentário (Figura 13D).

**FIGURAS 13A-13E** – Fotomicrografias de porções do alvéolo dentário contendo os implantes de tubos de polietileno vazios (Grupo Controle), as quais foram coradas com H&E. **Fig. 13 A (7 dias)** – o tecido conjuntivo (TC) adjacente à luz do tubo implantado (I) mostra diversos neutrófilos (setas) e alguns macrófagos (M). 560x. **Figs. 13 B (14 dias) e 13 C (30 dias)** – adjacente à luz do tubo implantado (I), diversos neutrófilos (setas) e macrófagos (M) estão presentes na cápsula (TC) que envolve o tubo. Fig. 13B: 450x; Fig. 13C: 395x. **Fig. 13D (60 dias)** – mostra o tecido conjuntivo (TC) com redução do número de células inflamatórias. Detalhe para presença de tecido ósseo neoformado (TO) adjacente à cápsula. OB, osteoblastos. I, espaço do tubo implantado. 275x. A **fig. 13 E** mostra uma região da cápsula de tecido conjuntivo (TC), adjacente ao implante (I), aos 60 dias, onde se apresentam células inflamatórias, em sua maior parte, mononucleadas (setas). M, macrófago. VS, vasos sanguíneos 260x.



A análise dos cortes contendo os alvéolos dentários submetidos à imunohistoquímica para detecção de OPN revelou que as células da cápsula adjacente aos implantes não expressaram imuno-reatividade. Somente no período de 7 dias, escassas células mononucleadas presentes na cápsula exibiram marcação fraca e difusa no citoplasma (Figura 14A). Em relação a osteocalcina, forte positividade no citoplasma dos osteoblastos localizados na superfície de trabéculas ósseas adjacentes a cápsula de tecido conjuntivo que envolve o implante foi encontrado no período de 7 dias após o implante; osteócitos, no interior de lacunas, exibiram também marcação citoplasmática difusa à OCN (Figura 14B). No período de 14 dias, algumas células da cápsula adjacente ao tubo de polietileno exibiram marcação positiva à OCN (Figura 14C).

**FIGURAS 14A-14C** – Fotomicrografias de porções do alvéolo dentário contendo os implantes de tubos de polietileno vazios (Grupo Controle), as quais foram submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de OPN (Fig. 14A) e OCN (Figs. 14B e 14C) e contracoradas com hematoxilina. **Fig. 14 A (7 dias)** – células mononucleadas (setas) exibindo marcação difusa no citoplasma (corado em castanho) são observadas no tecido conjuntivo (TC) adjacente à extremidade do tubo. 1715x. **Fig. 14B (7 dias)** – forte marcação para a OCN é observada no citoplasma dos osteoblastos (OB) adjacentes à superfície de uma trabécula óssea (TO); osteócitos (Ot) no interior de lacunas exibem uma marcação citoplasmática difusa à OCN. 1715x. **Fig. 14 C (14 dias)** – algumas células exibindo marcação positiva à OCN (setas) são observadas no tecido conjuntivo (TC) próximo ao tubo implantado (I). 1480x.

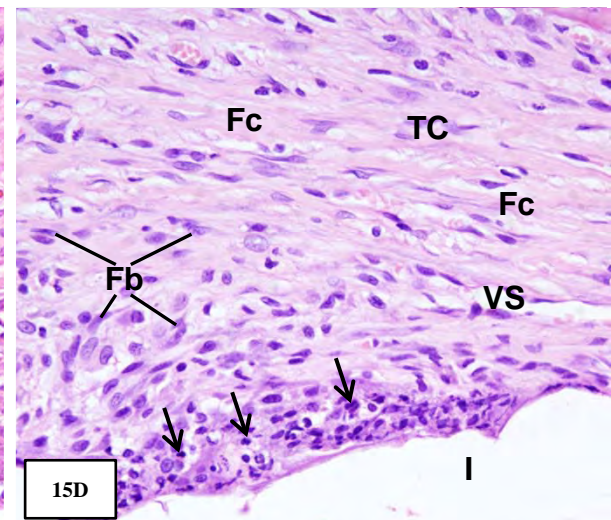
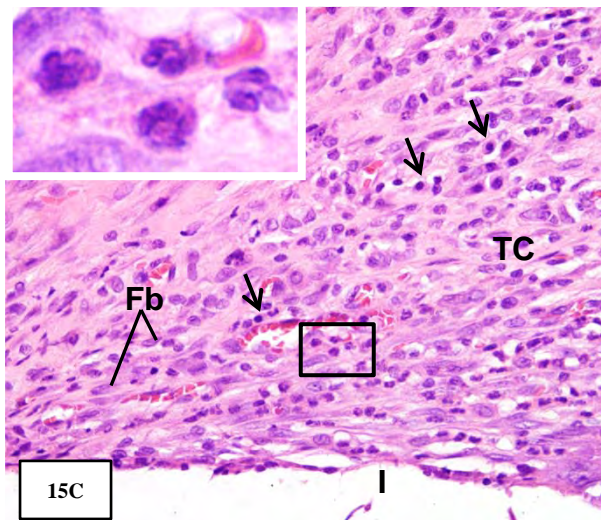
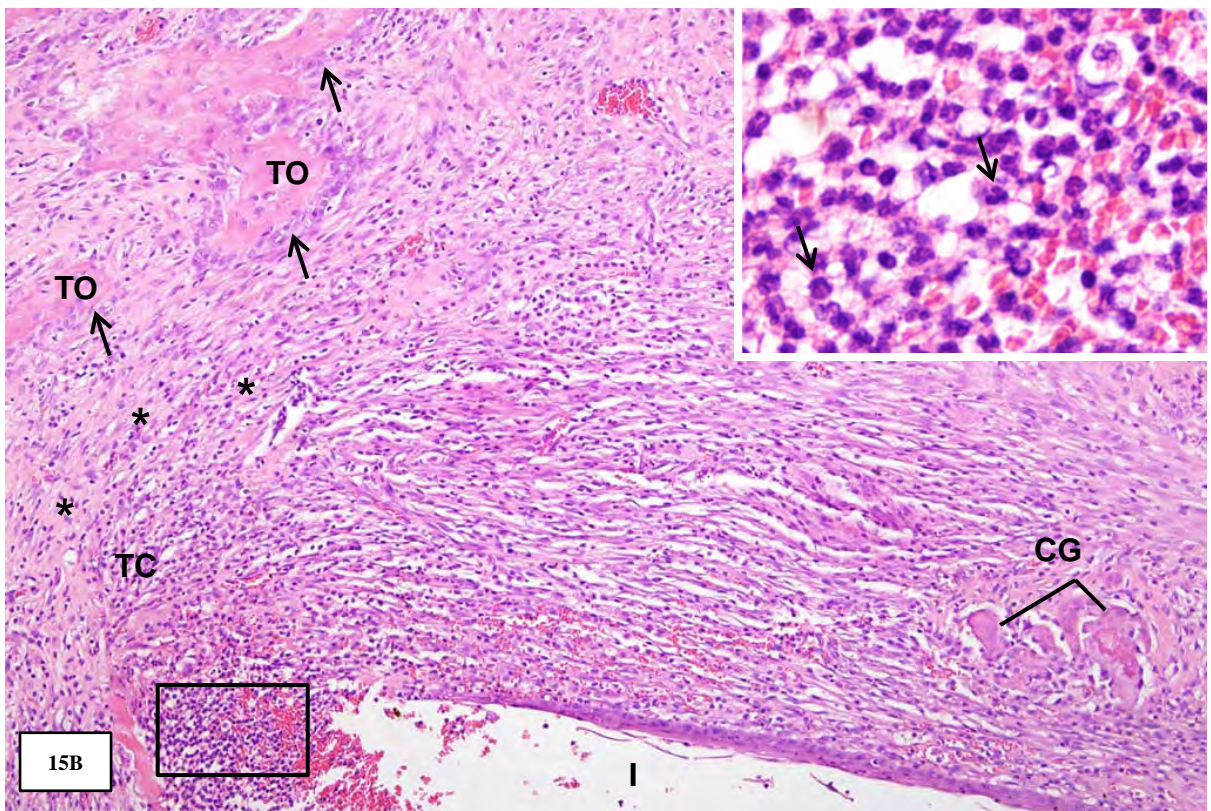
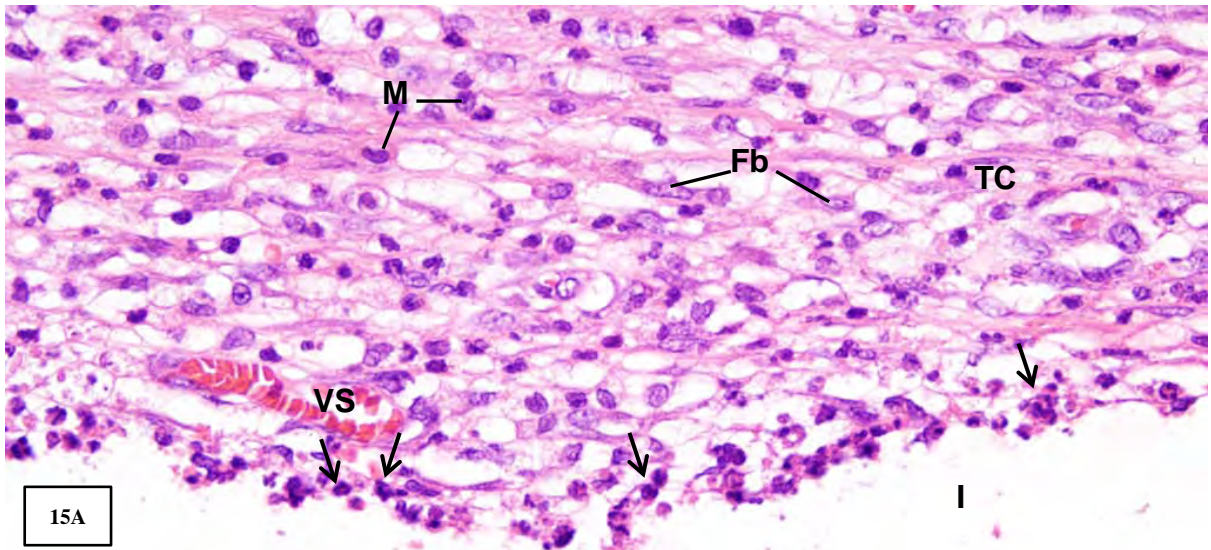


***Grupo CP***

Junto à extremidade do tubo, após 7 dias ao implante do CP, o tecido conjuntivo apresentou vários neutrófilos em íntimo contato com o material implantado; na cápsula, em sua porção mais externa, alguns macrófagos estavam presentes entre os fibroblastos e os feixes de fibras colágenas (Figura 15A). Aos 14 dias, a cápsula, adjacente ao implante, exibiu inúmeras células inflamatórias, predominantemente neutrófilos, e em algumas regiões do tecido verificou-se a presença de células gigantes multinucleadas; na porção externa da cápsula estavam presentes fibroblastos e feixes de fibras colágenas circundando o tubo de polietileno implantado. As paredes laterais do alvéolo dentário exibiram trabéculas ósseas revestidas por osteoblastos ativos (Figura 15B). No período de 30 dias após o implante, a cápsula apresentava muitos fibroblastos e fibras colágenas, porém ainda persistiam algumas células inflamatórias (Figura 15C). Embora células inflamatórias em íntimo contato com o material implantado foram observadas aos 60 dias, a cápsula em sua maior extensão estava constituída por um tecido conjuntivo organizado, contendo fibroblastos e feixes de fibras colágenas (Figura 15D).

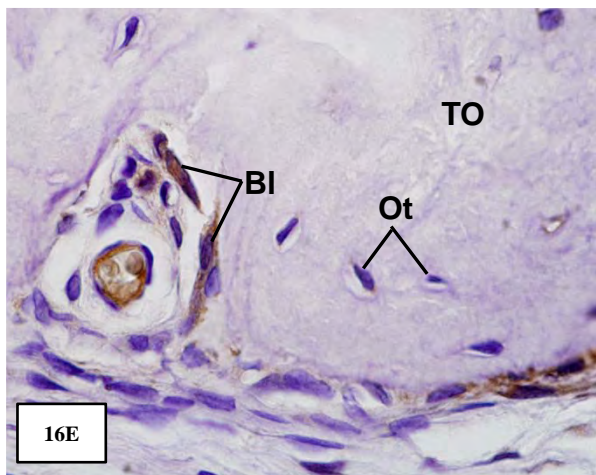
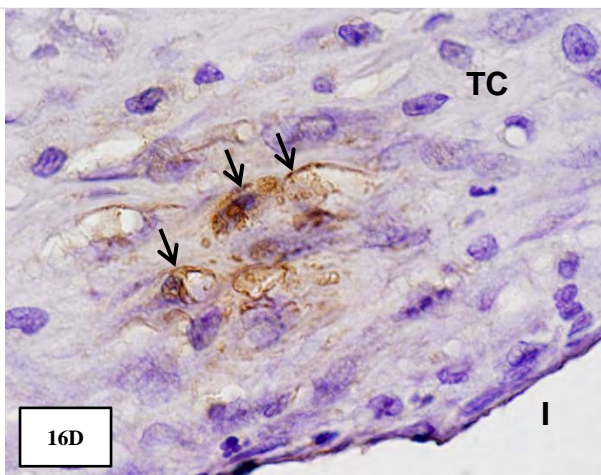
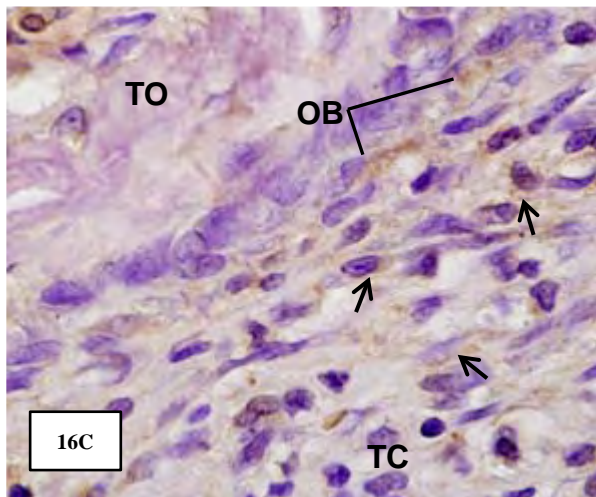
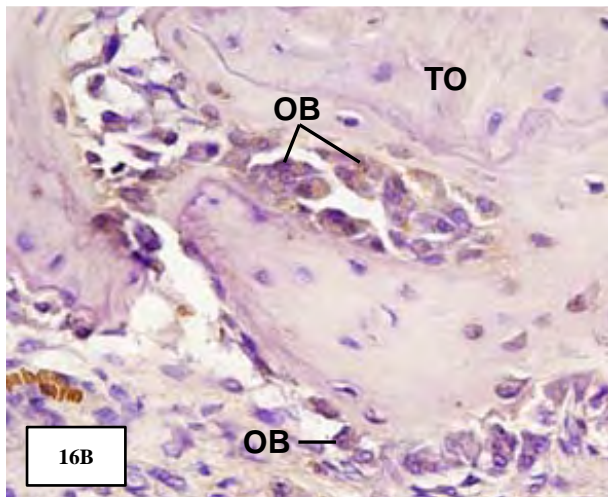
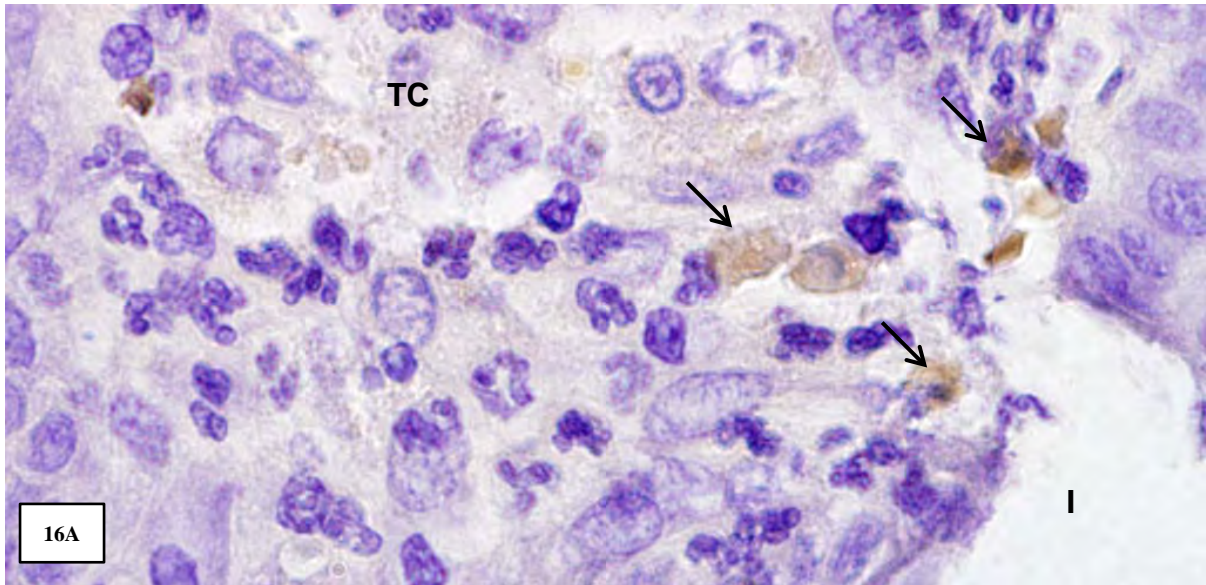


**FIGURAS 15A–15D** Fotomicrografias de porções do alvéolo dentário contendo os implantes de Portland (CP), as quais foram coradas com H&E. **Fig. 15A (7 dias)** – junto à extremidade do tubo implantado (I), o tecido conjuntivo (TC) exhibe uma camada de neutrófilos (setas); no tecido conjuntivo (TC) adjacente à esta camada superficial, alguns macrófagos (M) estão presentes entre fibroblastos (Fb). VS, vaso sanguíneo. 425x. **Fig. 15B (14 dias)** – a cápsula (TC) na extremidade do tubo implantado (I) no alvéolo dentário exhibe inúmeras células inflamatórias, principalmente neutrófilos (*inset*, setas); na porção externa da cápsula, o tecido conjuntivo apresenta fibroblastos e fibras colágenas (asteriscos), circundando o tubo de polietileno. Note a presença de trabéculas ósseas (TO) revestidas por osteoblastos ativos (setas). Na porção lateral do tubo, algumas células gigantes estão presentes (CG). 150x; *inset*: 525x. **Fig. 15C (30 dias)** – o tecido conjuntivo (TC), adjacente ao implante (I), contém inúmeros fibroblastos (Fb), porém algumas células inflamatórias (setas) ainda são observadas. 235x. O *inset*, área delimitada na fig. 15C, mostra um grupo de neutrófilos. 1715x. **Fig. 15D (60 dias)** – a cápsula (TC) adjacente à extremidade da luz do tubo (I) é constituída por um tecido conjuntivo organizado, contendo fibroblastos (Fb) e fibras colágenas (Fc) evidentes. Na superfície mais interna da cápsula, em íntimo contato com o espaço do material, observa-se um grupo de células inflamatórias (setas). VS, vaso sanguíneo. 260x.



A análise dos cortes submetidos as reações imuno-histoquímica para detecção de OPN mostrou escassas células imuno-positivas no tecido conjuntivo adjacente ao implante, no período de 30 dias (Figura 16A). Em relação à OCN, geralmente as células situadas na cápsula próxima ao implante não expressaram imuno-reatividade à OCN. No entanto, osteoblastos situados nas superfícies ósseas em formação junto às paredes laterais do alvéolo dentário exibiram evidente imuno-positividade citoplasmática (Figuras 16B e 16C); algumas células situadas na porção externa da cápsula, ou seja, distante do material implantado, ocasionalmente também expressaram positividade à OCN, embora esta fosse fraca e difusa (Figura 16C). Aos 30 dias, células, fortemente imuno-positivas à OCN, foram observadas no tecido conjuntivo, próximo ao implante (Figura 16D); justapostas à superfície de algumas trabéculas de tecido ósseo, algumas células de revestimento ósseo exibiram forte positividade à OCN (Figura 16E).

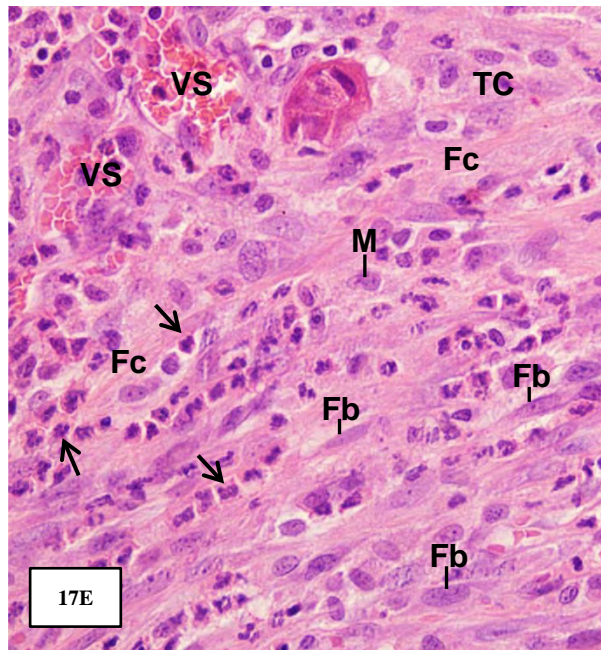
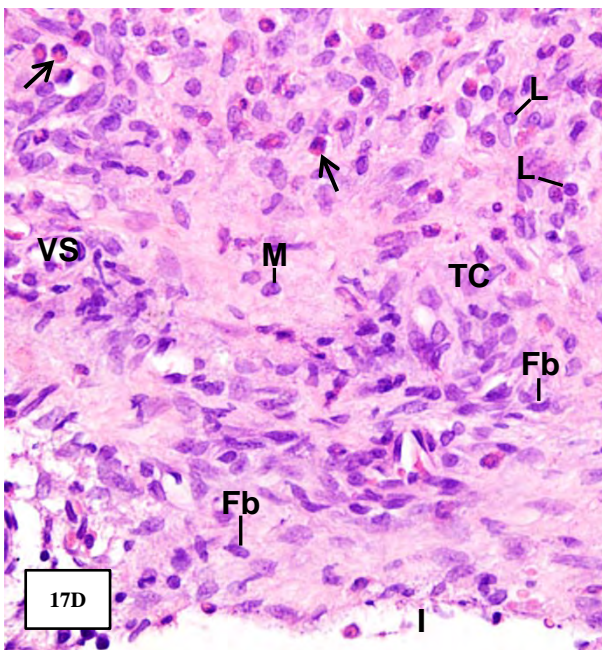
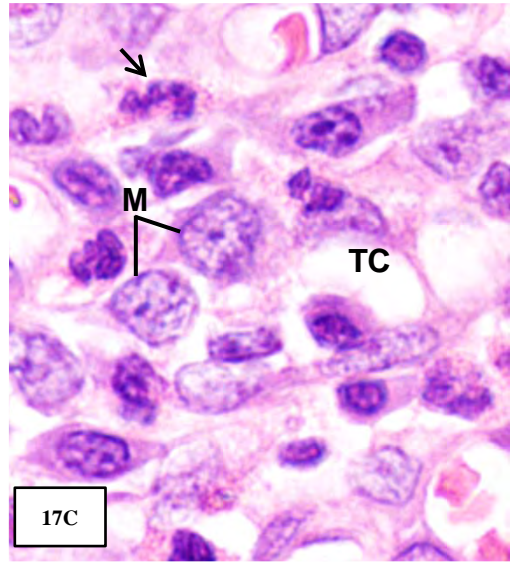
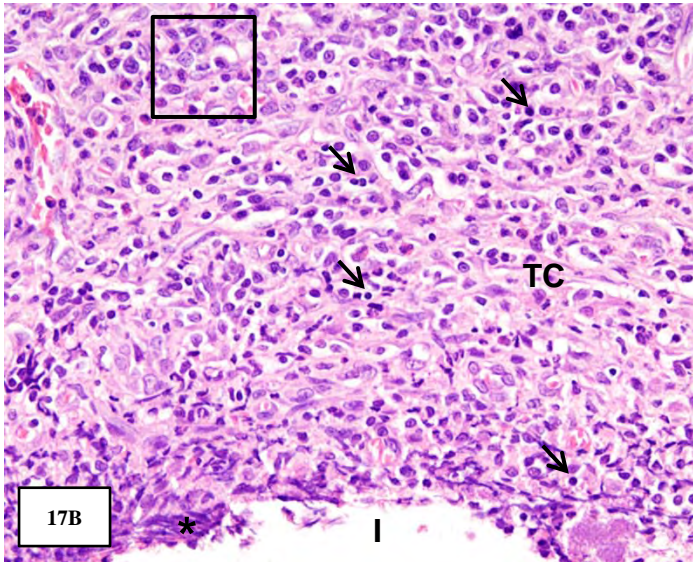
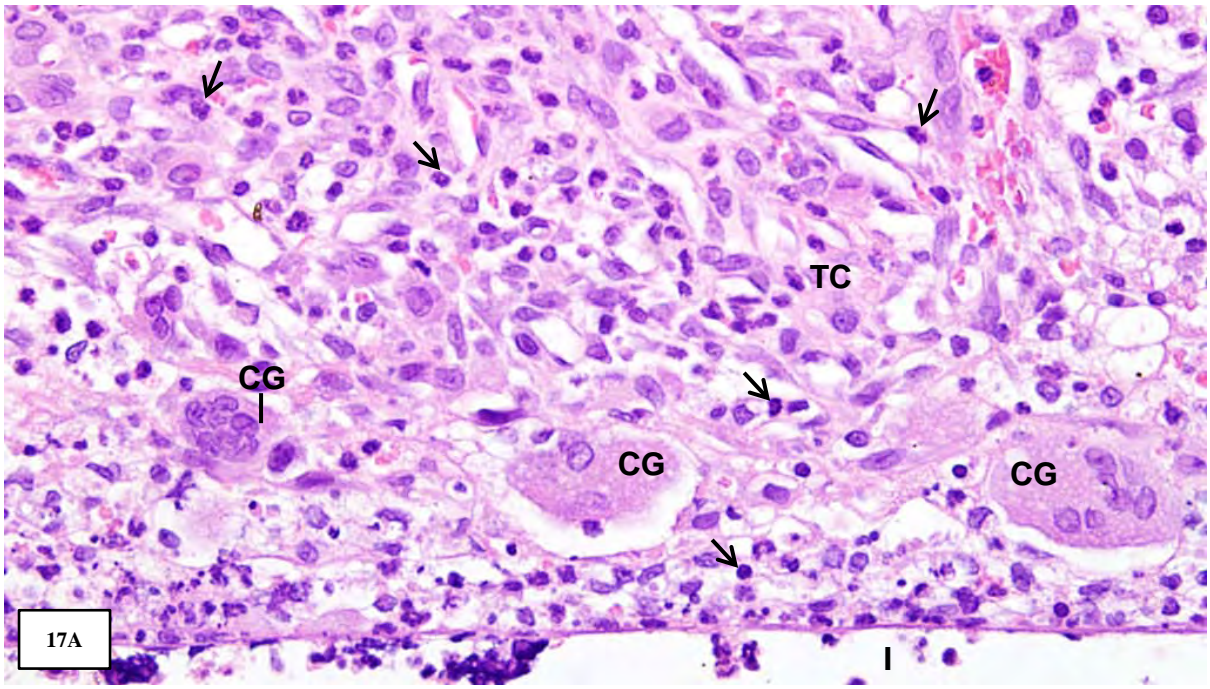
**FIGURAS 16A-16E** – Fotomicrografias de porções do alvéolo dentário contendo os implantes de cimento Portland, as quais foram submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de OPN (Fig. 16A) e OCN (Figs. 16B-16E) e contracoradas com hematoxilina. **Fig. 16A (30 dias)** – escassas células imuno-positivas a OPN (setas) estão presentes no tecido conjuntivo (TC) adjacente ao implante (I). 1500x. **Figs. 16B e 16C (14 dias)** – mostram porções da parede óssea (TO) do alvéolo dentário próximo ao implante contendo o material Portland. Note que os osteoblastos (OB) exibem marcação positiva a imuno-histoquímica para OCN. Algumas células do tecido conjuntivo (TC) expressam uma imuno-positividade fraca e difusa (setas). Fig. 16B: 260x; Fig. 16C: 730x. **Figs. 16D e 16E (30 dias)** – células fortemente imuno-positivas (setas) estão situadas no tecido conjuntivo (TC), próximo ao tubo implantado (I). Algumas células de revestimento ósseo (Bl) justapostas à superfície das trabéculas da parede óssea (TO) do alvéolo dentário também expressam positividade à OCN. Os osteócitos. Fig. 16D: 750x; Fig. 16E: 680x.



***Grupo MTA***

A análise dos cortes corados com H&E revelou que o tecido conjuntivo adjacente ao material apresentou muitos neutrófilos e células gigantes multinucleadas localizadas na porção interna da cápsula, após 7 dias ao implante (Figura 17A). Aos 14 dias, diversos linfócitos e monócitos entre alguns neutrófilos e eosinófilos foram encontrados por toda extensão da cápsula. Áreas de necrose tecidual em íntimo contato com o material implantado foram observadas em algumas porções da cápsula (Figuras 17B e 17C). Nos períodos de 30 e 60 dias, a constituição da cápsula apresentou características semelhantes, exibindo reduzido número de células inflamatórias quando comparado aos períodos iniciais, bem como diversos fibroblastos dispostos entre as fibras colágenas (Figuras 17D e 17E).

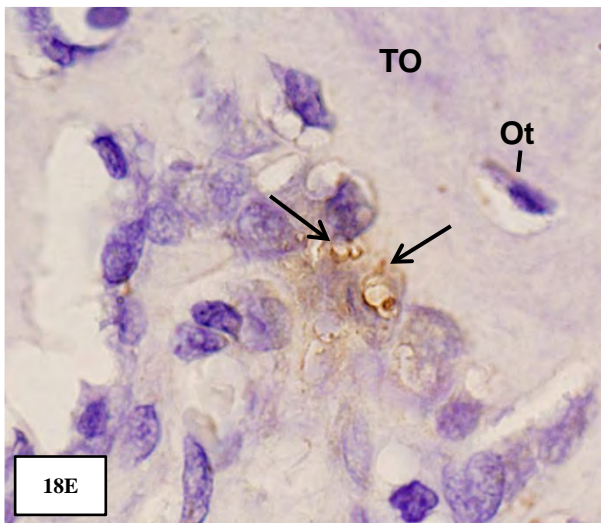
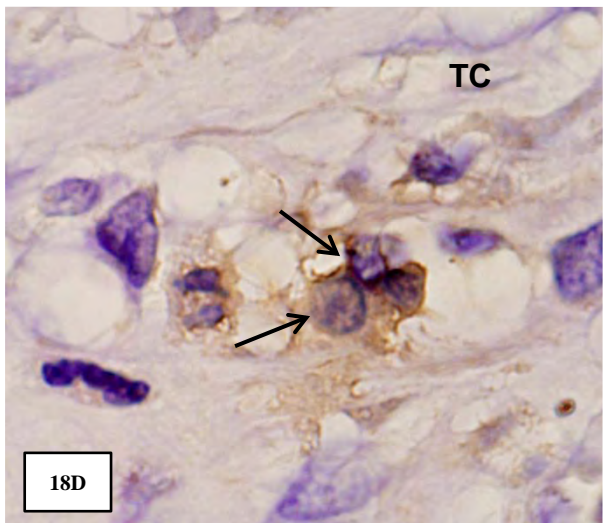
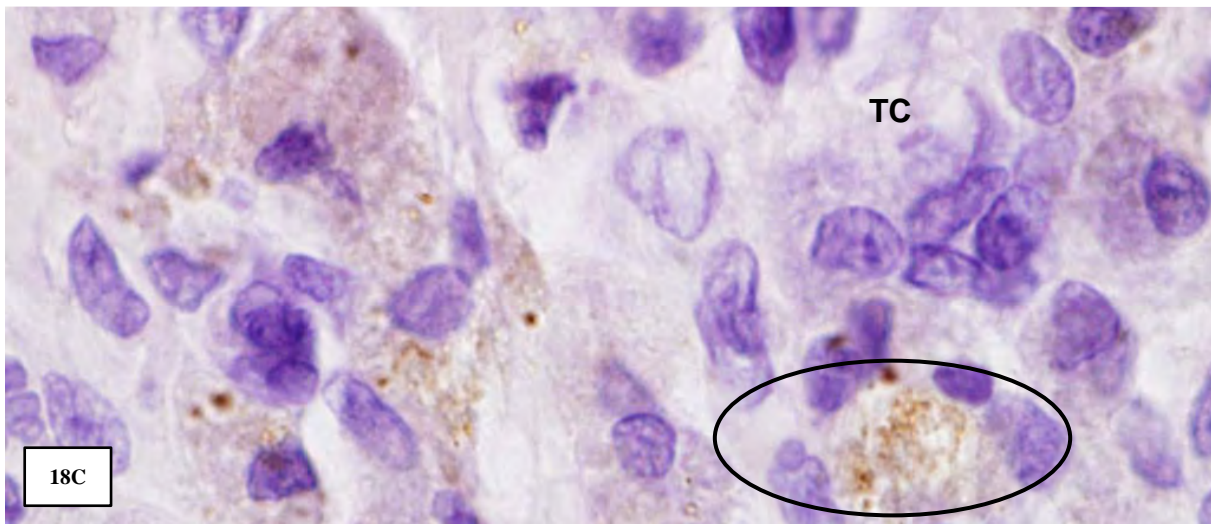
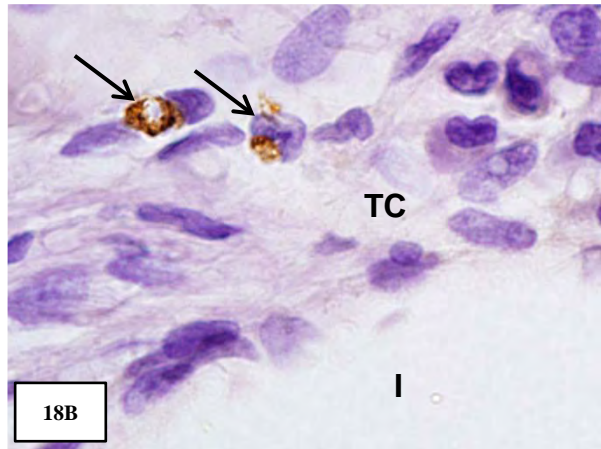
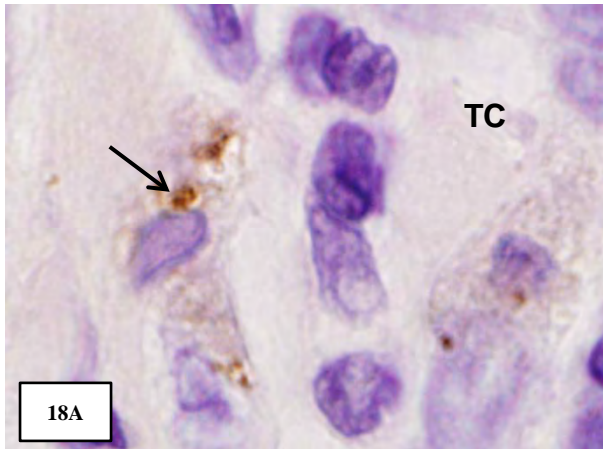
**FIGURAS 17A – 17E** Fotomicrografias de porções do alvéolo dentário contendo os implantes de MTA, as quais foram coradas com H&E. **Fig. 17A (7 dias)** – o tecido conjuntivo (TC) adjacente ao material implantado (I) exhibe diversas células inflamatórias (setas), principalmente neutrófilos, e células gigantes multinucleadas (CG). 430x. **Fig. 17B (14 dias)** – o tecido conjuntivo (TC) adjacente ao implante (I) contém numerosas células inflamatórias (setas), principalmente linfócitos e macrófagos. Na superfície interna da cápsula, nota-se uma área de necrose tecidual (asterisco). 250x. Na **fig. 17C**, área demarcada na fig. 17B, macrófagos (M) e um eosinófilo (seta) são observados na cápsula (TC). 1715x. As **figs. 17D (30 dias)** e **17E (60 dias)** mostram o tecido conjuntivo (TC) adjacente ao implante (I), exibindo células polimorfonucleares (setas), linfócitos (L) e macrófagos (M) situadas entre os fibroblastos (Fb) e fibras colágenas (Fc) da cápsula. VS, vasos sanguíneos. Fig. 17D: 320x; Fig. 17E: 330x.





A análise dos cortes submetidos à reação imuno-histoquímica para detecção de OPN revelou que as células da cápsula, nas porções adjacentes ao material implantado, não expressaram imuno-positividade nos períodos de 7, 14 e 30 dias. Aos 60 dias, diferentes regiões do tecido conjuntivo, próximas ao implante, exibiram células com áreas do citoplasma densamente positivas à OPN (Figuras 18A e 18B); porém, algumas células mostraram fraca e difusa positividade (Figura 18C). Em relação à detecção de OCN, somente no período de 14 dias verificou-se algumas células mononucleadas imuno-reativas à OCN no tecido conjuntivo adjacente ao implante (Figura 18D). Na superfície óssea das paredes laterais do alvéolo dentário, próximo aos implantes, estruturas imuno-positivas foram observadas (Figura 18E).

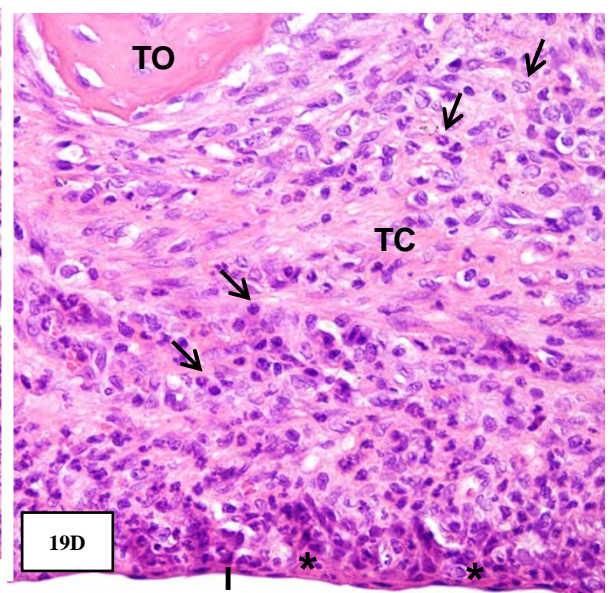
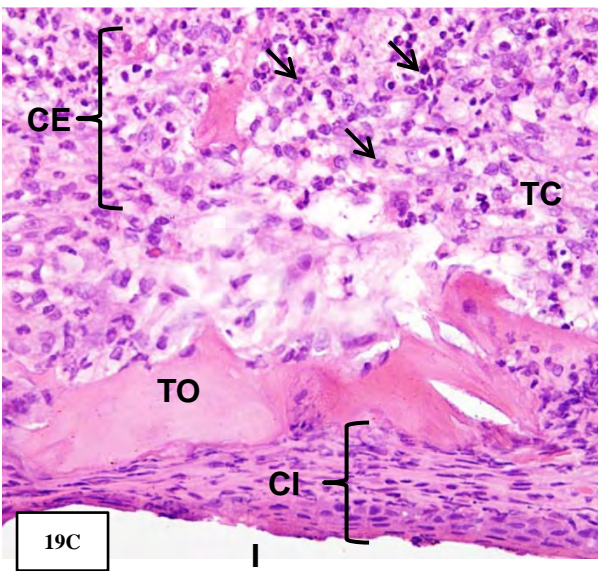
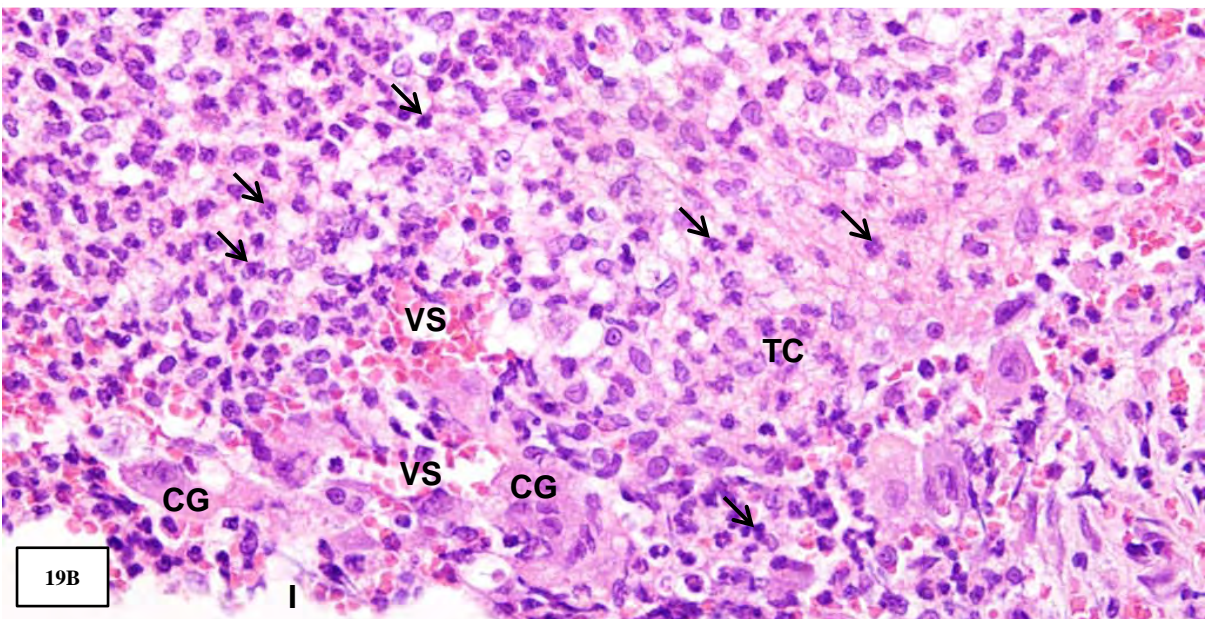
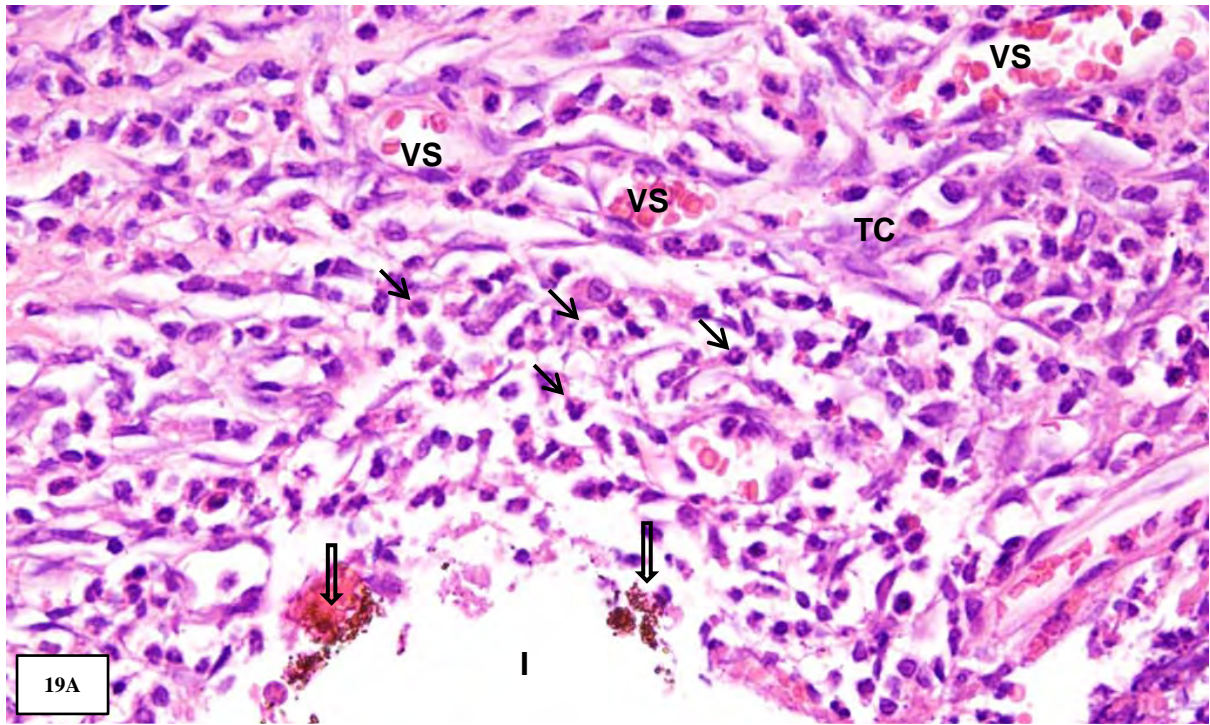
**FIGURAS 18A-18E** – Fotomicrografias de porções do alvéolo dentário contendo os implantes de MTA, as quais foram submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de OPN (Figs. 18A-18C) e OCN (Figs. 18D-18E) e contracoradas com hematoxilina. **Figs. 18A-18C (60 dias)** – células exibindo áreas do citoplasma densamente positivas à OPN (setas) são observadas no tecido conjuntivo (TC), próximo ao espaço do implante (I) (Figs. 18A e 18B); no entanto, algumas células mostram uma marcação citoplasmática difusa, como observado na área demarcada da fig. 18C. Fig.18A: 1930x; Fig.18B: 1200x; Fig.18C: 1714x. **Fig. 18D (14dias)** – um grupo de células mononucleadas fortemente imuno-marcadas à OCN (setas) estão presentes no tecido conjuntivo (TC), adjacente ao implante. 1714x. **Fig. 18E (14 dias)** – uma área exibindo positividade à OCN (setas) é observada na superfície da trabécula óssea (TO) da parede do alvéolo, próxima ao implante. Ot, osteócito. 1140x.



**Grupo CE-MTA**

Os cortes corados com H&E revelaram a presença de numerosas células inflamatórias na cápsula formada após 7 dias aos implantes; fragmentos do material foram encontrados dispersos na superfície interna da cápsula (Figura 19A). Aos 14 dias, o processo inflamatório na cápsula manteve-se acentuado, com a presença de muitos neutrófilos e células gigantes multinucleadas (Figura 19B). Aos 30 dias, a camada interna do tecido conjuntivo estava constituída por diversos fibroblastos, entretanto a camada externa apresentava muitas células inflamatórias; além disso, fragmentos de tecido ósseo foram observados próximo aos implantes (Figura 19C). No período de 60 dias, algumas células inflamatórias ainda permaneciam presentes no tecido conjuntivo; adjacente a porção externa da cápsula foi verificado presença de tecido ósseo e na superfície capsular interna, ocasionalmente, células epiteliais revestindo o espaço ocupado pela extremidade dos tubos preenchidos com CE-MTA foram observadas (Figura 19D).

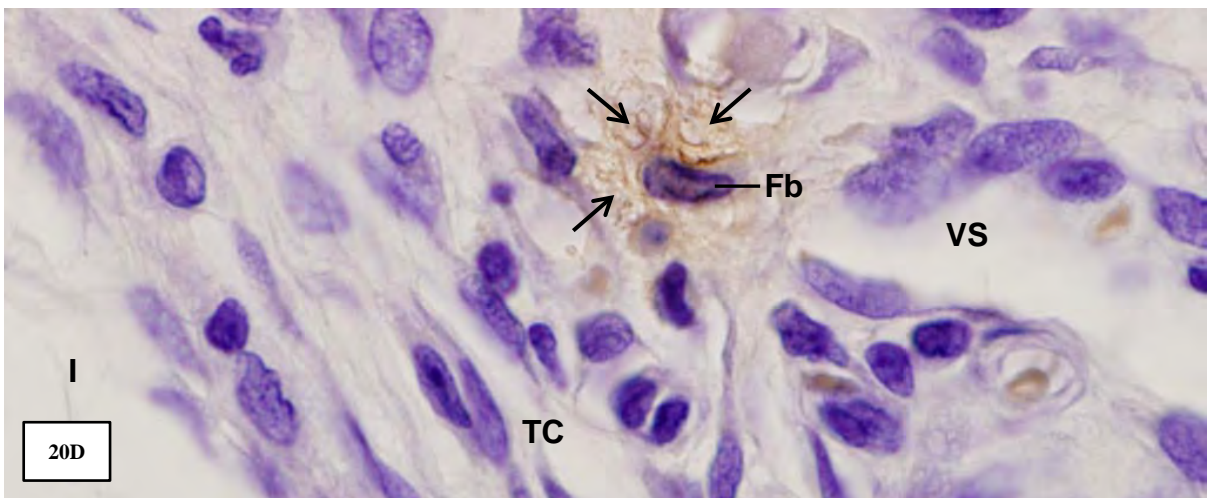
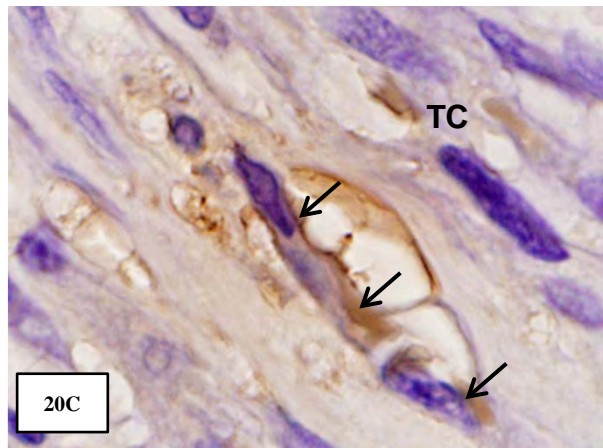
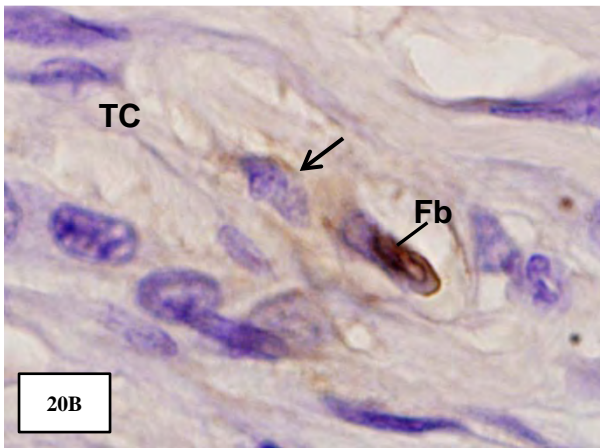
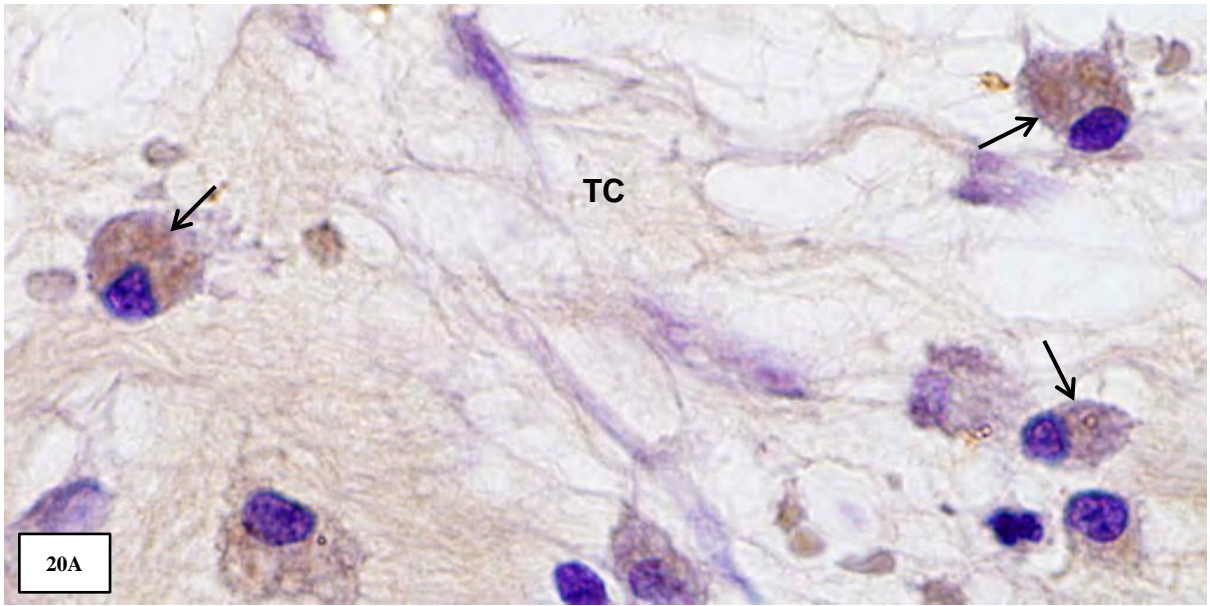
**FIGURAS 19A-19D** – Fotomicrografias de porções do alvéolo dentário contendo os implantes de CE-MTA, as quais foram coradas com H&E. **Fig. 19A (7 dias)** – a cápsula de tecido conjuntivo (TC) adjacente ao material implantado (I) exibe numerosas células inflamatórias (setas); na superfície interna da cápsula, observa-se fragmentos do material implantado (setas vazadas). VS, vasos sanguíneos. 465x. **Fig. 19B (14 dias)** – o tecido conjuntivo (TC) adjacente ao espaço ocupado pelo implante (I) contém inúmeros neutrófilos (setas) e algumas células gigantes multinucleadas (CG). VS, vasos sanguíneos. 450x. **Fig. 19C (30 dias)** – o tecido conjuntivo (TC) adjacente ao espaço do tubo implantado (I) apresenta, na sua porção interna (CI), diversos fibroblastos. Na porção externa (CE) da cápsula, várias células inflamatórias (setas) são observadas. Um fragmento de tecido ósseo (TO) é observado entre as porções “CI” e “CE” da cápsula. 245x. **Fig. 19D (60 dias)** – algumas células inflamatórias (setas) estão presentes no tecido conjuntivo (TC), adjacente ao espaço ocupado pelo tubo (I). Próximo à cápsula (TC), uma porção de trabécula óssea em formação (TO) é observada. Note que a porção mais interna da cápsula contém células epiteliais (asteriscos) revestindo o espaço ocupado pela extremidade do tubo com o MTA-experimental. 230x.



A análise dos cortes submetidos à reação imuno-histoquímica para detecção de OPN, no período de 7 dias, mostrou células mononucleadas, dispersas no tecido conjuntivo, exibindo citoplasma imuno-positivo (Figura 20A). Nos períodos de 14, 30 e 60 dias, as células da cápsula adjacente aos implantes não expressaram imuno-reatividade à OPN. As reações imuno-histoquímicas para detecção de OCN revelaram imuno-reatividade em algumas células da cápsula, nos períodos de 7 e 14 dias (Figura 20B). Nos períodos de 30 e 60 dias, além da imuno-reatividade à OCN ser observada em alguns fibroblastos, ocasionalmente uma marcação positiva difusa foi encontrada na matriz extracelular do tecido conjuntivo (Figuras 20C e 20D).

**FIGURAS 20A – 20D** – Fotomicrografias de porções do alvéolo dentário contendo os implantes de CE-MTA, as quais foram submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de OPN (Fig. 20A) e OCN (Figs. 20B-20D) e contracoradas com hematoxilina. **Fig. 20A (7 dias)** – numa porção da cápsula (TC), próxima ao implante, células mononucleadas exibindo núcleo excêntrico apresentam positividade à OPN (setas). 1714x. **Fig. 20B (7 dias)** – um fibroblasto (Fb) fortemente imuno-positivo a OCN está presente no tecido conjuntivo (TC); próximo à célula “Fb”, outro fibroblasto (seta) expressa fraca positividade à OCN. 1714x. **Fig. 20C (30 dias)** – forte positividade à imuno-histoquímica para detecção de OCN é observada em fibroblastos (setas) do tecido conjuntivo (TC), adjacente ao material implantado. Note que nas áreas adjacentes aos fibroblastos, uma forte marcação também é observada na matriz extracelular. 1715x. **Fig. 20D (30 dias)** – uma marcação difusa (setas) é observada na matriz extracelular ao redor de um fibroblasto (Fb), no tecido conjuntivo (TC) adjacente ao implante (I). VS, vaso sanguíneo. 1530x.





### - Densidade numérica de células inflamatórias no alvéolo dentário

Os resultados referentes à densidade de células inflamatórias no alvéolo dentário (Tabela 2) revelaram uma alta densidade destas células em todos os grupos e períodos analisados. Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos, bem como entre os diferentes períodos. Entretanto, em todos os grupos, pode-se notar que a densidade de células inflamatórias foi menor aos 60 dias, em comparação aos 14 e 30 dias.

**Tabela 2** – Densidade numérica de células inflamatórias na cápsula adjacente aos implantes no alvéolo dentário, nos diferentes períodos experimentais

<i>Períodos (dias)</i>	<b>Grupos</b>			
	<i>Controle</i>	<i>CP</i>	<i>MTA</i>	<i>CE-MTA</i>
<b>7</b>	1808,6±790	1644,4±963	1109,8±467	1826±883
<b>14</b>	2284± 552,2	1371,6±536,2	1932,2± 92,2	2019,7±751,3
<b>30</b>	1763± 580	1722,2± 207,7	2053,1± 177,7	2325,9± 514
<b>60</b>	1529,6± 378,6	1171,5± 121	1260,5± 661	1111,2±681,7

M±D.P. (média ± desvio padrão)

Análises estatísticas entre os diferentes grupos e períodos:

(7= 14=30= 60; p> 0,05)

(Controle= CP= MTA= CE-MTA)

# ***DISCUSSÃO***

## **6 Discussão**

### **6.1 Implantes no subcutâneo**

Os nossos achados morfológicos suportados pela análise quantitativa de células inflamatórias na cápsula, em associação à detecção de imuno-positividade à osteopontina e osteocalcina e a presença de estruturas positivas ao von Kossa, sugerindo áreas de calcificação, indicam que o CE-MTA apresentou-se biocompatível.

A densidade numérica de células inflamatórias no tecido conjuntivo adjacente aos materiais implantados em diferentes sítios e analisados ao longo do tempo representa um dos parâmetros frequentemente utilizado para mensurar a resposta inflamatória promovida pelos materiais e, conseqüentemente, verificar as suas propriedades biológicas<sup>33,44,50,54,69,84,125,146</sup>. A instalação do processo inflamatório caracteriza-se pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular permitindo que por um processo de quimiotaxia, leucócitos migrem para o tecido lesado<sup>67</sup>. Entre os leucócitos, os neutrófilos caracterizam-se por serem polimorfonucleares e constituírem cerca de 60% do total de leucócitos circulantes; são considerados como a “primeira linha de defesa” contra os agentes estranhos ao organismo, sendo as primeiras células recrutadas para o local do trauma<sup>95,115,121,143</sup>. Os monócitos constituem um tipo de leucócito que quando migram para os tecidos originam os macrófagos; os macrófagos geralmente apresentam morfologia arredondada ou ovóide, núcleo irregular, frequentemente riniforme. A principal função dos macrófagos é a fagocitose e digestão de corpos apoptóticos, restos celulares, componentes da matriz extracelular e diversas

partículas “estranhas” ao organismo; constituem parte do Sistema Mononuclear Fagocitário, no qual estão incluídas as células precursoras dos monócitos e as diversas células da resposta imune. Portanto, o processo inflamatório inicialmente é caracterizado pela presença predominante de neutrófilos os quais com o decorrer do tempo, geralmente, diminuem quantitativamente e, em contraposição, ocorre um aumento evidente de linfócitos e macrófagos<sup>19</sup>. Os materiais MTA e Portland promoveram, inicialmente, uma resposta mais acentuada em comparação ao CE-MTA. Nos grupos CP e MTA o valor mais elevado de células inflamatórias foi verificado aos 7 dias, sendo que no período de 14 dias, embora houve uma tendência de redução, o mesmo não foi estatisticamente significativo. Por outro lado, um significativo aumento no número de células inflamatórias foi verificado no grupo CE-MTA de 7 para 14 dias, embora a média observada aos 14 dias tenha sido maior que nos demais grupos, esta diferença não foi significativa. Considerando que não foi verificada diferença estatística na densidade numérica de células inflamatórias entre os implantes de tubos de polietileno preenchido com os diferentes materiais e o grupo controle (tubos de polietileno vazio), podemos sugerir que estes materiais induziram, inicialmente, no tecido conjuntivo do subcutâneo uma resposta inflamatória moderada. Além disso, os três materiais utilizados mostraram uma redução significativa no número de células inflamatórias nos períodos de 30 e 60 dias em comparação aos de 7 e 14 dias. Portanto, os nossos resultados mostraram também que os tubos de polietileno promovem uma reação inflamatória moderada no subcutâneo nos períodos iniciais, porém aos 30 dias após o implante, a cápsula apresentou redução evidente de células

inflamatórias e presença de diversos fibroblastos entre os feixes de fibras colágenas, caracterizando a presença de um típico tecido conjuntivo em organização. Estes resultados suportam a idéia de que os tubos de polietileno constituem um modelo apropriado para a realização de implantes a fim de investigar as propriedades biológicas de materiais no subcutâneo<sup>50, 136, 146</sup>. Deve-se também considerar que, pelo menos em parte, o processo inflamatório observado nos períodos iniciais seja, possivelmente, resultado do trauma produzido durante o procedimento cirúrgico<sup>79, 136</sup>. Esta resposta tecidual observada com os tubos de polietileno é também semelhante aos resultados observados com tubos de silicone<sup>148</sup> e tubos de dentina<sup>50</sup>, os quais têm sido amplamente utilizados.

Portanto, a análise da densidade numérica de células inflamatórias na cápsula adjacente as extremidades dos tubos de polietileno revela que os materiais testados apresentaram uma resposta inflamatória semelhante à verificada no Grupo Controle, em todos os períodos analisados. No entanto, junto aos tubos contendo os materiais (MTA, CP e CE-MTA) células gigantes multinucleadas foram frequentemente observadas nos períodos de 7 e 14 dias. A presença destas células deve-se, provavelmente, a presença do material no interior dos tubos de polietileno, os quais se comportam, inicialmente, como um corpo estranho<sup>21, 50, 69, 124</sup>. Há evidências que os cimentos endodônticos liberam diversas substâncias nas primeiras horas em contato com os fluídos dos tecidos<sup>49, 50, 147</sup>. O MTA é um material constituído, principalmente, por cimento Portland, além de óxido de bismuto<sup>48, 122</sup>. Acredita-se que a reação irritante inicialmente promovida pelo MTA seja em decorrência da presença do óxido de cálcio, presente no MTA, o

qual misturado à água produz hidróxido de cálcio<sup>20, 50, 53 54, 113</sup>. Considerando que o hidróxido de cálcio promove, inicialmente, uma camada de necrose na superfície do tecido, este tem sido indicado como um dos responsáveis pela irritação inicial provocada pelo MTA<sup>117,141,146</sup>.

No período de 30 dias, a resposta tecidual aos diferentes implantes foi caracterizada pela presença de um tecido conjuntivo exibindo muitos fibroblastos, vasos sanguíneos e um leve infiltrado inflamatório, predominando células mononucleadas, semelhantemente ao observado por outros autores em relação ao MTA e CP<sup>12,36,44,-45,50,52,99,132,146</sup>. Os aspectos morfológicos da cápsula também foram similares entre os grupos, no período de 60 dias, caracterizada pela presença de uma cápsula de tecido conjuntivo organizado constituído por feixes de fibras colágenas, fibroblastos e com raras células inflamatórias.

A cápsula adjacente aos tubos preenchidos com CE-MTA, nos períodos iniciais, apresentou frequentemente partículas de material dispersas no tecido conjuntivo, muitas vezes circundadas por células gigantes. A presença destas partículas de material na cápsula indica que o CE-MTA exibiu solubilidade, pelo menos, nos períodos iniciais, considerando que nos períodos de 30 e 60 dias verificou-se uma aparente redução na quantidade de partículas na cápsula; esta redução deve-se, provavelmente, a atividade fagocitária de macrófagos e células gigantes multinucleadas, presentes nos períodos iniciais. Além disso, a superfície interna das cápsulas justapostas à superfície do material experimental frequentemente apresentou-se irregular, o que deve ser resultado da solubilidade deste material. O material experimental contém além do MTA componentes

resinosos os quais têm demonstrado serem moderadamente tóxicos em estudos *in vivo* e *in vitro*<sup>100,107,128</sup>. Há evidências que alguns destes componentes resinosos são altamente solúveis, promovendo interações com os tecidos<sup>118</sup>. É possível que esta solubilidade seja responsável pelo recrutamento das células inflamatórias, inicialmente do tipo polimorfonucleares, principalmente neutrófilos, as quais foram substituídas gradativamente pelas células mononucleadas, principalmente linfócitos e monócitos. A significativa redução no número de células inflamatórias, associado à presença de uma cápsula, exibindo aspectos estruturais típicos de um tecido conjuntivo, indica que o CE-MTA é um material biocompatível.

Os resultados imuno-histoquímicos revelaram que, a partir do período de 14 dias, a cápsula formada em resposta ao CE-MTA apresentou células com imuno-reatividade à osteopontina (OPN) e osteocalcina (OCN). Imuno-positividade à OPN e OCN foi semelhantemente observada na cápsula adjacente aos implantes do CP. Embora, no grupo MTA a imuno-positividade à OCN foi observada também a partir do período de 14 dias, a positividade à OPN foi somente detectada em células da cápsula no período de 60 dias. A osteopontina e a osteocalcina são proteínas não colágenas da matriz extracelular de tecido mineralizado e, portanto, são secretadas principalmente pelos osteoblastos<sup>40,43,96,112,140</sup>.

A função principal atribuída a osteopontina está relacionada à biomineralização. Devido à sua abundância no tecido ósseo, OPN é um potente regulador da formação e mineralização óssea<sup>43</sup>, além de desempenhar um papel no recrutamento de osteoblastos e na diferenciação dos osteoclastos<sup>103</sup>. A sua



presença marcante tem sido observada nas linhas cimentantes, situadas entre o tecido ósseo maduro e o neoformado<sup>43</sup>. Além de sua localização no tecido ósseo, a OPN também pode acumular-se nos locais de calcificação patológica em tecidos moles, também conhecidos como calcificações ectópicas. Por exemplo, a calcificação ectópica e elevados níveis de OPN tem sido relatados em lesões avançadas arterioscleróticas<sup>42</sup>, pedras renais<sup>66,82</sup>, placa dentárias<sup>62</sup> e tumores associados a calcificações<sup>10</sup>. Nestes estudos, o acúmulo de OPN foi atribuído as células presentes, ou seja, as células do músculo liso e endoteliais, bem como aos macrófagos<sup>10, 42, 62, 66, 82</sup>. Além disso, em processos patológicos, tem sido atribuída a OPN uma participação na cicatrização, pois tem sido sugerido que ela regula a migração, adesão celular e sobrevivência de células mesenquimais, epiteliais e inflamatórias<sup>29, 43, 73, 77</sup>. A OPN foi detectada em odontoblastos em diferenciação em áreas de exposições pulpares em molares de ratos, quando o MTA foi usado como material de capeamento, sugerindo que esta proteína deva desempenhar um importante papel no início do processo de reparação pulpar<sup>68</sup>. Recentemente, foi sugerido que esta proteína possa também participar no recrutamento de macrófagos em infecções endodônticas<sup>104</sup>. Considerando que a OPN foi detectada a partir dos 14 dias, é possível que a expressão desta proteína em algumas células da cápsula possa estimular a migração de células, sejam mesenquimais e/ou macrófagos. As células mesenquimais originando fibroblastos, responsáveis pela síntese do colágeno e, conseqüentemente, fornecendo à cápsula o seu aspecto de tecido conjuntivo típico o qual é encontrado aos 30 dias; enquanto que os macrófagos, com presença evidente aos 14 dias, participando na fagocitose de

restos de células e material, atuando, portanto, no processo de remodelação da cápsula.

A OCN, uma proteína específica do tecido ósseo, é sintetizada principalmente por osteoblastos, sendo usada como um bom marcador de atividade osteogênica<sup>88</sup>. É uma proteína não colágena altamente expressa no tecido ósseo, desempenhando um importante papel regulador na mineralização<sup>138</sup>. Portanto, a presença de células positivas a OCN adjacentes aos diferentes materiais sugere que algumas células do subcutâneo, possivelmente células mesenquimais, possam sofrer diferenciação e expressar o fenótipo de células típicas de tecido mineralizado<sup>6</sup>. Recentemente, um estudo *in vitro* demonstrou que células tronco mesenquimais, derivadas da medula óssea de ratos, podem se diferenciar em células osteogênicas, exibindo expressão gênica (RNA mensageiro) para OCN<sup>88</sup>. Outra possibilidade é que como a osteopontina e a osteocalcina não são fisiologicamente encontradas no subcutâneo<sup>8</sup>, é possível que a presença de células imuno-reativas neste sítio ectópico seja oriunda de células progenitoras de osteoblastos provenientes da circulação sanguínea. Portanto, os materiais testados poderiam exercer algum efeito osteoindutor, considerando que estariam estimulando a migração de células osteoprogenitoras para um sítio ectópico<sup>91</sup>.

Considerando que no Grupo Controle não foi detectada qualquer imuno-reatividade, seja para OPN ou para OCN, os nossos achados indicam que os materiais (CP, MTA e CE-MTA) induziram as células do tecido conjuntivo do subcutâneo a expressarem fenótipo de células semelhantes aos osteoblastos

(“osteoblastos-like cells”). É possível que os componentes resinosos tenham contribuído de alguma forma para obtenção destes resultados; esta hipótese é reforçada pelo fato que no Grupo MTA a imuno-expressão foi discreta quando comparada a observada na cápsula adjacente ao CE-MTA. No entanto, os possíveis mecanismos celulares e moleculares que possam explicar estas diferenças entre os materiais ainda são desconhecidos para nós.

Assim como imuno-reatividade à OPN e OCN foi detectada em células das cápsulas formadas junto aos materiais CP, MTA e CE-MTA, estruturas marcadas pelo von Kossa foram também observadas. O método de von Kossa baseia-se no princípio de que os íons prata presentes no meio de incubação podem ser deslocados para o carbonato ou para os radicais de fosfato quando presentes nos tecidos. Desde que as formas de carbonato e de fosfato presentes nos tecidos estão, invariavelmente, associadas aos íons cálcio, este método é usado para evidenciar local de deposição de cálcio nos tecidos<sup>9,60</sup>. Portanto, os nossos achados indicam que os materiais promovem a deposição de estruturas calcificadas no subcutâneo de ratos; estas estruturas foram encontradas nos períodos de 7-30 dias, semelhantemente aos achados de outros autores<sup>44-46,52-55</sup>. As estruturas marcadas pelo von Kossa apresentaram-se geralmente como depósitos distribuídos difusamente entre os componentes da cápsula; alguns depósitos foram encontrados na periferia de estruturas ovóides de contorno irregular. Os nossos achados indicam fortemente que estas estruturas positivas ao von Kossa representam depósitos de cálcio no tecido; esta possibilidade é sustentada sendo

que nos cortes tratados pelo EDTA (quelante de cálcio) e submetidos a reação de von Kossa estas estruturas não apresentaram qualquer sinal de positividade.

Uma possível explicação destas estruturas calcificadas está na presença do óxido de cálcio na constituição destes materiais; este em contato com a água produz o hidróxido de cálcio<sup>20,35,50,53,87,113</sup>. O hidróxido de cálcio formado exerce um papel irritante aos tecidos, promovendo uma necrose superficial na camada tecidual em íntimo contato com o MTA<sup>20,35,50,53,142</sup>. No entanto, em contato com os fluídos teciduais, há a dissociação do hidróxido de cálcio em íons hidroxila e cálcio; os íons cálcio podem reagir com o carbonato presente nos tecidos formando grânulos de calcita<sup>50,53</sup>, positivos ao von Kossa. Estas estruturas calcificadas, provavelmente, não foram encontradas aos 60 dias, talvez por representarem calcificações resultantes de uma necrose tecidual causada pelos materiais, sendo, posteriormente fagocitadas por macrófagos e células gigantes multinucleadas por apresentarem-se como uma calcificação distrófica.

O grupo CP apresentou escassas áreas positivas ao von Kossa; estes resultados podem estar relacionados a algumas pequenas diferenças na composição do CP em relação ao MTA. Dentre os componentes do CP estão os materiais pozolânicos: materiais silicosos ou silico-aluminosos que quando finalmente divididos e na presença de água, reagem com hidróxido de cálcio<sup>127</sup>. Foi demonstrado que o CP contém uma quantidade 3 vezes maior de silício em comparação ao encontrado no MTA<sup>94,122</sup>. O silício é um elemento químico relativamente inerte, resistente à ação da maioria dos ácidos e reage com halógenos e álcalis<sup>97,105</sup>. Uma base, também chamada de álcali, é qualquer

substância que libera única e exclusivamente o ânion  $\text{OH}^-$  (íons hidroxila) em solução aquosa<sup>105</sup>. Portanto, como o CP tem o pH básico, em torno de 12,5, comporta-se diante dos tecidos de maneira semelhante ao MTA<sup>31,110,119,120</sup>. No entanto, é possível que o silício, presente em maior quantidade no CP, possa reagir com o hidróxido de cálcio, formado pela reação do óxido de cálcio presente no Portland com a água<sup>20,50,53,113</sup>, originando o silicato de cálcio e, conseqüentemente, impedindo ou diminuindo a liberação de íons cálcio. Dessa maneira, o carbonato de cálcio seria depositado em menor quantidade e, portanto, o CP induziria, em menor grau, a formação dos grânulos de calcita nas áreas de necrose do tecido em contato com o material<sup>50,53</sup>.

## 6.2 Implantes no alvéolo dentário

Os resultados morfológicos, quantitativos e imuno-histoquímicos obtidos no alvéolo dentário indicaram que este sítio não se apresentou como um modelo adequado para o estudo da resposta biológica dos materiais. A resposta aos diferentes implantes no alvéolo dentário caracterizou-se como intenso processo inflamatório, com presença predominante de neutrófilos, nos períodos iniciais. Este processo inflamatório persistiu até os 60 dias após os implantes; no período de 60 dias verificou-se uma redução no número de células inflamatórias, embora esta não tenha sido estatisticamente significativa em comparação aos demais períodos analisados. Assim, aos 60 dias a cápsula adjacente aos implantes exibia diversos fibroblastos entre os feixes de fibras colágenas, no entanto, inúmeras células mononucleadas, predominantemente linfócitos e monócitos, persistiam

caracterizando um processo inflamatório crônico. É possível que estes resultados possam ser explicados devido às dificuldades relacionadas ao procedimento cirúrgico, pois, o incisivo superior de ratos apresenta acentuada curvatura, o que dificultou a sua extração. Embora, foram realizadas a sindesmotomia e luxação do incisivo previamente à extração, a qual se procedeu de maneira a acompanhar a curvatura do dente<sup>93</sup>, parece que esta foi frequentemente acompanhada pela fratura do septo nasal. Além disso, os tubos de polietileno, com diâmetro e comprimento padronizados<sup>26</sup>, apresentaram alguma resistência para serem inseridos nos alvéolos, principalmente, quando o coágulo já estava formado. A presença do processo inflamatório adjacente aos implantes, inclusive aos tubos de polietileno vazios, pode ser em decorrência da possível comunicação do implante com o meio externo e conseqüente contaminação do alvéolo devido à dificuldade de inserção do tubo e da oclusão da mucosa de maneira a obliterar eficientemente o alvéolo após a extração dentária; isto poderia explicar a ocasional presença de epitélio envolvendo parcialmente alguns implantes.

No entanto, a presença do processo inflamatório, adjacente aos tubos de polietileno, não impediu a deposição de matriz óssea junto às paredes laterais do alvéolo dentário. Esta atividade osteogênica foi confirmada pelos achados imuno-histoquímicos os quais mostraram uma evidente reatividade à OPN e OCN exibida pelas células ósseas. A osteopontina e osteocalcina são proteínas não colágenas tipicamente encontradas na matriz óssea, sintetizadas pelos osteoblastos. A OCN, considerada um marcador de osteoblasto maduro, parece desempenhar um importante papel no processo de mineralização<sup>88, 96, 140, 112, 138</sup>.

Algumas células da cápsula adjacente aos materiais implantados também expressaram positividade a estas proteínas, sugerindo que estas células possam estar se diferenciando em osteoblastos durante o processo de reparação do alvéolo dentário<sup>74</sup>. Sabe-se que os fibroblastos dos remanescentes do ligamento periodontal, após a extração dentária, proliferam-se ativamente e invadem o coágulo<sup>61</sup>. Células osteoprogenitoras oriundas dos remanescentes do ligamento periodontal migram a partir das paredes laterais do alvéolo para as regiões centrais, diferenciando-se em osteoblastos e, conseqüentemente, depositam a matriz óssea<sup>30,74</sup>. Portanto, a presença dos tubos de polietileno no interior do alvéolo dentário deve ter constituído uma barreira a reparação alveolar. É possível que os tubos de polietileno, quando inseridos, removeram os remanescentes do ligamento periodontal e também os vasos sanguíneos de algumas regiões, prejudicando a proliferação vascular e, conseqüentemente, o processo de reparo ósseo.

Apesar das limitações deste modelo de estudo, a expressão das proteínas OPN e OCN pelos osteoblastos na superfície das paredes laterais do alvéolo indicam que estes materiais não interferiram na atividade osteogênica destas células; a presença de algumas células imuno-reativas na cápsula adjacente aos implantes sugere que os materiais testados (Portland, MTA e CE-MTA) possivelmente exerçam um papel osteocondutor, como sugerido por outros autores<sup>25, 138</sup>.

***CONCLUSÃO***



## 7 Conclusão

- Os resultados morfológicos e quantitativos indicam que o CE-MTA, semelhantemente ao MTA e CP, é biocompatível;
- Os materiais MTA, CP e CE-MTA induzem as células mesenquimais do subcutâneo a expressar o fenótipo de células típicas de tecido ósseo (“osteoblasts-like-cells”); no entanto, é possível que os materiais testados exerçam algum efeito osteocondutor, estimulando a migração de células osteoprogenitoras para o sítio ectópico;
- Os materiais avaliados (CP, MTA e CE-MTA) promovem a deposição de estruturas calcificadas, identificadas pela técnica de von Kossa;
- A presença do tubo de polietileno impediu, pelo menos em parte, a reparação do alvéolo, com permanência de um intenso processo inflamatório em todos os períodos avaliados;
- Os materiais CP, MTA e CE-MTA não interferiram na atividade osteogênica das células do alvéolo dentário.

# ***REFERÊNCIAS***

## 8 Referências\*

1. Abedi HR, Ingle JI. Mineral trioxide aggregate: a review of new cement. J Calif Dent Assoc. 1995; 23: 36-9.
2. Al-Hezaimi K, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I. Human saliva penetration of root canals obturated with two types of mineral trioxide aggregate cements. J Endod. 2005; 31: 453– 6.
3. Andelin WE, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. J Endod. 2003; 29: 646–50.
4. Angelus. MTA-Angelus: cimento reparador. Londrina: Angelus.
5. Aqrabawi J. Sealing ability of amalgam, super EBA cement, and MTA when used as retrograde filling material. Br Dent J. 2000; 188: 266–8.
6. Aronow MA, Owen TA, Gerstenfeld LC, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. J Cell Physiol. 1990; 143: 213-21.
7. Asgary S, Shahabi S, Jafarzadeh T, Amini S, Kheirieh S. The Properties of a New Endodontic Material. J Endod. 2008; 34: 990 –3.
8. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. Science. 2000; 287: 860–4.

\* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

9. Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas-Neto AGF. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. In: Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas-Neto AGF. Coloração de grânulos intracelulares. Pigmento cálcio – Kossa. São Paulo: EDART - Editora da Universidade de São Paulo; 1976. p. 104.
10. Bellahcene A, Castronovo V. Expression of bone matrix proteins in human breast cancer: potential roles in microcalcification formation and in the genesis of bone metastases. *Bull Cancer*. 1997; 84: 17-24.
11. Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinology*. 1987; 121: 1985-92.
12. Bernabé PF, Holland R, Morandi R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA et al. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. *Braz Dent J*. 2005; 16: 149–55.
13. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of proroot mta to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod*. 2007; 33: 1231- 4.
14. Bogen G, Kuttler S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. *J Endod*. 2009; 35: 777–90.
15. Bonewald LF, Harris SE, Rosser J, Dallas MR, Dallas SL, Camacho NP, et al. von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif Tissue*. 2003; 72: 537-47.

16. Bortoluzzi EA, Bronn NJ, Bramante CM, Consolaro A, Garcia RB, Moraes IG et al. Mineral trioxide aggregate with or without calcium chloride in pulpotomy. *J Endod.* 2008; 34: 172–5.
17. Bortoluzzi EA, Duarte MAH, Demarchi ACCO, Bramante CM. The Use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white portland cement. *J Endod.* 2006; 32: 1194–7.
18. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, Moraes IG, Bernardineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod.* 2006; 32: 897–900.
19. Buttow NC, Cancino MEC. Técnica histológica para a visualização do tecido conjuntivo voltado para os Ensinos Fundamental e Médio. *Arq Mudi.* 2007; 11: 36-40.
20. Camilleri J, Montesin FE, Di Silvio L, PittFord TR. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J.* 2005; 38: 834-42.
21. Campos QI, Llamosas HE, Morales LR. Evaluación de la biocompatibilidad del cemento Portland implantado en tejido conectivo subepitelial de ratas. *Rev Asoc Dent Mex.* 2003; 60: 45-51.
22. Chacko V, Kurikose S. Human pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA): a histologic study. *J Clin Pediatr Dent.* 2006; 30: 203–9.

23. Chailertvanitkul P, Saunders WP, MacKenzie D. The effect of the smear layer on the microbial coronal leakage of gutta-percha root fillings. *Int Endod J.* 1996; 29: 242–8.
24. Chen D, Chen H, Feng JQ. Osteoblastic cell lines derived from a transgenic mouse containing the osteocalcin promoter driving SV40 T-antigen. *Mol Cell Diff.* 1995; 3: 193-212.
25. Chen CL, Huang TH, Ding SJ, Shie MY, Kao CT. Comparison of calcium and silicate cement and mineral trioxide aggregate biologic effects and bone markers expression in MG63 cells. *J Endod.* 2009; 35: 682–5.
26. Cintra LTA, Moraes IG, Estrada BPF, Gomes-Filho JE, Bramante CM, Garcia RB et al. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *J Endod.* 2006; 32: 556-9.
27. De Deus G, Petruccelli V, Gurgel Filho E, Coutinho Filho, T. MTA versus Portland cement as repair material for furcal perforations: a laboratory study using a polymicrobial leakage model. *Int Endod J.* 2006; 39: 293-6.
28. DeGroot ME, Oguntebi BR, Cunningham CJ, Pink R. A comparison of tissue reactions to Ketac-Fil and Amalgam. *J Endod.* 1995; 21: 65–9.
29. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest.* 2001; 107: 1055-61.
30. Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 31: 641-45.

- 
31. Duarte MA, Demarchi ACO, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SC. pH and calcium ion release of 2 root-end filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95: 345-7.
  32. Duarte MAH, Kadre GDOD, Vivian RR, Tanomaru JMG, Tanomaru MF, Moraes IG. Radiopacity of portland cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod.* 2009; 35: 737-40.
  33. Erausquin J, Muruzábal M. Tissue reaction to root canal cements in the rat molar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1968; 26: 361-73.
  34. Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J.* 2000; 11: 3-9.
  35. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J.* 1995; 6: 85-90.
  36. Faraco Jr IM, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol.* 2001; 17: 163-6.
  37. Fransen JN, He J, Glickman GN, Rios A, Shulman JD, Honeyman A. Comparative assessment of ActiV GP/Glass ionomer sealer, Resilon/Epiphany, and gutta-percha/ AH plus obturation: a bacterial leakage study. *J Endod.* 2008; 34: 725-7.

38. Gandolfi MG, Perut F, Ciapetti G, Mongiorgi R, Prati C. New portland cement-based materials for endodontics mixed with articaine solution: a study of cellular response. *J Endod.* 2008; 34: 39-44.
39. Garcia JMQ. Imunodeteccção in vivo e in vitro de proteínas da matriz óssea (osteonectina, sialoproteína óssea e colágeno tipo I) em polpas dentárias de humanos [tese de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.
40. Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler W T, Sorensen ES, et al. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int.* 2005; 77: 45-54.
41. Gerstenfeld LC, Chipman SD, Glowacki J, Lian JB. Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev Biol.* 1987; 122: 49-60.
42. Giachelli, C., Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1993; 92: 1686-96.
43. Giachelli CM, Steitz S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol.* 2000; 19: 615-22.
44. Gomes-Filho JE, Faria MD, Bernabé PFE, Nery MJ, Otoboni-Filho A, Dezan-Júnior E, et al. Mineral trioxide aggregate but no light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. *J Endod.* 2008; 34: 62-5.



45. Gomes-Filho JE, Rodrigues G, Watanabe S, Bernabe PFE, Lodi CS, Gomes AC, et al. Evaluation of the Tissue Reaction to Fast Endodontic Cement (CER) and Angelus MTA. *J Endod.* 2009; 35: 1377–80.
46. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PFE, Costa MTM. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod.* 2009; 35: 256–60.
47. Grossman LI. *Endodontic practice.* 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1982. 279 p.
48. Hashem AA, Hassanien EE. ProRoot MTA, MTA-Angelus and IRM used to repair large furcation perforations: sealability study. *J Endod.* 2008; 34: 59–61.
49. Holland R, Souza V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endod.* 1985; 11: 535-43.
50. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JÁ, Bernabé PFE, Dezan Jr E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide. *J Endod.* 1999; 25: 161-6.
51. Holland R, Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J.* 2001; 12: 109-13.

52. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J.* 2001; 12: 3-8.
53. Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabé FE, Filho JA, Junior ED, et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod.* 2002; 28: 173-6.
54. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J.* 2002; 13: 23-6.
55. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *J Endod.* 2006; 32: 776-80.
56. 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 107: 96-102.
57. Iwamoto M, Shapiro IM, Yagami K, Boskey AL, Leboy PS, Adams SL, et al. Retinoic acid induces rapid mineralization and expression of mineralization-related genes in chondrocytes. *Exp Cell Res.* 1993; 207: 413-20.

- 
58. Jacobovitz M, Vianna ME, Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Gomes BP. Root canal filling with cements based on mineral aggregates: a in vitro analysis of bacterial microleakage. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108: 140-4.
59. Jacobson HL, Xia T, Baumgartner JC, Marshall JG, Beeler WJ. Microbial leakage evaluation of the continuous wave of condensation. *J Endod.* 2002; 28: 269–71.
60. Junqueira LCU, Junqueira LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. In: Junqueira LCU, Junqueira LMMS. *Colorações de uso geral. Métodos para o tecido ósseo.* São Paulo: Santos, 1983. p. 65-6.
61. Kanyama M, Kuboti T, Akiyama K, Nawachi K, Miyauchi FM, Yatani H, et al. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Arch Oral Biol.* 2003; 48: 723-30.
62. Kido J, Kasahara C, Ohishi K. Identification of osteopontin in human dental calculus matrix. *Arch Oral Biol.* 1995; 40: 967-72.
63. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod.* 2006; 32: 569 –72.
64. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1998; 24: 543-7.
65. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, MacDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 1997; 37: 432-9.

- 
66. Kohri K., Nomura S., Kitamura Y. Structure and expression of the mRNA encoding urinary stone protein (osteopontin). *J Biol Chem.* 1993; 258: 15180-4.
67. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Inflamação agudo e crônica. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins e Cotran, bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 49-90.
68. Kuratate M, Yoshida K, Shigetani Y, Yoshida N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2008; 34: 970 –4.
69. Lalis RM, Esaín ML, Kokubu GA, Willis J, Chaves C, Grana DR. Rat subcutaneous tissue response to modified portland cement, a new mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J.* 2009; 20: 112-7.
70. Lao M, Marino V, Bartold PM. Immunohistochemical study of bone sialoprotein and osteopontin in healthy and diseased root surfaces. *J Periodontol.* 2006; 77: 1665-73.
71. Lee YL, Lee BS, Lin AY, Lan WH, Lin CP. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. *Biomater.* 2004; 25: 787-93.
72. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. The sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod.* 1993; 19: 541–4.

73. Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross S, Cheresch DA, Schwartz SM, et al. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins: role of in smooth muscle migrationto osteopontin. *J Clin Invest.* 1995; 95: 713-24.
74. Lin WL, McCulloch CA, Cho MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec.* 1994; 240: 492–506.
75. Lomri A, Marie PJ, Tran PV, Hott M. Characterization of endosteal osteoblastic cells isolated from mouse caudal vertebrae. *Bone.* 1988; 9: 165-75.
76. Lotfi M, Vosoughhosseini S, Saghiri MA, Mesgariabbasi M, Ranjkesh B. Effect of white mineral trioxide aggregate mixed with disodium hydrogen phosphate on inflammatory cells. *J Endod.* 2009; 35: 703–5.
77. Lund AS, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J Cell Commun Signal.* 2009; 3: 311–22.
78. Madison S, Wilcox LR. An evaluation of coronal microleakage in endodontically treated teeth: part III—in vivo study. *J Endod.* 1988; 14: 455–8.
79. Makkes PC, Van Velzen SKT, Wesselink PR, de Greeve PCM. Polyethylene tubes as a model for the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977; 44: 293–300.

- 
80. Marsh ME, Munne AM, Vogel JJ, Cui I, Franceschi RT. Mineralization of bone-like extracellular matrix in the absence of functional osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 1995; 10: 1635-43.
81. Matt GD, Thorpe JR, Stronther JM, McClanahan SB. Comparative study of white and gray mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one- or two-step apical barrier technique. *J Endod.* 2004; 30: 876-9.
82. McKee MD, Nanci A, Khan S.R. Ultrastructural immunodetection of osteopontin and osteocalcin as major matrix components of renal calculi. *J Bone Min Res.* 1995; 10: 1913-29.
83. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 2004; 98: 376-9.
84. Morais CAH, Bernardineli N, Garcia RB, Duarte MAH, Guerisoli DMZ. Evaluation of tissue response to MTA and Portland cement with iodoform. *Oral Surg Oral Méd Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 417-21.
85. Moretton TR, Brown Junior CE, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res.* 2000; 52: 528-33.
86. Morinaga K, Nakagawa KI, Carr GB. Tissue reactions after intraosseous implantation of three retrofilling materials. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2003; 44: 1-7.

- 
87. Motta A, Gomes DA, Lopes HP, Corrêa TJS, Pinheiro AR, Rebouças AAP. Reaction of rat connective tissue to implanted Mineral Trioxide Aggregate (MTA) and to calcium hydroxide. *Rev Bras Odontol.* 2003; 60: 274-6 2003.
88. Nakamura A, Dohi Y, Akahane M, Ohgushi H, Nakajima H, Funoaka H et al. Osteocalcin secretion as an early marker of *in vitro* osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part C: Methods.* 2009; 15: 169-80.
89. Nary Filho H, Okamoto T. Avaliação da biocompatibilidade de implantes de Hapset em feridas de extração dental. *Rev Fac Odont Bauru.* 1996; 4: 55– 64.
90. Nascimento C, Issa JPM, Iyomasa MM, Regalo SCH, Siéssere S, Pitol DL et al. Bone repair using mineral trioxide aggregate combined to a material carrier, associated or not with calcium hydroxide in bone defects. *Mícron.* 2008; 7: 868-74.
91. Oda JY, Carvalho J. Cicatrização do periodonto: revisão. *Arq Ciênc Saúde Unipar.* 2004; 8: 159-72.
92. Okamoto T. Estudo histoquímico da reatividade do tecido conjuntivo alveolar após extrações dentais (tese de doutorado). Araçatuba: Faculdade de Odontologia da UNESP; 1964.
93. Okamoto T, Carvalho ACP, Milanezi LA, Tagliavini RL. Implante de boplant em alvéolos dentais. Estudo histológico em ratos. *Rev Fac Odont Araçatuba.* 1974; 3: 13–21.

94. Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro ALB, Costa AT, Pozza DH. Comparative chemical study of MTA and portland cements. *Braz Dent J.* 2007; 18: 3-7.
95. O'Shea JJ, Murray PJ. Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity.* 2008; 28: 477-87.
96. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of bone extracellular matrix. *J Cell Physiol.* 1990; 143: 420-30.
97. Peixoto EMA. Elemento químico: silício. *Quím Nova Esc.* 2001; 14: 30.
98. Penteado R, Romito GA, Pustiglioni FE, Marques MM. Morphological and proliferative analysis of the healing tissue in human alveolar sockets covered or not by an e-PTFE Membrane: a preliminary immunohistochemical and ultrastructural study. *Braz J Oral Sci.* 2005; 4: 664-9.
99. Pitt Ford TR, Torabinejad M, Mckendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of Mineral Trioxide Aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1995; 79: 756-63.
100. Rathbun MA. Cytotoxicity of a BIS-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 443-57.



101. Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relationship to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int Endod J.* 1995; 28: 12–8.
102. Rey C, Kim HM, Gerstenfeld L, Glimcher MJ. Structural and chemical characteristics and maturation of the calcium phosphate crystals formed during the calcification of organic matrix synthesized by chicken osteoblasts in cell culture. *J Bone Miner Res.* 1995; 10: 1577-88.
103. Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, et al. Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res.* 1998; 13: 1101–11.
104. Rittling SR, Zetterberg C, Yagiz K, Skinner S, Susuki N, Fujimuras A et al. Protective role of osteopontin in endodontic infection. *Immunology.* 2009; 129: 105–14.
105. Rochow, EG. Silicon and siliconas. Berlim: Springer; 1987. 180 p.
106. Rowe, AHR. Effects of root filing materials on the periapical tissues. *Br Dent.* 1967; 7: 98-102.
107. Ruenggeberg FA, Caughman WF, Curtis JW Jr. Effect of light intensity and exposure duration on cure of resin composite. *Oper Dent.* 1994; 19: 26–32.
108. Safavi KE, Spangberg LS, Costa Junior NS, Sapounas G. An in vitro method for longitudinal evaluation of toxicity of endodontic sealers. *J Endod.* 1989; 15: 484–6.

- 109.Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95: 483-9.
- 110.Santos AD, Moraes JCS, Araújo EB, Yukimitu K, Valério Filho WV. Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. *Int Endod J.* 2005; 38: 443-7.
- 111.Santos AD, Araújo EB, Yukimitu K, Barbosa JC, Moraes JCS. Setting time and thermal expansion of two endodontic cements. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106: 77-9.
- 112.Saraiva GL, Lazaretti-Castro M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. *Arq Brás Endocrinol Metab.* 2002; 46: 72-8.
- 113.Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2005; 31: 97-100.
- 114.Saunders WP, Saunders EM. Coronal leakage as a cause of failure in root canal therapy: a review. *Endod Dent Traumatol.* 1994; 10: 105–8.
- 115.Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev.* 2000; 177: 195-203.
116. Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PJ, Abedi HH, McMillan P. Apexification inimmature dog teeth using osteogenic protein-1, mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide. *J Endod.* 1999; 25: 1–5.

117. Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari H, Gaderian A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. *J Endod.* 2006; 32: 776-80.
118. Silva GA, Lanza LD, Lopes-Junior N, Moreira A, Alves JB. Direct pulp capping with a dentin bonding system in human teeth: a clinical and histological evaluation. *Oper Dent* 2006;31: 297–307.
119. Sipert CR, Hussne RP, Nishiyama CK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. *Int Endod J.* 2005; 38: 539-43.
120. Sluyk SR, Moon PC, Hartwell GR. Evaluation of setting properties and retention characteristics of mineral trioxide aggregate when used as a furcation perforation repair material. *J Endod.* 1998; 24: 768-71.
121. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol.* 1994; 56: 672-86.
122. Song JS, Mante FK, Romanow WJ, Kim S. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, white ProRoot MTA, and gray MTA Angelus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: 809–15.
123. Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC. The Effects of Chlorhexidine Gluconate (0.12%) on the Antimicrobial Properties of Tooth-Colored ProRoot Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2004; 30: 429-31.

- 124.Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of Connective Tissue to Amalgam, Intermediate Restorative Material, Mineral Trioxide Aggregate, and Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Chlorhexidine. *J Endod.* 2006; 32: 1094-6.
- 125.Tagger M, Tagger E. Subcutaneous reactions to implantation of tubes with AH26 and Grossman's sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986; 62: 434-40.
- 126.Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of Bone Extracellular Matrix Proteins on Osteoblast Cells in the Presence of Mineral Trioxide. *J Endod.* 2007; 33: 836-9.
- 127.Tavares A, Luiz N. Cimento portland Composto e Cimento Portland Pozolânico – Propriedades físico-mecânicas. Goiânia: Itapessoca Agroindustrial S.A., 1997. 4 p.
- 128.Teixeira HM, Do Nascimento AB, Hebling J, De Souza Costa CA. In vivo evaluation of the biocompatibility of three current bonding agents. *J Oral Rehabil.* 2006; 33: 542-50.
- 129.Torabinejad M, Falah R, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative leakage of mineral trioxide aggregate as a root end filling material. *J Endod.* 1995; 21: 109-21.
- 130.Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995; 21: 349-53.

131. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used rootend filling materials. *J Endod.* 1995; 21: 295–9.
132. Torabinejad TF, Watson, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* 1993; 19: 591–5.
133. Torabinejad M, Higa RK, McKendry DJ, Pitt Ford TR. Dye leakage of four root end filing materials: effects of blood contamination. *J Endod.* 1994; 20: 159-63.
134. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1999; 25: 197–205.
135. Torabinejad M, Pitt Ford TR, Abedi H R, Kariyawasam SP, Tang HM. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. *J Endod.* 1998; 24: 468-71.
136. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1996; 21: 379–87.
137. Tronstad L, Asbjørnsen K, Døving L, Pedersen I, Eriksen HM. Influence of coronal restorations on the periapical health of endodontically treated teeth. *Endod Dent Traumatol.* 2000; 16: 218–21.
138. Troy S, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2003; 29: 407-12.

- 
- 139.Ueno K, Katayama T, Miyamoto T, Koshihara Y. Interleukin-4 enhances in vitro mineralization in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 189: 1521-6.
- 140.Vieira JGH. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Brás Endocrinol Metab.* 1999; 43: 415-22.
- 141.Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Ali Saghiri M, et al. Influence of white versus gray Mineral Trioxide Aggregate on inflammatory cells. *J Endod.* 2008; 34: 715-7.
- 142.Wataru S, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Sbi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008; 34: 166-71.
- 143.Whal SM. Inflammation and growth factors. *J Urol.* 1997; 157: 303-5.
- 144.Wucherpfenning AL, Green D. Mineral trioxide vs. Portland cement: two biocompatible filling materials. *J Endod.* 1999; 25: 308.
- 145.Xavier CB, Weismann R, Oliveira MG. Root-end filling materials: apical microleakage and marginal adaptation. *J Endod.* 2005; 31: 539-42.
- 146.Yaltirik M, Ozbas H, Biligic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod.* 2004; 30: 95-9.
- 147.Zander HA. Reaction of the pulp to calcium hydroxide. *J Dent Res.* 1936; 18: 373-9.

148. Zmener O. Tissue response to a new methacrylate - based root canal sealer: Preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. J Endod. 2004; 30: 348-51.

***ANEXO***





FACULDADE DE ODONTOLOGIA


Proc. CEEA nº 18/2008

Araraquara, 07 de outubro de 2008

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 06/10/2008, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Avaliação histológica e imuno-histoquímica do subcutâneo e alvéolo dentário com implantes de cimentos endodônticos" (Proc. CEEA nº 18/2008) **AUTORIZA** a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada à apresentação do **RELATÓRIO FINAL (ABRIL/2010)**

Atenciosamente.

  
**Profa. Dra. ELENY BALDUCCI ROSLINDO**  
Coordenadora do CEEA

Ao  
**Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI**  
Pesquisador Responsável  
a/c Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho e Naiana Viana Viola  
Nesta

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Ararquara, 30 de março de 2010

Naiana Viana Viola