

SIMONE DI SALVO MASTRANTONIO

**Avaliação da biocompatibilidade de materiais para
remoção química da lesão de cárie: análise histológica em
tecido conjuntivo de camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Odontológicas –
Área de Odontopediatria, da Faculdade de
Odontologia de Araraquara, da Universidade
Estadual Paulista, para obtenção do título de
Mestre em Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Lizeti Toledo de
Oliveira Ramalho

Araraquara
2007

SIMONE DI SALVO MASTRANTONIO

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE MATERIAIS PARA
REMOÇÃO QUÍMICA DA LESÃO DE CÁRIE: ANÁLISE
HISTOLÓGICA EM TECIDO CONJUNTIVO DE CAMUNDONGOS**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: LIZETI TOLEDO DE OLIVEIRA RAMALHO

2º Examinador: RITA DE CÁSSIA LOIOLA CORDEIRO

3º Examinador: WILSON ROBERTO POI

Araraquara, 28 de março de 2007.

Dados Curriculares

SIMONE DI SALVO MASTRANTONIO

NASCIMENTO 05/11/1977 – São Carlos-SP

FILIAÇÃO José Luiz Roberti Mastrantonio
 Antonina Di Salvo Mastrantonio

1997-2000 Curso de Graduação na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

1998 Estágio de Treinamento na Disciplina de Histologia e Embriologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

1999-2000 Estágio de Iniciação Científica na Disciplina de Histologia e Embriologia na Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

2001 Estágio de Atualização na Disciplina de Odontopediatria na Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP

2002-2004 Curso de Especialização em Odontopediatria no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC/USP)

2005-2007 Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, área de concentração Odontopediatria, nível Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

A **DEUS**, pelo dom da vida e por sempre estar me iluminando os caminhos a serem seguidos.

À **Profa. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho**, orientadora e amiga, pela atenção, amizade e confiança em todos esses anos de convívio e pela valiosa e precisa orientação na realização deste trabalho. **MUITO OBRIGADA!**

Aos meus pais, **José Luiz e Antonina**, que não mediram esforços para que meu sonho se concretizasse.

Aos meus irmãos, **Renato e Sabrina**, pelo carinho, apoio e companheirismo.

Ao meu namorado **Renato**, pelo amor, constante paciência e sempre me apoiando nos momentos em que mais precisei.

À toda família **Di Salvo e Mastrantonio**, pelo carinho, apoio e incentivo.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP**, na pessoa de sua Diretora Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio e de seu vice-diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

À **Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas**, Profa. Dra. Rita de Cássia Loiola Cordeiro, que sempre se mostrou atenciosa e pronta para ajudar.

Ao **Departamento de Clínica Infantil** da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP representado pela chefe de Departamento Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon e pela vice-chefe Profa. Dra. Lúcia Parsekian Martins.

Ao **Departamento de Morfologia** da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP representado pela chefe de Departamento Dra. Ana Maria Minarelli Gaspar e pela vice-chefe Profa. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho.

Aos **Professores da Disciplina de Odontopediatria** da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP: Ângela Cristina Cilense Zuanon, Cyneu Aguiar Pansani, Elisa Maria Aparecida Giro, Fábio César Braga de Abreu e Lima, Josimeri Hebling Costa, Lourdes Aparecida Martins dos Santos Pinto e Rita de Cássia Loiola Cordeiro, pelos conhecimentos transmitidos, amizade e atenção durante todos esses anos.

Aos **funcionários do setor de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP: Alexandre, Flávia, Mara e Rosângela, pela atenção e pelo atendimento sempre eficiente e cordial.

Aos **funcionários do Departamento de Clínica Infantil** da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP: Totó, Célia, Dulce, Sílvia, Soninha, D. Odete, Regina, Cris, pela ajuda e atenção durante todo o curso.

Aos **funcionários do Departamento de Morfologia** da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, em especial ao técnico **Pedro Sérgio Simões**, pelo auxílio no processamento laboratorial.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP: Adriano, Ceres, Elaine, Maria Helena, Maria Inês, Marley, D. Odete e Silvia, pela disponibilidade e atenção.

Às **amigas de Mestrado**: Cármen, Michele, Nancy e Juliana pela amizade e pelo agradável convívio diário.

Aos **colegas de Pós-Graduação**: Ana Luiza, Andreza, Camila, Célia, Cris Duque, Cris Motisuki, Indri, Elcilaine, Emy, Érika, Fábio, Fernanda, Hérica, Hermes, Jonas, Júnia, Lícia, Luciana, Paula e Murilo, pela amizade e bons momentos vividos.

Aos **colegas de laboratório** Ana Paula, Athanase, Breno, Eduardo, Fernando, Frank, Flávia, Gustavo, Juliana, Mady e Rubens.

Ao **técnico José Zuanon**, pelo auxílio na confecção das fotos.

À **Márcia Bouças Miziara**, farmacêutica responsável da Farmácia Fórmula & Ação, que gentilmente nos forneceu a base do gel.

Aos **animais de laboratório** que foram imprescindíveis para realização desta pesquisa.

À **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudo.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Resumo	11
Abstract	13
Introdução	15
Proposição	21
Capítulo 1	23
Capítulo 2	57
Considerações finais	86
Referências	88
Anexos.....	95

RESUMO

Mastrantonio SS. Avaliação da biocompatibilidade de materiais para remoção química da lesão de cárie: análise histológica em tecido conjuntivo de camundongos [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade biológica in vivo de materiais odontológicos para remoção químico-mecânica do tecido cariado. Para isto, foram utilizados 32 camundongos que receberam no tecido conjuntivo subcutâneo o implante de tubos de polietileno preenchidos com CarisolvTM, Papacárie[®] e base de gel. Os animais foram sacrificados 3, 7, 20 e 30 dias após a cirurgia de implante, sendo os espécimes obtidos processados e submetidos à análise histológica. Os resultados mostraram que o CarisolvTM provocou uma inativação do metabolismo celular no período inicial, seguida de resposta inflamatória no período final. O grupo do Papacárie[®] manteve uma inflamação moderada até os 20 dias, que diminuiu de intensidade aos 30 dias e a base do gel provocou reação inflamatória discreta inicial, que aumentou aos 30 dias. Pôde-se concluir que o CarisolvTM, o Papacárie[®] e a base de gel são biocompatíveis com o tecido conjuntivo, porém as alterações provocadas por estes materiais são estatisticamente diferentes.

Palavras-chave: Materiais dentários; cárie dentária; tecido conjuntivo; histocompatibilidade.

ABSTRACT

Mastrantonio SS. Evaluation of biocompatibility of materials for chemo-mechanical removal of caries: histological analysis in connective tissue of mice. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2007.

ABSTRACT

The aim of this work was evaluate biological compatibility in vivo of dental materials to chemo-mechanical removal of caries. This study was conducted to observe in thirty-two mice subcutaneous connective tissue reaction to the implanted polyethylene tubes filled with Carisolv™, Papacárie® and gel base. The animals were sacrificed 3, 7, 20 and 30 days after the implantation procedure. The implant sites were excised and prepared for histological evaluation. The results showed that Carisolv™ inactivated the cellular metabolism in the initial period, followed by inflammatory response in the final period. The group of Papacárie® maintained moderate inflammation until 20 days, that reduced the intensity in 30 days and the gel base provoked initial discrete inflammatory reaction, that increased in 30 days. Carisolv™, Papacárie® and gel base are biocompatible with connective tissue, although alterations caused for these materials are statistically different.

Keywords: Dental materials; dental caries; connective tissue; histocompatibility.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A doença cárie ocorre quando os tecidos dentários são acometidos pela ação de bactérias acidogênicas. Na dentina, a lesão de cárie apresenta-se em duas camadas distintas. A camada mais superficial é altamente infectada, com extensa desmineralização e fibras colágenas desnaturadas, apresentando-se amolecida e sem capacidade de reorganização. A segunda camada, imediatamente abaixo, é a dentina afetada, que se caracteriza por desmineralização moderada com fibras colágenas sadias, passíveis de remineralização^{18,29}. Baseando-se nisso, foi desenvolvido o método de remoção químico-mecânica do tecido cariado, que consiste na aplicação de um produto para amolecer a dentina infectada, facilitando sua remoção e preservando o tecido dentinário sadio^{2,4,20,24}.

Este método foi inicialmente testado por Habib et al.²⁰, que utilizaram o hipoclorito de sódio, um agente proteolítico não específico capaz de dissolver material orgânico. A esta formulação inicial denominou-se GK 101 e seu modo de ação baseava-se no rompimento das pontes de hidrogênio do colágeno parcialmente degradado pela lesão de cárie, facilitando a remoção do tecido cariado^{20,22}. Para aumentar a velocidade da reação, adicionou-se ácido aminobutírico à fórmula. O novo sistema, resultante deste acréscimo, e denominado GK 101-E ou N-monocloroaminobutirato (NMAB) foi patenteado pelos Estados Unidos e aprovado na década de 80 pela Food and Drug Administration (FDA), tornando-se conhecido como sistema Caridex²⁴. Apesar da sua eficácia, o Caridex apresentava limitações na prática clínica, tais como

processo de remoção tecidual lento (10 a 15 minutos), grande volume de solução empregada (200-500ml), curto prazo de validade, alto custo, necessidade de aquecimento, e com isso, o produto não alcançou sucesso comercial, sendo retirado do mercado no início dos anos 90^{15,24,37}.

Na década de 90, na Suécia, baseando-se no mecanismo de ação do Caridex, foi desenvolvido o Carisolv^{TM*}, um gel composto basicamente por solução de hipoclorito de sódio e três aminoácidos (ácido glutâmico, leucina e lisina). Os três aminoácidos reagem com o hipoclorito de sódio, neutralizando o efeito agressivo do mesmo nos tecidos sadios^{14,15}. Para aumentar a eficácia do CarisolvTM, sua formulação original foi modificada. A diferença entre a antiga e a atual formulação do CarisolvTM está na concentração do hipoclorito de sódio, que aumentou para 0,95% e não há mais o corante eritrosina, que, em alguns casos, provocava o manchamento da estrutura dentária^{17,33}. O mecanismo de ação do CarisolvTM na remoção do tecido alterado despertou o interesse de sua utilização na Periodontia¹⁹ e Endodontia^{1,33}.

Em 2003, no Brasil, foi desenvolvido o Papacárie^{®**}, um gel constituído pela papaína, uma enzima retirada da casca do mamão, a qual possui atividade bactericida, bacteriostática e anti-inflamatória, pelo antisséptico cloramina (composto de cloro e amônia) e pelo azul de toluidina, um corante fotossensível com propriedades antimicrobianas. O Papacárie[®] rompe a ligação entre as fibrilas de colágeno da dentina cariada, deixando intacta a dentina sadia, que por não estar

* MediTeam – Sävedalen - Sweden

** Fórmula & Ação – São Paulo

desmineralizada e não ter fibrilas de colágeno expostas, não sofre a ação do produto^{8,31,37}.

O Papacárie[®] é um material recentemente lançado no mercado odontológico nacional^{8,31,37} e ainda existem poucos trabalhos científicos sobre este material e o Carisolv[™] sofreu modificações na sua formulação original¹⁷.

Apesar do tempo de utilização indicado para estes materiais ser de apenas alguns minutos, diversas situações clínicas podem ocorrer:

- após a remoção do gel da cavidade, podem permanecer resíduos do material em contato direto com o tecido dentinário sadio;
- durante a aplicação do gel pode ocorrer a difusão deste material pelo tecido dentinário podendo alcançar o tecido pulpar;
- pode ocorrer microexposição durante a remoção de lesão de cárie muito profunda, havendo o contato direto do material com o tecido pulpar.

Além disso, consta na bula do Papacárie[®] como indicação: “Para a remoção de cálculos da superfície radicular, aplicar Papacárie[®] no interior de bolsas profundas e aguardar 60 segundos...” Neste tipo de aplicação, dificilmente o material será totalmente removido do tecido conjuntivo.

Todo material odontológico deve ser submetido a testes laboratoriais e clínicos que comprovem, entre outras propriedades, a sua biocompatibilidade, promovendo sua utilização clínica segura e fornecendo maiores subsídios para seu emprego pelos profissionais^{6,11,38}. Biocompatibilidade é a habilidade de um material em extrair uma resposta biológica do organismo⁴¹.

Desde 1980, a Federation Dentaire International¹⁶ (FDI) tem recomendado uma série de testes para avaliação dos materiais odontológicos para ser permitido o uso dos mesmos em seres humanos. Segundo a International Organization for Standardization²¹ (ISO), os testes de biocompatibilidade são classificados em: iniciais ou primários (testes *in vitro*), secundários (testes *in vivo* em animais) e os de aplicação (testes clínicos)⁴¹.

O CarisolvTM, na sua composição inicial, foi avaliado quanto à citotoxicidade em cultura de fibroblastos de ratos³⁵, em tecido conjuntivo de camundongos⁵, em contato com o tecido pulpar de rato¹³ e sobre a polpa dentária humana⁷. A formulação atual também foi avaliada em contato com o tecido pulpar de rato¹⁴. Os resultados mostraram que o material, nas duas formulações, é biocompatível.

O Papacárie[®] foi avaliado quanto à biocompatibilidade *in vitro* em cultura de fibroblastos, em curto e longo prazo, e não foi considerado citotóxico⁹, mas quando em contato direto com cultura de fibroblastos pulpares humanos, por 50 segundos, apresentou atividade citotóxica²⁷.

Martins et al.²⁵ injetaram CarisolvTM e Papacárie[®] no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos e concluíram que os dois materiais são biocompatíveis.

Os testes secundários têm como finalidade eliminar qualquer produto em potencial ou componente de um produto que possa causar danos ou prejuízos aos tecidos orais. Neste nível, o material é avaliado pelo seu potencial em criar toxicidade sistêmica, toxicidade quanto à inalação, irritação e sensibilidade na pele e reação a implantes^{12,16}.

Entre os testes secundários recomendados pela FDI¹⁶, o implante de amostras de materiais odontológicos no tecido conjuntivo subcutâneo de pequenos animais é considerado um teste adequado nas etapas preliminares de pesquisa de biocompatibilidade.

Para o implante subcutâneo de material na forma de gel, muitas vezes, há necessidade de invólucros para acondicionar os materiais a serem testados, como por exemplo, tubos de polietileno^{3,10,28,36}, teflon³⁰ e PVC^{26,34}.

Dentre estes, os tubos de polietileno são os mais utilizados para avaliação biológica da toxicidade in vivo de materiais odontológicos^{3,10,23,28,32,36} porque apresentam comportamento comprovadamente inerte diante do tecido conjuntivo, não influenciando, portanto, a resposta tecidual^{39,40}.

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

OBJETIVO GERAL

Tanto o CarisolvTM, na sua nova formulação, quanto o Papacárie[®] são materiais recentemente lançados no mercado odontológico e ainda existem poucos trabalhos científicos sobre estes dois materiais. De acordo com os testes propostos pela ISO/FDI, este trabalho tem como objetivo geral avaliá-los em relação à compatibilidade biológica in vivo com o tecido conjuntivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo 1 - Comparar a reação do tecido conjuntivo de camundongos em contato com CarisolvTM e o Papacárie[®] e testar as seguintes hipóteses:

H0: Não há diferença entre as reações provocadas pelo CarisolvTM e o Papacárie[®] no tecido conjuntivo.

H1: Há diferença entre as reações provocadas pelo CarisolvTM e o Papacárie[®] no tecido conjuntivo.

Capítulo 2 - Comparar a reação do tecido conjuntivo de camundongos em contato com o Papacárie[®] e a base do gel deste material e testar as seguintes hipóteses:

H0: Não há diferença entre as reações provocadas pelo Papacárie[®] e a base do gel no tecido conjuntivo.

H1: Há diferença entre as reações provocadas pelo Papacárie[®] e a base do gel no tecido conjuntivo.

**Resposta do tecido conjuntivo de
camundongos ao implante de materiais
para remoção química da lesão de cárie***

Capítulo 1

* Artigo a ser submetido para publicação

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta do tecido conjuntivo em contato com o Papacárie[®] e com a nova formulação do Carisolv[™], que são materiais utilizados para remoção químico-mecânica do tecido cariado. A amostra consistiu de 20 camundongos que receberam no lado esquerdo do dorso, o implante de tubo de polietileno preenchido com Papacárie[®] (grupo I) e no lado direito, tubo de polietileno com Carisolv[™] (grupo II). A lateral do tubo serviu como controle. Os animais foram sacrificados 3, 7, 20 e 30 dias após a cirurgia de implante, sendo os espécimes obtidos processados e submetidos à análise histológica. No grupo I, houve uma inflamação moderada até o período de 20 dias, que diminuiu de intensidade aos 30 dias, enquanto no grupo II, ocorreu uma inativação do metabolismo celular no período inicial, seguida de resposta inflamatória no período final. Os cortes histológicos foram classificados através de escores de acordo com o grau de inflamação. Os dados foram submetidos ao teste estatístico de Mann Whitney e os resultados revelaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos períodos de 7 e 20 dias. Pôde-se concluir que o Papacárie[®] e a nova fórmula do Carisolv[™] apresentam biocompatibilidade com o tecido conjuntivo, porém houve diferença na resposta tecidual provocada por estes materiais.

Palavras-chave: Materiais dentários; cárie dentária; tecido conjuntivo; histocompatibilidade.

INTRODUÇÃO

A doença cárie ocorre quando os tecidos dentários são acometidos pela ação de bactérias acidogênicas. Na dentina, a lesão de cárie apresenta-se em duas camadas distintas. A camada mais superficial é altamente infectada, com extensa desmineralização e fibras colágenas desnaturadas, apresentando-se amolecida e sem capacidade de reorganização. A segunda camada, imediatamente abaixo, é a dentina afetada, que se caracteriza por desmineralização moderada com fibras colágenas saudáveis, passíveis de remineralização^{24,37}. Baseando-se nisso, foi desenvolvido o método de remoção químico-mecânica do tecido cariado, que consiste na aplicação de um produto para amolecer a dentina infectada, facilitando sua remoção e preservando o tecido dentinário sadio^{2,4,20,26,31}. Atualmente, existem no mercado odontológico dois materiais com esta finalidade: o Carisolv^{TM*} e o Papacárie^{®**}.

O CarisolvTM foi desenvolvido na Suécia, na década de 90, sendo constituído inicialmente por uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, três aminoácidos (ácido glutâmico, leucina e lisina), cloreto de sódio, hidróxido de sódio, carboximetilcelulose, água destilada e o corante eritrosina⁴⁸. O hipoclorito de sódio é um agente proteolítico capaz de remover componentes orgânicos, além de possuir comprovada atividade antimicrobiana²⁸. Os aminoácidos, por sua vez, quando associados ao hipoclorito de sódio, neutralizam o efeito agressivo dessa substância sobre os tecidos bucais. A interação do hipoclorito com os aminoácidos resulta na formação de cloraminas, que promovem a dissolução do colágeno

* MediTeam – Sävedalen - Sweden

** Fórmula & Ação – São Paulo

degradado pela lesão de cárie, tornando o tecido cariado amolecido e passível de remoção com instrumentos manuais, sem interferir com as estruturas sadias e a matriz de colágeno da dentina saudável^{4,31}. Para aumentar a eficácia do CarisolvTM, sua formulação original foi modificada. A diferença entre a antiga e a atual formulação do CarisolvTM está na concentração do hipoclorito de sódio, que aumentou para 0,95% e não há mais o corante eritrosina, que, em alguns casos, provocava o manchamento da estrutura dentária²³. Atualmente, o CarisolvTM também tem sido testado em bolsas periodontais, previamente aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular²⁵ e na irrigação de canais radiculares, com a finalidade de auxiliar na instrumentação mecânica^{1,44}.

O CarisolvTM, na sua composição inicial, foi avaliado quanto à citotoxicidade em cultura de fibroblastos de ratos⁴⁶, em tecido conjuntivo de camundongos⁶, em contato com o tecido pulpar de rato¹⁸ e sobre a polpa dentária humana⁹. A nova formulação também foi avaliada em contato com o tecido pulpar de rato¹⁷. Os resultados mostraram que o material, nas duas fórmulações, é biocompatível.

Em 2003, no Brasil, foi desenvolvido o Papacárie[®], um gel constituído pela papaína, enzima retirada da casca do mamão, que possui atividade bactericida, bacteriostática e anti-inflamatória, pelo antisséptico cloramina (composto de cloro e amônia) e pelo azul de toluidina, um corante fotossensível com propriedades antimicrobianas^{10,42}. O mecanismo de ação do Papacárie[®] consiste no rompimento da ligação entre as fibrilas de colágeno da dentina cariada, deixando intacta a dentina sadia, que por não estar desmineralizada e não

ter fibrilas de colágeno expostas, não sofre a ação do produto^{10,42,49}. Este material também é indicado para ser utilizado em bolsas periodontais profundas, facilitando a remoção de cálculo⁴⁰.

O Papacárie[®] foi avaliado quanto à biocompatibilidade in vitro em cultura de fibroblastos, em curto e longo prazo, e não foi considerado citotóxico¹¹, mas quando em contato direto com cultura de fibroblastos pulpare humanos, por 50 segundos, apresentou atividade citotóxica³⁵.

Martins et al.³³ injetaram Carisolv[™] e Papacárie[®] no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos e observaram que houve semelhança nas respostas histopatológicas das substâncias testadas, sendo que o Carisolv[™] apresentou menor reação tecidual inicial.

Todo material odontológico deve ser submetido a testes laboratoriais e clínicos que comprovem, entre outras propriedades, a sua biocompatibilidade, promovendo sua utilização clínica segura e fornecendo maiores subsídios para seu emprego pelos profissionais. Dentre os testes indicados pela Federation Dentaire Internationale (FDI)²¹ e International Organization for Standardization (ISO)²⁷, o implante de amostras de materiais odontológicos no tecido conjuntivo de pequenos animais é considerado teste adequado nas etapas preliminares de pesquisa de biocompatibilidade.

Para o implante subcutâneo de material na forma de gel, muitas vezes, há necessidade de dispositivos para acondicionar os materiais a serem testados, como por exemplo, tubos de polietileno^{3,13,36,47}, teflon⁴¹ e PVC^{34,45}.

Dentre estes, os tubos de polietileno são os mais utilizados para avaliação biológica da toxicidade in vivo de materiais odontológicos^{3,13,30,36,43,47} porque apresentam comportamento comprovadamente inerte diante do tecido conjuntivo, não influenciando, portanto, a resposta tecidual^{51,52}.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos em contato com o Carisolv™ e o Papacárie® nos períodos de 3, 7, 20 e 30 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram empregados 40 tubos de polietileno* com 1mm de diâmetro interno, cortados em segmentos de 10mm de comprimento, sendo que uma de suas extremidades foi fechada a quente. Antes da cirurgia, os tubos foram desinfetados em etanol 70° por 30 minutos e posteriormente, lavados em solução tampão fosfato e secos em estufa.

Foram utilizados 20 camundongos *Mus musculus* machos, pesando em média 45g. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina** na dose de 0,1 ml/100g de peso corporal, via intra-muscular, e também foi injetado o relaxante muscular cloridrato de xilazina*** na dose de 0,01 ml/100g de peso corporal. Após a anestesia, foi realizada a tricotomia na região dorsal e antisepsia do campo operatório com detergente de mamona a 16%****. A seguir, o camundongo foi posicionado em mesa operatória, compatível com seu tamanho,

* CPL Medical's - São Paulo

** Ketamina 10% – Agener União

*** Rompun - Bayer

**** Poliquil Germ – Poliquil Araraquara – Polímeros Ltda.

perfurada com tiras elásticas para imobilização dos membros superiores e inferiores. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 7mm de comprimento no tecido cutâneo da região dorsal e divulsão bilateral com tesoura de ponta romba, formando duas lojas cirúrgicas, uma a cada lado da incisão. No lado esquerdo de cada animal foi implantado tubo de polietileno previamente preenchido com Papacárie® e no lado direito, tubo de polietileno com Carisolv™ (Tabela 1). Após os procedimentos, a ferida cirúrgica foi suturada com fio de Vycril 4.0*.

Tabela 1. Divisão do número de implantes, por grupo e período.

Períodos \ Grupos	Grupo I	Grupo II	Total
3 dias	5	5	10
7 dias	5	5	10
20 dias	5	5	10
30 dias	5	5	10
Total	20	20	40

Grupo I - tubo de polietileno com Papacárie®

Grupo II – tubo de polietileno com Carisolv™

Os camundongos foram colocados em gaiolas individuais devidamente identificadas com ração balanceada e água *ad libitum* e mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP) sob condições controladas de limpeza, temperatura, umidade e luz. Após o efeito da anestesia, para evitar o desconforto pós-operatório, todos os animais receberam uma dose única de 0,23ml de paracetamol** por gavagem (adaptado de Paiva et al.³⁹).

* Ethicon – Jonhson & Jonhson

** Tylenol 100mg/ml – Janssen-Cilag

Após 3, 7, 20 e 30 dias da cirurgia, os fragmentos contendo os tubos foram removidos dos animais sob anestesia geral. Somente após a remoção destes fragmentos, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia. Em seguida, as peças foram fixadas, desidratadas, embebidas em parafina e seccionadas em cortes histológicos de 6µm em um plano longitudinal, passando pela abertura do tubo de polietileno e incluindo toda interface entre o material e o tecido conjuntivo. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.) e Tricrômico de Masson (T.M.), analisadas e fotografadas sob microscópio* acoplado à câmera digital** da Disciplina de Patologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da FOAr-UNESP.

Para a análise das reações teciduais provocadas pelos materiais, adotou-se os seguintes critérios:

- análise descritiva: baseada na presença de células residentes e itinerantes do tecido conjuntivo, análise da substância intercelular amorfa e fibrosa, assim como a qualidade e estrutura dos vasos sangüíneos presentes no local.
- análise estatística: baseada nos escores de inflamação (Quadro 1) para testar as hipóteses:

H0: Não há diferença entre as reações provocadas pelo Carisolv™ e o Papacárie® no tecido conjuntivo.

H1: Há diferença entre as reações provocadas pelo Carisolv™ e o Papacárie® no tecido conjuntivo.

* Olympus BX51

** Olympus Camedia C-5060- 5.1 MPixels

Quadro 1. Escores atribuídos à resposta celular inflamatória.

Escore de Inflamação	Células Inflamatórias
1 (não significante)	Nenhuma ou poucas próximo à abertura tubular, caracterizando tecido normal
2 (discreto)	Discreta quantidade com predomínio de polimorfonucleares (PMN) ou células mononucleares
3 (moderado)	Moderada quantidade junto à abertura tubular
4 (intenso)	Intensa quantidade caracterizando denso infiltrado inflamatório junto à abertura do tubo de polietileno ou abscesso

Adaptado da ISO²⁷

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Anexos).

RESULTADOS

Papacárie® (Grupo I)

3 dias

Na porção central da abertura do tubo observa-se a presença de material amorfo, seguido de tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos e fibras colágenas e de infiltrado inflamatório moderado constituído por polimorfonucleares (PMN) (Figuras 1 e 2). Há ligeira diminuição do fluxo sangüíneo nos capilares e aumento da viscosidade sangüínea, refletido pela presença de vasos pequenos dilatados repletos de hemácias (estase sangüínea). Também ocorreu a marginação leucocitária, isto é, uma orientação periférica dos leucócitos, principalmente neutrófilos, ao longo do endotélio vascular (Figura 3).

Nas porções laterais da abertura do tubo, há fibroblastos em meio às fibrilas colágenas dispostas aleatoriamente, bem como há presença de macrófagos ativos com inclusões citoplasmáticas (Figura 4).

7 dias

Há presença de material amorfo seguido de moderado infiltrado inflamatório constituído por PMN e mononucleares. Pelo T.M. observa-se reduzida quantidade de fibras colágenas (Figuras 5, 6, 7 e 8).

20 dias

Ao longo da abertura do tubo há presença de material amorfo com restos celulares (Figura 9), seguido de infiltrado inflamatório constituído por leucócitos mononucleares (Figuras 10 e 11). O tecido conjuntivo mais distante apresenta fibras colágenas neoformadas em meio a fibroblastos, macrófagos ativos e vasos sanguíneos hiperemiados e congestionados com estase sanguínea (Figura 12).

30 dias

Na porção central da abertura do tubo há presença de material amorfo com restos celulares seguido de infiltrado inflamatório constituído por células mononucleares, formando uma faixa ao longo da abertura do tubo (Figuras 13 e 14). O tecido conjuntivo mais distante apresenta fibras colágenas neoformadas em meio a fibroblastos e macrófagos, sendo que as fibrilas colágenas encontram-se ligeiramente distante umas das outras (Figura 15). Os capilares sanguíneos apresentam-se hiperemiados e congestionados com estase sanguínea (Figura 16).

Carisolv™ (Grupo II)**3 dias**

Na porção central do tubo, há presença de material amorfo e o tecido conjuntivo apresenta-se com reduzida quantidade de células (Figuras 17 e 18). Ao longo da abertura do tubo, há infiltrado inflamatório constituído por PMN e mononucleares (Figura 19). Ocorre também uma congestão vascular. Nas porções laterais da abertura do tubo, as fibras colágenas encontram-se junto ao material, sendo constituído por raras células, caracterizando um tecido amorfo. À distância ocorre retenção de líquido tissular (Figura 20).

7 dias

Na porção central e lateral da abertura do tubo, há neoformação tecidual constituída por fibras colágenas, fibroblastos e macrófagos com inclusões citoplasmáticas de material fagocitado (Figuras 21, 22 e 23). Ocorre também neoformação vascular e não há inflamação (Figura 24).

20 dias

Na abertura do tubo há restos de material amorfo (Figuras 25 e 26) e neoformação fibrilar em meio a fibroblastos e macrófagos ativos (Figura 27). Logo abaixo, o infiltrado inflamatório contém poucos leucócitos mononucleares (Figura 28).

30 dias

Na abertura do tubo, há concentração de material amorfo seguido de fibrilas colágenas recém-formadas em meio a retenção de líquido tissular (Figura 29). O tecido conjuntivo distante da abertura do tubo apresenta neoformação

fibrilar e infiltrado inflamatório moderado constituído por células mononucleares com presença de macrófagos ativos com inclusões citoplasmáticas (Figuras 30, 31 e 32). Os vasos sangüíneos localizados distante do tubo apresentam hiperemiados e com congestão celular.

Os grupos foram classificados em escores (Tabela 2) por um único examinador.

Tabela 2. Escores atribuídos aos Grupos I e II nos períodos.

Períodos	Grupo I					Grupo II				
3 dias	3	3	4	2	3	4	4	4	3	3
7 dias	3	3	3	3	3	1	1	1	2	2
20 dias	3	2	3	3	3	1	2	1	1	1
30 dias	3	2	2	2	2	1	2	3	3	2

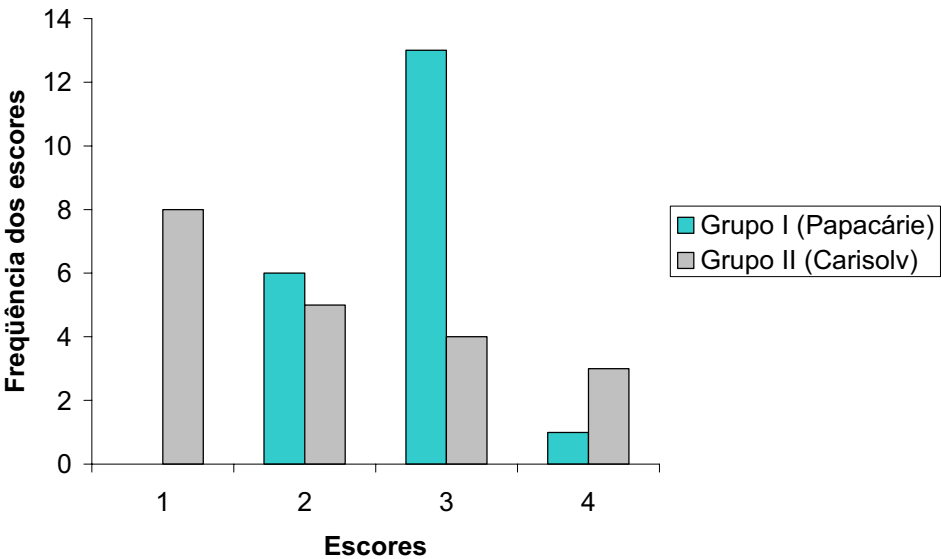


Gráfico 1. Frequência dos escores nos períodos.

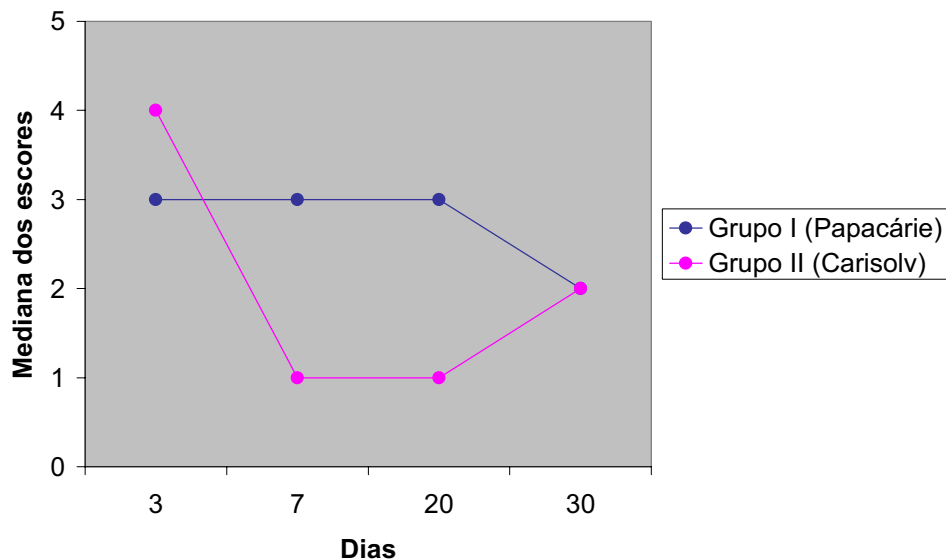


Gráfico 2. Evolução dos escores da inflamação em função dos períodos.

Os resultados dos Gráficos 1 e 2 indicam que há uma maior estabilidade do escore 3 no grupo I, enquanto que no grupo II, houve uma maior variabilidade entre os escores.

Como a avaliação do grau de resposta inflamatória forneceu dados ordinais e foram comparados grupos diferentes, o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para verificar se há diferença entre os grupos experimentais.

Comparando-se os períodos, os grupos I e II apresentaram diferença estatisticamente significativa aos 7 e 20 dias (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de p obtidos com o teste de Mann-Whitney ^{*a}

	p
Grupo I x Grupo II	0,0385*
3 dias x 3 dias	0,2101
7 dias x 7 dias	0,0090*
20 dias x 20 dias	0,0122*
30 dias x 30 dias	0,9168

*nível de significância a 5% ($p < 0,05$)

DISCUSSÃO

A ação do Carisolv™ e do Papacárie® é semelhante, apesar de suas formulações apresentarem componentes diferentes². O Carisolv™ associa a função proteolítica do hipoclorito de sódio com a ação de neutralização dos aminoácidos⁴⁸, enquanto o Papacárie® baseia-se na função proteolítica da papaína associada à cloramina^{10,42}. Baseado no mecanismo de ação destes dois materiais, eles também são utilizados em bolsas periodontais profundas, previamente aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular, para dissolver quimicamente o cálculo e o cimento radicular contaminado, facilitando a sua remoção^{25,40}. Além disso, existem estudos utilizando o Carisolv™ na irrigação de canais radiculares para auxiliar na instrumentação mecânica^{1,44}.

O tecido conjuntivo subcutâneo de pequenos animais apresenta aspectos histofisiológicos comuns e inerentes ao tecido conjuntivo dos mamíferos, que nos permitem projetar, dentro de certos limites, o que poderia resultar os efeitos agressivos de materiais em tecido conjuntivo dentinário e pulpar^{8,50}.

^{*a} Programa Bioestat 3.0

O teste *in vivo* desenvolvido em animais é um método relativamente simples e rápido para identificar o grau de irritabilidade dos materiais odontológicos e têm a finalidade apenas comparativa, não eliminando a necessidade de desenvolver pesquisas em seres humanos^{15,32}.

A espécie animal é selecionada de acordo com o tamanho da amostra e a duração prevista do teste em relação ao período de vida do animal. Para testes de implante de curta duração (em média 12 semanas) em tecido subcutâneo são comumente utilizados camundongos, ratos, hamsters e coelhos^{7,12,54}. O modelo experimental utilizado foi o camundongo, que serviu adequadamente para o propósito deste estudo por ser um animal pequeno, resistente, de fácil manutenção e manipulação. O detergente de mamona a 16% foi utilizado como antisséptico por ser um efetivo agente antimicrobiano com alto poder de limpeza e desinfecção²⁹.

A metodologia deste trabalho é recomendada por organizações que buscam a uniformização e padronização dos testes de biocompatibilidade, para que se tenha a possibilidade de comparar resultados, além de serem amplamente aceitos pela comunidade científica internacional^{21,27}.

O CarisolvTM e o Papacárie[®] são materiais apresentados sob a forma de gel, sendo necessária a utilização de dispositivos para o seu acondicionamento. Neste estudo foi utilizado o tubo de polietileno, um veículo sólido de fácil manipulação e implantação, quimicamente estável, que não sofre influência de medicamentos que possam ser acondicionados em seu interior, apresenta comportamento comprovadamente inerte diante do tecido conjuntivo e, portanto, não influencia na

resposta tecidual^{51,52}. A lateral do tubo serviu como controle, como preconizado pelo FDI²¹.

Existem trabalhos na literatura que avaliaram a biocompatibilidade *in vivo* de materiais na forma de gel utilizando como metodologia a injeção direta no tecido conjuntivo^{5,33}. A desvantagem desta técnica é a extensa área de contato entre o material e o tecido, tornando a resposta inicial muito severa devido à difusão do material, além de dificultar a localização da área de tecido a ser removida para posterior análise²².

Com a utilização de tubos, há diminuição da área de contato entre o material e o tecido, além de facilitar a localização da área para estudo. O extravasamento do material pôde ser controlado com o selamento de uma das extremidades como recomendado por Torneck^{51,52} e utilizado por Carvalho et al.¹³ e Pascon et al.⁴¹.

Segundo Wataha⁵⁴, biocompatibilidade é a habilidade de um material em extrair uma resposta biológica do organismo. Neste estudo, os materiais testados estimularam a ativação de mecanismo sistêmico de defesa do organismo denominado reação inflamatória, a qual está estreitamente relacionada ao processo de reparação, servindo para destruir ou diluir o material, além de desencadear uma série de eventos que levam à cicatrização e reconstituição do tecido conjuntivo^{16,53}.

A resposta inflamatória aguda se manifesta por alterações vasculares, edema e infiltração basicamente neutrofílica^{16,53}. A presença de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) ocasionais, nos períodos iniciais, nos 2 grupos,

indica que estas células saíram da corrente sanguínea e povoaram o tecido conjuntivo, o que denota a característica aguda do processo de inflamação inicial.

No grupo I (Papacárie[®]), nos períodos de 3 e 7 dias, observou-se moderado infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos. Estes resultados são concordantes com Martins et al.³³, quando injetaram o Papacárie no tecido subcutâneo de ratos.

No grupo II (CarisolvTM), aos 3 dias, o tecido conjuntivo apresentou número reduzido de células porque sugere-se que os componentes químicos do material produziram uma fixação dos mesmos com desnaturação de proteínas. Os resultados do presente estudo foram semelhantes ao de Dammaschke et al.¹⁷, que demonstraram a destruição tecidual ou necrose como efeito primário do CarisolvTM, em curto prazo. Quimicamente a necrose é baseada na hidrólise alcalina mediada por 2 radicais (OCl^- e OH^-) que são liberados pela dissociação do hipoclorito de sódio nos fluidos corporais (causada pelo alto pH do CarisolvTM). Segundo Dammaschke et al.¹⁹, os agentes agressivos do CarisolvTM só agem em fibras colágenas parcialmente expostas, que foram pré-lesionadas pelos ácidos orgânicos da lesão de cárie, enquanto as fibras colágenas da dentina sadia são protegidas pelos cristais minerais.

Aos 7 dias, no grupo II, observou-se neoformação tecidual e ausência de inflamação em contraposição aos resultados obtidos por Berto et al.⁶, que avaliaram o CarisolvTM, na sua fórmula inicial, em tecido subcutâneo de camundongos e encontraram, aos 7 dias, na abertura do tubo uma zona necrótica com células não viáveis e uma reação inflamatória com predomínio de células

mononucleares fagocitárias. No trabalho de Berto et al.⁶ o material foi embebido em uma esponja de fibrina, a qual foi inserida no interior do tubo de polietileno, portanto a reação tecidual pode ter sido influenciada pela presença da esponja de fibrina, que por si só constitui-se um agente irritante, pois segundo Okamoto et al.³⁸, o implante de esponja de fibrina em alvéolos dentais de ratos provocou o retardo no processo de reparo, podendo se observar a presença de coágulo sanguíneo sem organização até o período final de análise (21 dias).

Comparando os dois materiais testados, nos períodos de 7 e 20 dias, foram observadas reações inflamatórias estatisticamente diferentes, sendo que no grupo II ocorreu menor reação inflamatória do que no grupo I. Os resultados deste estudo foram semelhantes aos encontrados por Martins et al.³³, ao injetarem CarisolvTM e Papacárie[®] no tecido conjuntivo de ratos, também encontraram, aos 7 dias, menor reação tecidual no grupo do CarisolvTM.

Aos 30 dias, houve um aumento da resposta inflamatória no grupo II. Esse efeito tardio nos períodos finais de análise pode ter sido provocado pela perda da ação dos materiais e predomínio dos efeitos da presença do veículo do gel (carboximetilcelulose). Resultados semelhantes foram encontrados por Magro Filho et al.³⁰, que ao avaliarem uma pomada de confrei, própolis e mel em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, observaram bons níveis de biocompatibilidade até o período de 10 dias, decrescendo a seguir, em razão do predomínio dos efeitos do veículo da pomada.

A inflamação crônica é considerada uma inflamação de duração prolongada (semanas ou meses) na qual se processam, simultaneamente: (1)

infiltrado inflamatório de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos e reflete uma reação persistente à agressão; (2) destruição tecidual, amplamente induzida pela inflamação das células e (3) tentativa de reparação mediante a substituição por tecido conjuntivo, ou seja, proliferação de pequenos vasos sanguíneos (angiogênese) e de fibroblastos, com conseqüente aumento de fibras colágenas no local^{16,53}. Ocorre habitualmente quando o material é insolúvel ou pouco agressivo¹⁶. Nos dois grupos, nos períodos tardios (20 e 30 dias), foi observado infiltrado inflamatório crônico caracterizado pelo predomínio de células mononucleares e macrófagos.

Os macrófagos são células de vida longa que atuam na remoção de células mortas e produtos do catabolismo tecidual através da fagocitose¹⁶. Neste estudo, nos períodos tardios, foram observados macrófagos ativos com grânulos no interior de seu citoplasma, mostrando a tentativa de fagocitose do material.

O processo de reparação inicia-se durante as fases iniciais da inflamação, mas só é concluído depois que a influência nociva for neutralizada⁵³. A neoformação tecidual pôde ser observada no grupo II, aos 7 dias e no grupo I, a partir de 20 dias.

Para que um material seja considerado biocompatível, mesmo que produza resposta inflamatória aguda ou crônica, ele não deve impedir a diferenciação própria dos tecidos adjacentes¹⁴. A presença de células inflamatórias crônicas (leucócitos mononucleares e macrófagos) nos períodos tardios dos 2 grupos não indica necessariamente processo inflamatório crônico, pois a neoformação fibrilar demonstra a tendência ao processo de resolução tecidual.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Os materiais provocaram reação tecidual inflamatória em todos os períodos, podendo-se diferenciá-los pela predominância dos tipos celulares e pela intensidade.
- A hipótese nula não é válida, pois há diferença entre as reações provocadas pelos materiais no tecido conjuntivo.

REFERÊNCIAS

1. Alkilani MG, Whitworth JM, Dummer PMH. Preliminary in vitro evaluation of Carisolv as root canal irrigant. *Int Endod J.* 2003; 36: 433-40.
2. Ammari MM, Moliterno LFM. Remoção químico-mecânica da cárie: evidências atuais. *Rev Bras Odontol.* 2005; 62: 125-7.
3. Barbosa CM, Marckezi M, Oliveira MRB, Lima FCBA. Biocompatibilidade de uma pasta à base de óxido de zinco associado à clorexidina e nimesulida, em implantes subcutâneos em ratos [resumo 16]. In: *Anais da XI Jornada Acadêmica de Araraquara*; 1997 nov. 3-5; Araraquara. Araraquara; 1997.
4. Beeley JA, Yip HK, Stevenson AG. Chemochemical caries removal: a review of the techniques and latest developments. *Br Dent J.* 2000; 188: 427-30.
5. Bernardes SR, Schellini AS, Padovani CR, Marques ME. Avaliação da injeção de polietileno gel no subcutâneo de ratos. *Rev Bras Oftal.* 2003; 62: 525-34.

6. Berto PM, Rickli AC, Melo CSA, Silva LP, Bezerra ACB, Toledo OA. Reaction of mouse subcutaneous tissue to Carisolv – a morphologic study. Gen Dent. 2004; 52: 506-8.
7. Biomedical research educational trust. [cited 2007 Feb 22]. Available from: <http://www.bret.org.uk/num2.htm>.
8. Browne RM. Animal tests for biocompatibility of dental materials – relevance, advantages and limitations. J Dent. 1994; 22 (Supl 2): 21-4.
9. Bulut G, Zekioglu O, Eronat C, Bulut H. Effect of Carisolv on the human dental pulp: a histological study. J Dent. 2004; 32: 309-14.
10. Bussadori SK, Castro LC, Galvão AC. Papain gel: a new chemo-mechanical caries removal agent. J Clin Pediat Dent 2005; 30: 115-9.
11. Bussadori. SK, Martins MD, Fernandes KPS, Guedes CC, Motta LJ, Redá SH. Avaliação da biocompatibilidade “in vitro” de um novo material para a remoção química e mecânica da cárie – Papacárie. Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr. 2005; 5: 253-9.
12. Canadian Council on Animal Care. [cited 2007 Set 22]. Available from: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/ENGLISH_V2_84/CHXIX1.HTM.
13. Carvalho DR, Magro Filho O, Carvalho ACP. Implante de matriz óssea humana desmineralizada em forma de gel (Grafton DBM gel) em cavidades ósseas e tecido conjuntivo subcutâneo: avaliação histológica em ratos. RBP: Rev Bras Cir Implantodont Protese Implant. 2003; 10: 48-55.

14. Carvalho PSP, Bassi APF, Pereira LAVD. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Implant News* 2004; 1: 255-60.
15. Costa CAS, Hebling J, Souza PPC. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: Estrela, C. Metodologia científica. 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 231-71.
16. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. 1251p.
17. Dammaschke T, Stratmann U, Danesh G, Schäfer E, Ott KHR. Reaction of rat pulp tissue to Carisolv 'new gel' – a histocytological evaluation. *Aust Dent J.* 2006; 51: 57-63.
18. Dammaschke T, Stratmann U, Mokrys K, Kaup M, Ott KHR. Histocytological evaluation of the reaction of rat pulp tissue to Carisolv. *J Dent.* 2001; 29: 283-90.
19. Dammaschke T, Stratmann U, Mokrys K, Kaup M, Ott KHR. Reaction of sound and demineralised dentine to Carisolv in vivo and in vitro. *J Dent* 2002; 30: 59-65.
20. Ericson D, Zimmerman M, Raber H, Götrick B, Bornstein R, Thorell J. Clinical evaluation of efficacy and safety of a new method for chemo-mechanical removal of caries. A multi-centre study. *Caries Res.* 1999; 33: 171-7.
21. Federation Dentaire Internationale. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1980; 30: 140-88.

22. Figueiredo JAP, Pesce HF, Gioso MA, Figueiredo MAZ. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. *Int Endod J.* 2001; 34: 377-85.
23. Fure S, Lingström P. Evaluation of the chemomechanical removal of dentine caries in vivo with a new modified Carisolv gel. *Clin Oral Investig.* 2004; 8: 139-44.
24. Fusayama T. Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. *Oper Dent.* 1979; 4: 63-70.
25. Grisi DC, Theodoro LH, Sampaio JEC, Grisi MFM, Salvador SLS. Scanning electron microscopic analysis of the effect of Carisolv™ gel on periodontally compromised human root surfaces. *Braz Dent J.* 2006; 17: 110-6.
26. Habib CM, Kronman J, Goldman MA. A chemical evaluation of collagen and hydroxyproline after treatment with GK-101 (N-Chloroglycine). *Pharmacol Ther Dent.* 1975; 2: 209-15.
27. International Organization for Standardization. ISO 7405: Dentistry – preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials. Genève: ISO; 1997.
28. Kronman JH, Goldman M, Habib CM, Mengel L. Electron microscopic evaluation of altered collagen structure induced by N-monochloroglycine (GK-101). *J Dent Res* 1977; 56: 1539-45.
29. Leonardo MR, Silva LA, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *J Endod.* 2001; 27: 717-9.

30. Magro Filho O, Carvalho ACP, Martins AL, Câmara PRL. Reações do tecido conjuntivo à pomada de confrei, própolis e mel. Estudo histológico em ratos. *Rev Bras Odontol.* 1987; 44: 44-8.
31. Maragakis GM, Hahn P, Hellwig E. Chemomechanical caries removal: a comprehensive review of the literature. *Int Dent J.* 2001; 51: 291-9.
32. Marion L, Haugen E, Mjör IA. Methodological assessment of subcutaneous implantation techniques. *J Biomed Mater Res.* 1980; 14: 343-57.
33. Martins MD, Fernandes KPS, Pavesi VCS, Motta LJ, Redá SH, Bussadori SK. Avaliação da biocompatibilidade em subcutâneo de ratos de materiais para remoção química e mecânica de cárie [resumo Pc198]. *Braz Oral Res.* 2006; 20: 291.
34. Moresco FC, Souza MAL. Estudo microscópico dos efeitos de clareadores dentais na mucosa bucal e no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. *Rev Odonto Cienc.* 2001; 16: 251-8.
35. Myiagi SPH, Bussadori SK, Marques MM. Resposta de fibroblastos pulpaes humanos ao gel Papacárie [resumo PA69]. *Rev Pos-Grad.* 2004; 11: 287.
36. Nevins A, Finkelstein F, Borden BG, Moodnik R. Formation of mineralized scar tissue induced by implants containing collagen-calcium phosphate gel. *J Endod.* 1975; 1: 303-9.
37. Ohgushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res.* 1975; 54: 209-15.

38. Okamoto T, Zardo VAOQ, Zardo M, Alves-Rezende MCR, Callestini EA. Implante de esponja de fibrina em alvéolos dentais. *Rev Gaucha Odontol* 1994, 42: 37-43.
39. Paiva FP, Maffili VV, Santos ACS. Curso de manipulação de animais de laboratório. Salvador, 2005. 28p.
40. Papacárie: gel [bula do produto]. Responsável técnico Márcia Bouças Miziara. São Paulo: Fórmula & Ação; 2006.
41. Pascon EA, Paiva JG, Langeland K. Biocompatibilidade do Endogel. *Rev Bras Odontol*. 1987; 44(2): 10-20.
42. Pereira AS, Silva LR, Motta LJ, Bussadori SK. Remoção químico mecânica de cárie por meio do gel Papacárie. *Rev Gaucha Odontol*. 2004; 52: 385-8.
43. Poi WR, Carvalho PSP, Andrade ED. Estudo histológico do comportamento do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao implante de uma pasta à base de metronidazol a 10% e lidocaína a 2%. *Rev Gaucha Odontol*. 1999; 47(2): 102-9.
44. Rahman S, Whitworth JM, Dummer PM. Carisolv: an alternative to NaOCl in immature root canals? *Int Endod J*. 2005; 38: 448-55.
45. Ribeiro GG. Avaliação da reação do tecido subcutâneo de ratos ao digluconato de clorexidina a 2% e à pasta de hidróxido de cálcio: análises edemogênica e microscópica óptica [Dissertação de Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.

46. Santos EM, Bussadori SK, Jaeger MMM, Guedes-Pinto AC. Análise *in vitro* da citotoxicidade do Carisolv em cultura celular [resumo B147]. *Pesqui Odontol Bras.* 2000; 14: 127.
47. Serafim DS, Ramalho LTO. Implantes de poliuretano sob a forma de gel em tecido conjuntivo: estudo histológico em camundongos [resumo 25]. In: *Anais da XII Jornada Acadêmica de Araraquara*; 1998 nov. 9-11; Araraquara. Araraquara; 1998.
48. Silva LR, Höfling RTB, Bueno CES, Miranda ME, Bussadori SK. Remoção da cárie com CarisolvTM. *Rev Gaucha Odontol.* 2003; 51: 282-4.
49. Silva LR, Motta LJ, Reda SH, Façanha RAA, Bussadori SK. Papacárie – um novo sistema para a remoção química e mecânica do tecido cariado – relato de caso clínico. *Rev Paul Odontol.* 2004;26(6):4-8.
50. Stanley HR. Biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1992; 42: 37-46.
51. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. Part I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966; 21: 379-87.
52. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. Part II. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1967; 24: 674-83.
53. Trowbridge HO, Emling RC. *Inflamação – uma revisão do processo.* Quintessence: São Paulo; 1996. 170p.
54. Wataha JC. Biocompatibilidade dos materiais dentários. In: Anusavice KJ. *Phillips – materiais dentários.* 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 161-90.

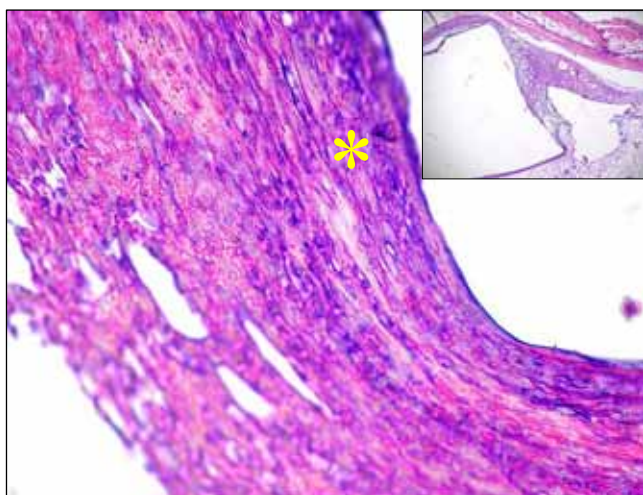
Grupo I - Papacárie® (3 dias)

FIGURA 1 - Material amorfo na abertura do tubo(*).
H.E. 400X

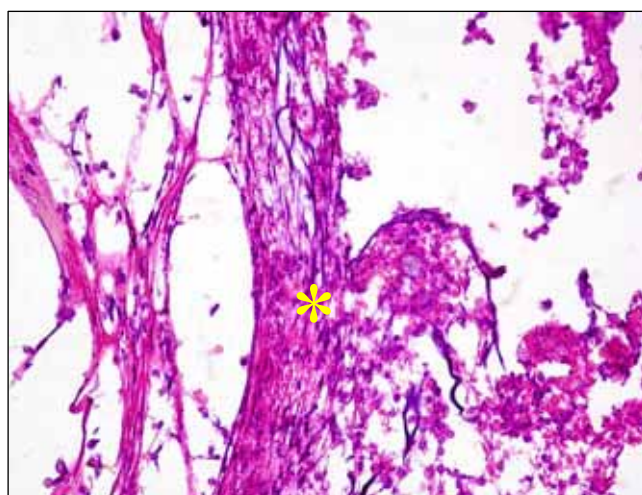


FIGURA 2- Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

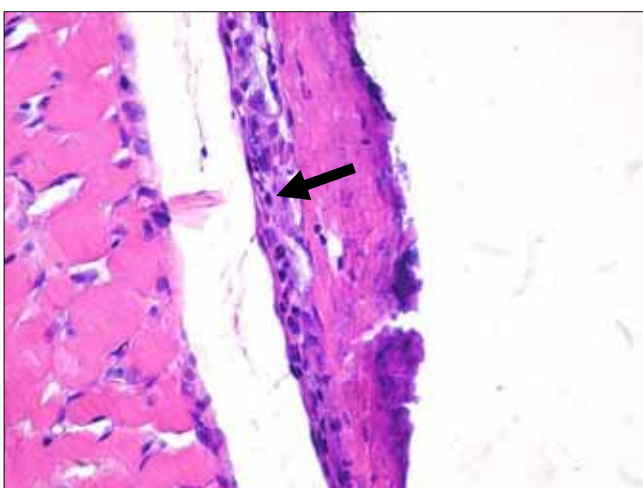


FIGURA 3 – Marginação leucocitária e infiltrado inflamatório moderado (←).
H.E. 400X

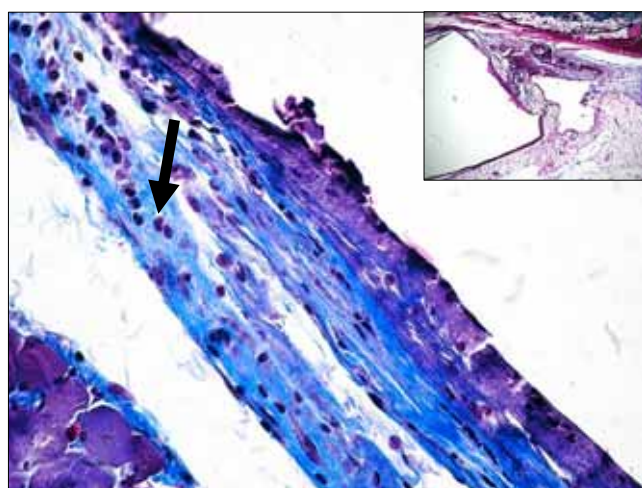


FIGURA 4 - Presença de fibroblastos e macrófagos (↓). T.M. 400X

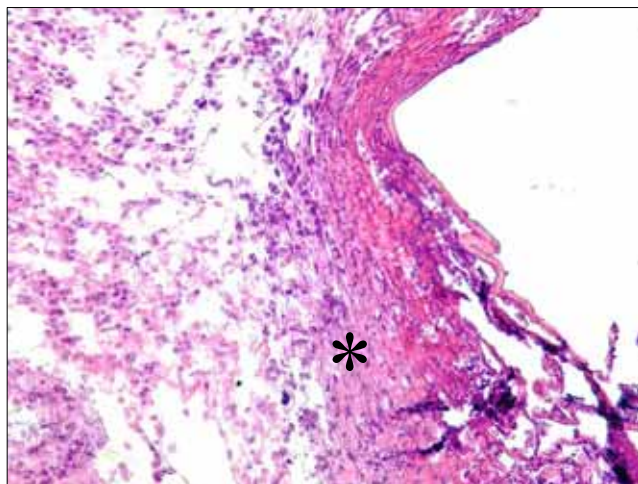
Grupo I - Papacárie® (7 dias)

FIGURA 5- Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 200X

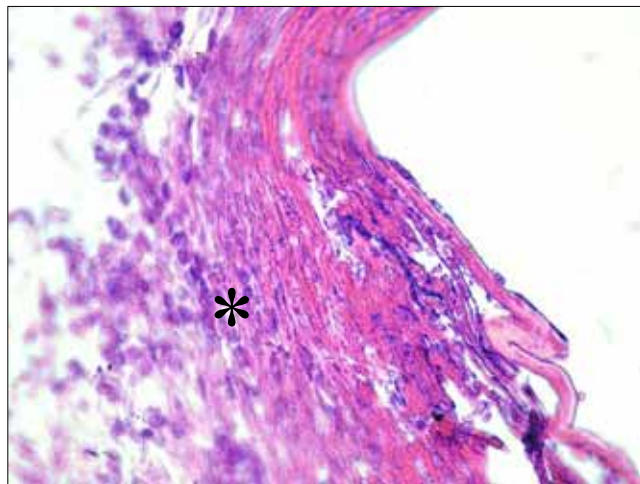


FIGURA 6- Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

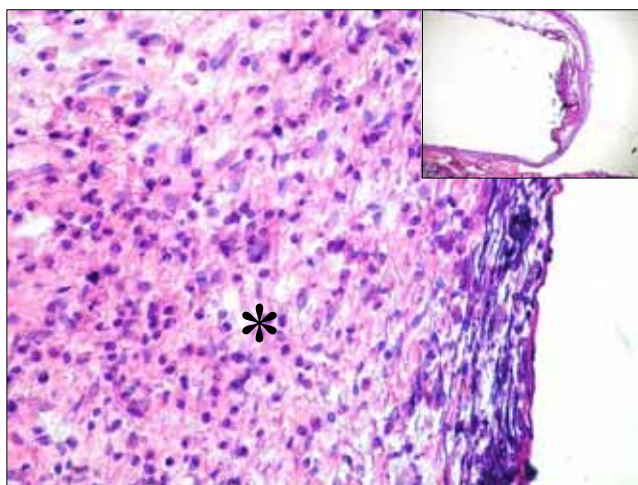


FIGURA 7- Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

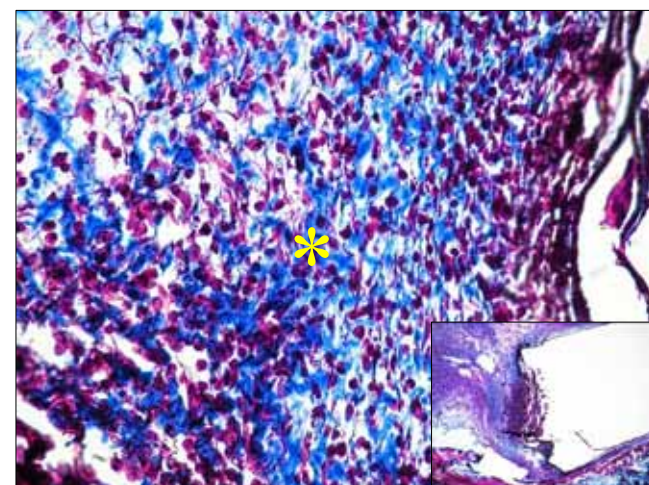


FIGURA 8- Moderado infiltrado inflamatório(*).
T.M. 400X

Grupo I - Papacárie® (20 dias)

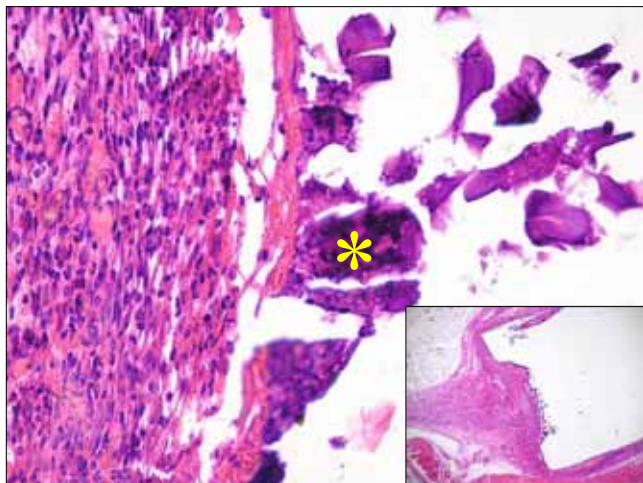


FIGURA 9 - Material amorfo na abertura do tubo(*).
H.E. 400X

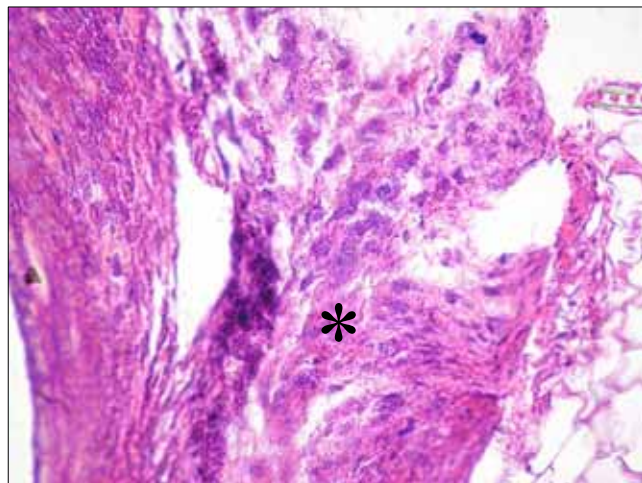


FIGURA 10- Discreto infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

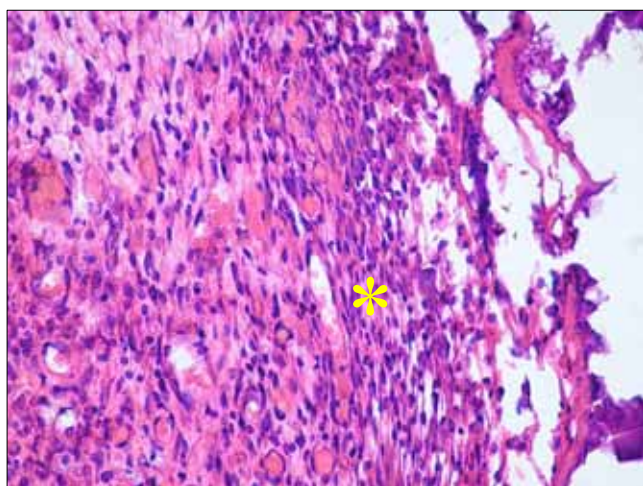


FIGURA 11-Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

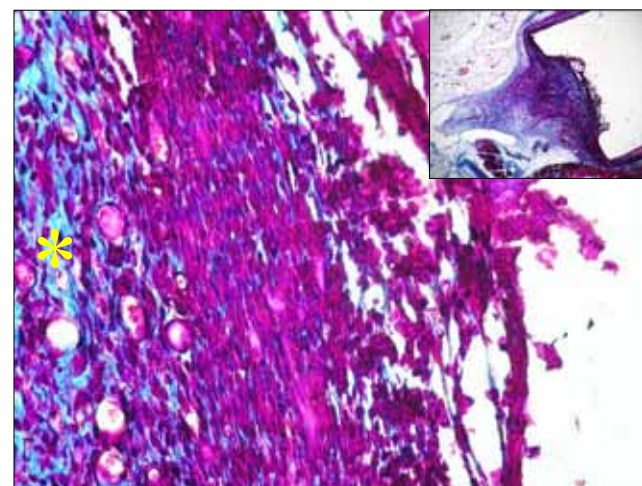


FIGURA 12 - Neoformação de fibras colágenas distantes da abertura do tubo(*).
T.M. 400X

Grupo I - Papacárie® (30 dias)

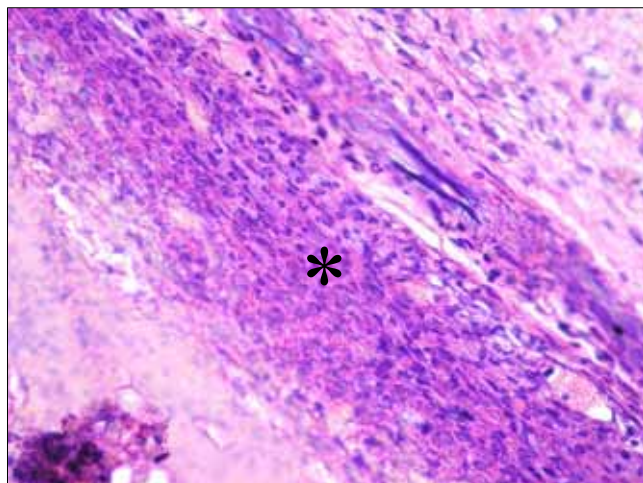


FIGURA 13-Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

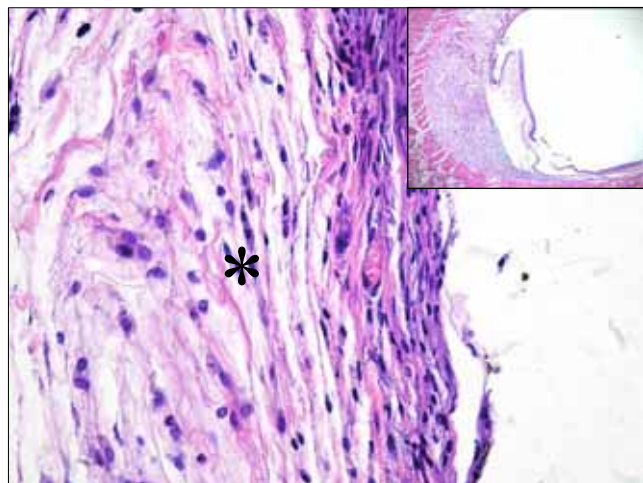


FIGURA 14 - Discreto infiltrado inflamatório com linfócitos(*). H.E. 400X

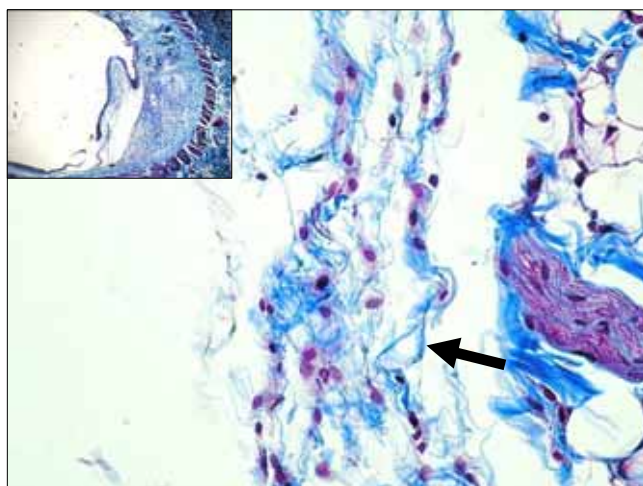


FIGURA 15 - Neoformação fibrilar (←).
T.M. 400X

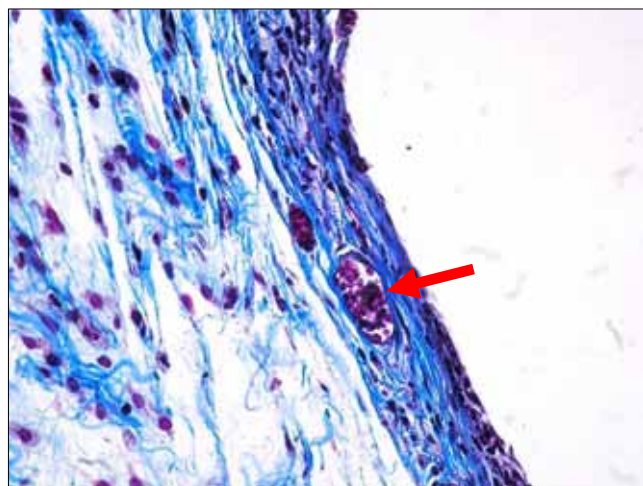


FIGURA 16 - Congestão vascular (←).
T.M. 400X

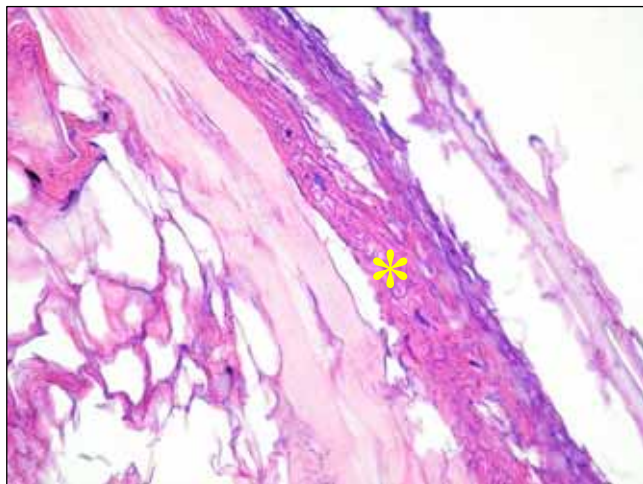
Grupo II - Carisolv™ (3 dias)

FIGURA 17 - Reduzida quantidade de células no tecido conjuntivo(*).H.E.400X

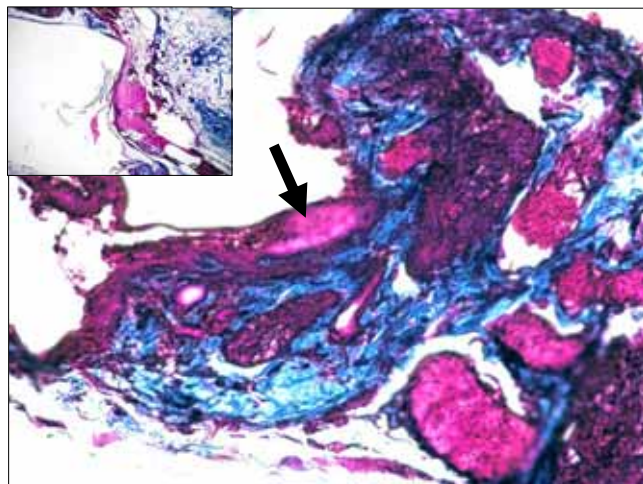


FIGURA 18 - Presença de material amorfo(↓).
T.M. 400X

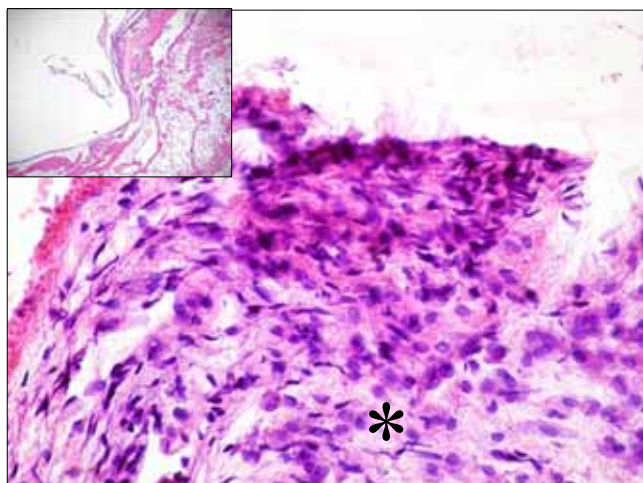


FIGURA 19 - Intenso infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

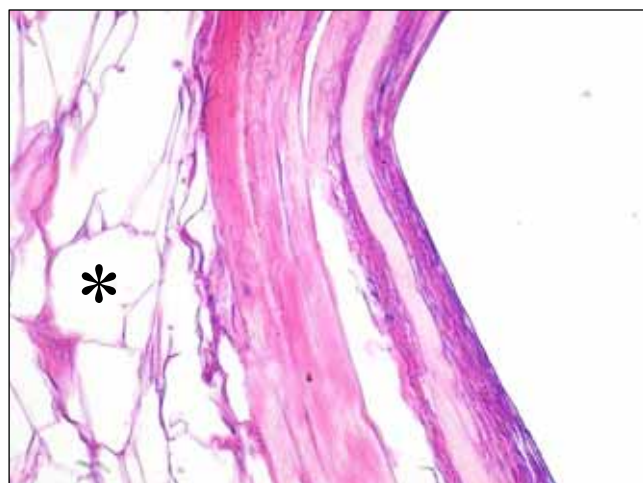


FIGURA 20 - Retenção de líquido tissular(*).
H.E. 400X

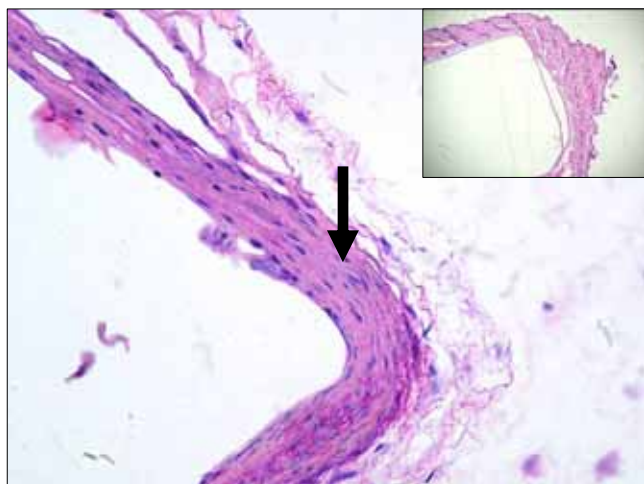
Grupo II - Carisolv™ (7 dias)

FIGURA 21 - Neoformação tecidual (↓).
H.E. 200X

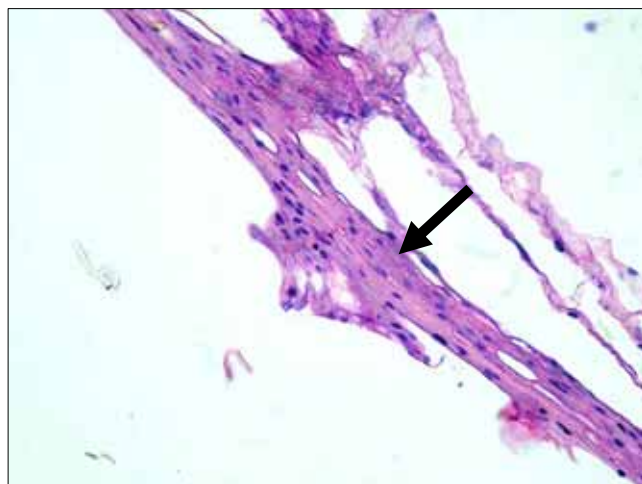


FIGURA 22 - Neoformação tecidual (←).
H.E.400X

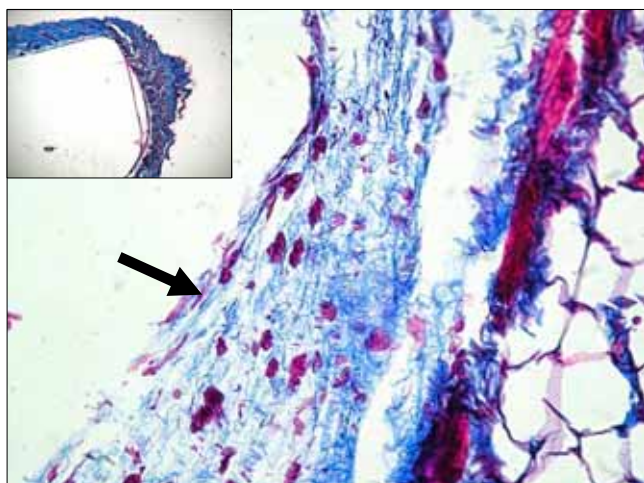


FIGURA 23 - Neoformação tecidual (→).
T.M. 400X

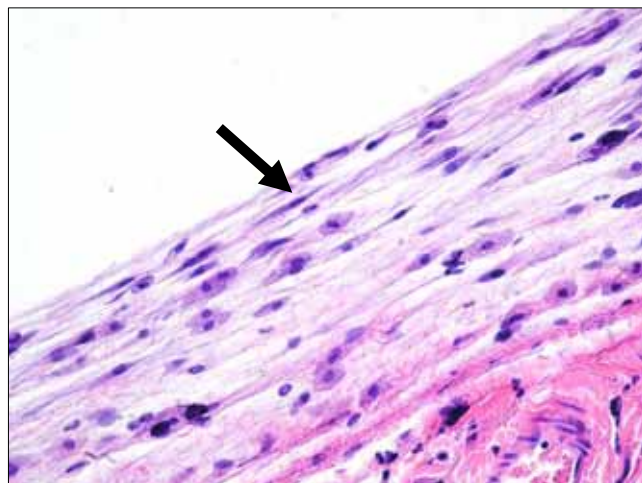


FIGURA 24 - Neoformação tecidual e ausência
de inflamação (→). H.E. 400X

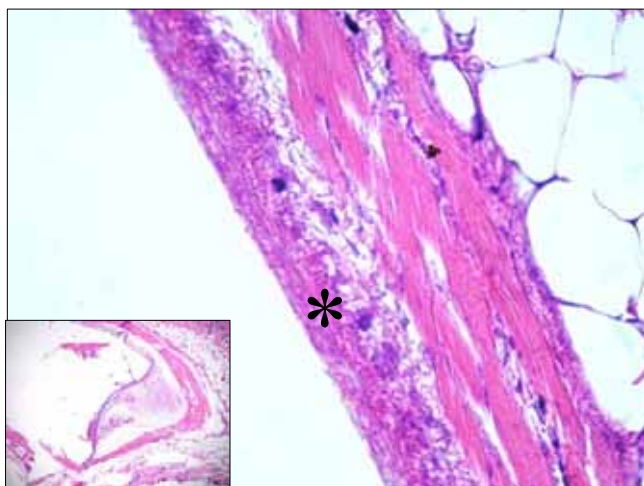
Grupo II - Carisolv™ (20 dias)

FIGURA 25 - Material amorfo na abertura do tubo (*). H.E.

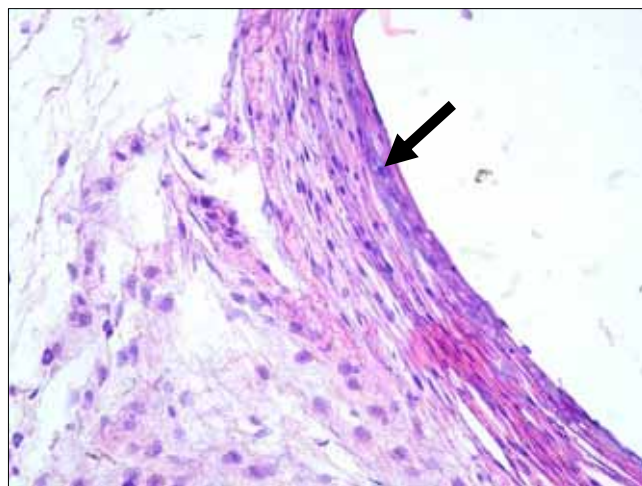


FIGURA 26 - Material amorfo na abertura do tubo (←). H.E. 400X

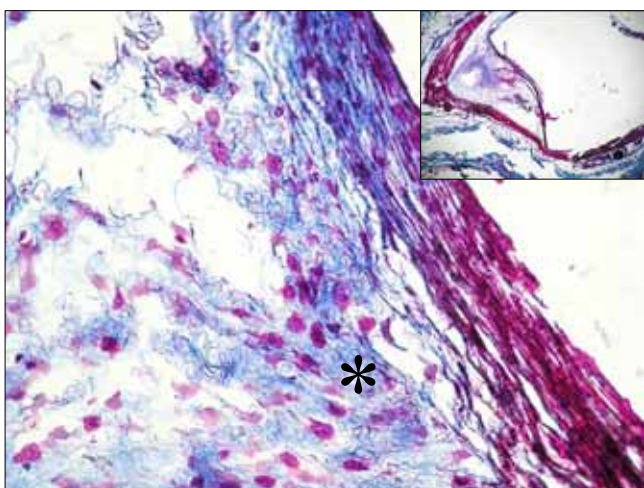


FIGURA 27 - Neoformação fibrilar com fibroblastos e macrófagos (*). T.M.400X

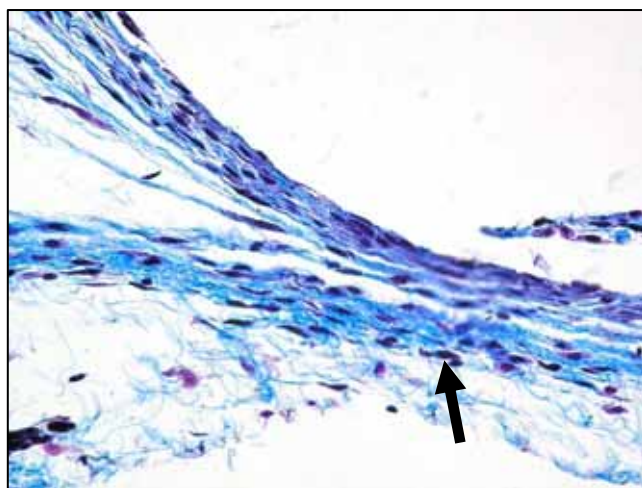


FIGURA 28 - Presença de poucos leucócitos mononucleares (↑). T.M. 400X

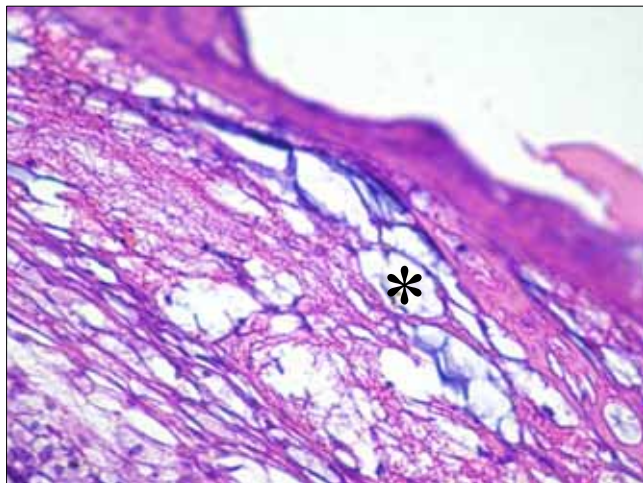
Grupo II - Carisolv™ (30 dias)

FIGURA 29 - Material amorfo e retenção de líquido (*).
H.E.

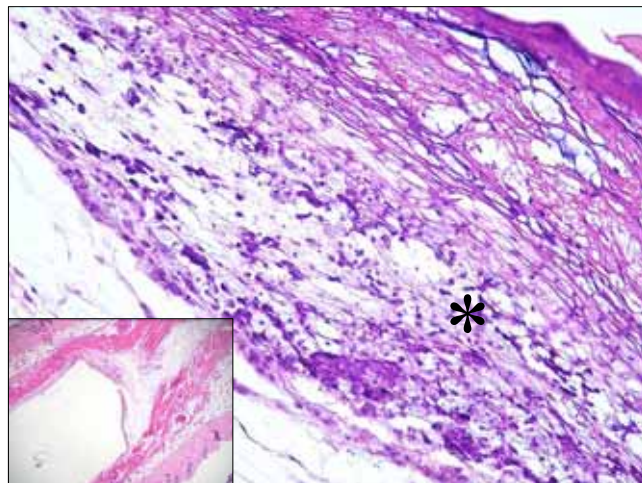


FIGURA 30-Infiltrado inflamatório moderado(*).
H.E. 200X

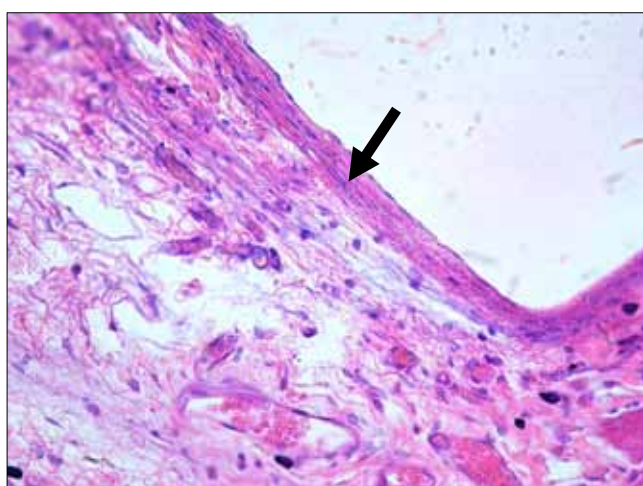


FIGURA 31 - Neoformação fibrilar (↓).
H.E.400X

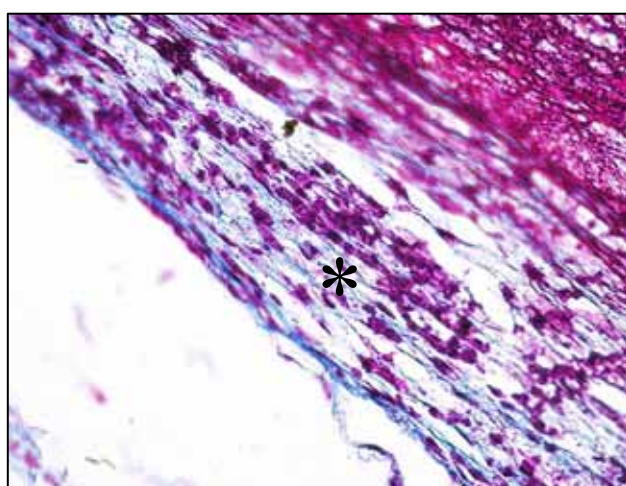


FIGURA 32 - Neoformação fibrilar (*).
T.M. 400X

Resposta do tecido conjuntivo de camundongos ao Papacárie®*

Capítulo 2

* Artigo a ser enviado para publicação

RESUMO

O Papacárie[®] é um material constituído basicamente por papaína e cloramina, na forma de gel, utilizado para remoção químico-mecânica do tecido cariado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a biocompatibilidade do Papacárie[®] e a base de gel de carboximetilcelulose através do implante de tubos de polietileno preenchidos com estes materiais no tecido conjuntivo de camundongos. Os animais foram sacrificados 3, 7, 20 e 30 dias após a cirurgia de implante, sendo os espécimes obtidos processados e submetidos à análise histológica. O grupo do Papacárie[®] manteve uma inflamação moderada até os 20 dias, que diminuiu de intensidade aos 30 dias e a base do gel provocou reação inflamatória discreta inicial, que aumentou aos 30 dias. Pôde-se concluir que o Papacárie[®] e a base de gel são biocompatíveis com o tecido conjuntivo, porém as alterações provocadas por estes materiais são estatisticamente diferentes.

Palavras-chave: Materiais dentários; cárie dentária; tecido conjuntivo; histocompatibilidade.

INTRODUÇÃO

A doença cárie ocorre quando os tecidos dentários são acometidos pela ação de bactérias acidogênicas. Na dentina, a lesão de cárie apresenta-se em duas camadas distintas. A camada mais superficial é altamente infectada, com extensa desmineralização e fibras colágenas desnaturadas, apresentando-se amolecida e

sem capacidade de reorganização. A segunda camada, imediatamente abaixo, é a dentina afetada, a qual se caracteriza por desmineralização moderada com fibras colágenas saudáveis, sendo passível de remineralização^{18,29}. Baseando-se nisso, foi desenvolvido o método de remoção químico-mecânica do tecido cariado, que consiste na aplicação de um produto para amolecer a dentina infectada, facilitando sua remoção, preservando o tecido dentinário sadio^{1,15,19,23}.

Em 1975, Habib et al.¹⁹ testaram este método, utilizando hipoclorito de sódio, um agente proteolítico não específico capaz de dissolver material orgânico. Em 1985 introduziu-se no mercado o Caridex, um sistema à base de aminoácidos que causava o rompimento do colágeno já parcialmente degradado pela lesão de cárie, tornando o tecido amolecido e facilitando sua remoção²³. Apesar da sua eficácia, o Caridex apresentava limitações na prática clínica, tais como processo de remoção tecidual lento (10 a 15 minutos), grande volume de solução empregada (200-500ml), curto prazo de validade, alto custo, necessidade de aquecimento, e com isso, o produto não alcançou sucesso comercial, sendo retirado do mercado no início dos anos 90^{15,23,37}.

Na década de 90, de modo a aperfeiçoar a técnica de remoção químico-mecânica do tecido cariado, foi desenvolvido o CarisolvTM, o qual é composto basicamente por solução de hipoclorito de sódio e três aminoácidos (ácido glutâmico, leucina e lisina), com ação semelhante ao Caridex^{1,3,23}. As diversas vantagens apresentadas pelo CarisolvTM, como a preservação do tecido dentário sadio, redução do uso de instrumentos rotatórios, fácil aplicação e manipulação,

não foram suficientes para “popularização” do sistema, restringindo sua aplicação a uma pequena parcela da população^{33,37}.

Com o intuito de tornar esta técnica mais acessível, diminuindo custos e globalizando a sua utilização, em 2003, no Brasil, foi desenvolvido o Papacárie^{®*}, gel constituído por papaína, enzima retirada da casca do mamão, que possui atividade bactericida, bacteriostática e anti-inflamatória, pelo antisséptico cloramina (composto de cloro e amônia) e pelo azul de toluidina, um corante fotossensível com propriedades antimicrobianas^{8,33,37}. O mecanismo de ação do Papacárie[®] consiste no rompimento da ligação entre as fibrilas de colágeno da dentina cariada, deixando intacta a dentina sadia, que por não estar desmineralizada e não ter fibrilas de colágeno expostas, não sofre a ação do produto^{1,37}.

Devido a recente liberação e comercialização do Papacárie[®], poucos trabalhos científicos sobre a biocompatibilidade deste material foram desenvolvidos.

O Papacárie[®] foi avaliado quanto à biocompatibilidade in vitro em cultura de fibroblastos, em curto e longo prazo, e não foi considerado citotóxico⁹, mas quando em contato direto com cultura de fibroblastos pulpare humanos, por 50 segundos, apresentou atividade citotóxica²⁷. Este material também foi injetado no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos e se mostrou biocompatível^{7,25}.

Dentre os testes indicados pela FDI¹⁶ e ISO²⁰, o implante de amostras de materiais odontológicos no tecido conjuntivo de pequenos animais é considerado

* Fórmula & Ação – São Paulo

teste adequado nas etapas preliminares de pesquisa de biocompatibilidade. Para o implante subcutâneo de material na forma de gel, muitas vezes, há necessidade de dispositivos para acondicionar os materiais a serem testados, como por exemplo, tubos de polietileno^{2,11,28,36}, teflon³² e PVC^{26,35}.

Dentre estes, os tubos de polietileno são os mais utilizados para avaliação biológica da toxicidade in vivo de materiais odontológicos^{2,22,28,34,36} porque apresentam comportamento comprovadamente inerte diante do tecido conjuntivo, não influenciando, portanto, a resposta tecidual^{39,40}.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos em contato com o Papacárie® e a base do gel de carboximetilcelulose nos períodos de 3, 7, 20 e 30 dias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram empregados 44 tubos de polietileno* com 1mm de diâmetro interno, cortados em segmentos de 10mm de comprimento, sendo que uma de suas extremidades foi fechada a quente. Antes da cirurgia, os tubos foram desinfetados em etanol 70° por 30 minutos e posteriormente, lavados em solução tampão fosfato e secos em estufa. A seguir, os tubos foram preenchidos com Papacárie® e base do gel**. Foram utilizados 32 camundongos *Mus musculus* machos, pesando em média 45g. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (Tabela 1).

* CPL Medical's - São Paulo

** Fórmula & Ação – São Paulo

Tabela 1. Divisão do número de animais.

Períodos \ Grupos	Grupo I	Grupo II	Total
3 dias	5	3	8
7 dias	5	3	8
20 dias	5	3	8
30 dias	5	3	8
Total	20	12	32

Grupo I - tubo de polietileno com Papacárie®

Grupo II - tubo de polietileno com a base do gel

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina* na dose de 0,1 ml/100g de peso corporal, via intra-muscular, e também foi injetado o relaxante muscular cloridrato de xilazina** na dose de 0,01 ml/100g de peso corporal. Após a anestesia, foi realizada a tricotomia na região dorsal e antissepsia do campo operatório com detergente de mamona a 16%***. A seguir, o camundongo foi posicionado em mesa operatória, compatível com seu tamanho, perfurada com tiras elásticas para imobilização dos membros superiores e inferiores. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 7mm de comprimento no tecido cutâneo da região dorsal e divulsão com tesoura de ponta romba, onde foi inserido o tubo de polietileno contendo Papacárie®. Os outros 12 camundongos serviram como controle e neles foram implantados 2 tubos de polietileno contendo apenas a base do gel, que é composta por carboximetilcelulose, conservante e água, sem

* Ketamina 10% – Agener União

** Rompun - Bayer

*** Poliquil Germ – Poliquil Araraquara – Polimeros Ltda.

adição do princípio ativo (Tabela 2). Após os procedimentos, a ferida cirúrgica foi suturada com fio de Vycril 4.0*.

Tabela 2. Divisão do número de implantes, por grupo e períodos.

Períodos \ Grupos	Grupo I	Grupo II	Total
3 dias	5	6	11
7 dias	5	6	11
20 dias	5	6	11
30 dias	5	6	11
Total	20	24	44

Grupo I - tubo de polietileno com Papacárie®

Grupo II - tubo de polietileno com a base do gel

Os camundongos foram colocados em gaiolas individuais devidamente identificadas com ração balanceada e água *ad libitum* e mantidos no Biotério da FOAr (UNESP) sob condições controladas de limpeza, temperatura, umidade e luz. Após o efeito da anestesia, para evitar o desconforto pós-operatório, todos os animais receberam uma dose única de 0,23ml de paracetamol** por gavagem (adaptado de Paiva et al.³⁰).

Após 3, 7, 20 e 30 dias da cirurgia, os fragmentos contendo os tubos foram removidos dos animais sob anestesia geral. Somente após a remoção destes fragmentos, os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia. Em seguida, as peças foram fixadas, desidratadas, embebidas em parafina e seccionadas em cortes histológicos de 6µm em um plano longitudinal, passando pela abertura do tubo de polietileno e incluindo toda interface entre o material e o tecido conjuntivo. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.) e

* Ethicon – Jonhson & Jonhson

** Tylenol 100mg/ml – Janssen-Cilag

Tricrômico de Masson (T.M.), analisadas e fotografadas sob microscópio* acoplado à câmera digital** da Disciplina de Patologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP).

Para a análise das reações teciduais provocadas pelos materiais, adotou-se os seguintes critérios:

- análise descritiva: baseada na presença de células residentes e itinerantes do tecido conjuntivo, análise da substância intercelular amorfa e fibrosa, assim como a qualidade e estrutura dos vasos sangüíneos presentes no local.

- análise estatística: baseada nos escores de inflamação (Quadro 1) para testar as hipóteses:

H0: Não há diferença entre as reações provocadas pelo Papacárie® e a base do gel no tecido conjuntivo.

H1: Há diferença entre as reações provocadas pelo Papacárie® e a base do gel no tecido conjuntivo.

Quadro 1. Escores atribuídos à resposta celular inflamatória.

Escores de Inflamação	Células Inflamatórias
1 (não significante)	Nenhuma ou poucas próximo à abertura tubular, caracterizando tecido normal
2 (discreto)	Discreta quantidade com predomínio de polimorfonucleares (PMN) ou células mononucleares
3 (moderado)	Moderada quantidade junto à abertura tubular
4 (intenso)	Intensa quantidade caracterizando denso infiltrado inflamatório junto à abertura do tubo de polietileno ou abscesso

Adaptado da ISO²⁰

* Olympus BX51

** Olympus Camedia C-5060- 5.1 MPixels

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (anexos).

RESULTADOS

Papacárie® (Grupo I)

3 dias

Na porção central da abertura do tubo observa-se a presença de material amorfo, seguido de tecido conjuntivo frouxo com fibroblastos e fibras colágenas e de infiltrado inflamatório moderado constituído por polimorfonucleares (PMN) (Figuras 1 e 2). Há ligeira diminuição do fluxo sangüíneo nos capilares e aumento da viscosidade sangüínea, refletido pela presença de vasos pequenos dilatados repletos de hemácias (estase sangüínea). Também ocorreu a marginação leucocitária, isto é, uma orientação periférica dos leucócitos, principalmente neutrófilos, ao longo do endotélio vascular (Figura 3). Nas porções laterais da abertura do tubo, há fibroblastos em meio às fibrilas colágenas dispostas aleatoriamente, bem como há presença de macrófagos ativos com inclusões citoplasmáticas (Figura 4).

7 dias

Há presença de material amorfo seguido de moderado infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos (PMN) e mononucleares. Pelo T.M. observa-se reduzida quantidade de fibras colágenas (Figuras 5, 6, 7 e 8).

20 dias

Ao longo da abertura do tubo há presença de material amorfo com restos celulares (Figura 9), seguido de infiltrado inflamatório constituído por leucócitos mononucleares (Figuras 10 e 11). O tecido conjuntivo mais distante apresenta

fibras colágenas neoformadas em meio a fibroblastos, macrófagos ativos e vasos sangüíneos hiperemiados e congestionados com estase sangüínea (Figura 12).

30 dias

Na porção central da abertura do tubo há presença de material amorfo com restos celulares seguido de infiltrado inflamatório constituído por células mononucleares, formando uma faixa ao longo da abertura do tubo (Figuras 13 e 14). O tecido conjuntivo mais distante apresenta fibras colágenas neoformadas em meio a fibroblastos e macrófagos, sendo que as fibrilas colágenas encontram-se ligeiramente distante umas das outras (Figura 15). Os capilares sangüíneos apresentam-se hiperemiados e congestionados com estase sangüínea (Figura 16).

Base do gel (Grupo II)

3 dias

Em toda a abertura do tubo, há presença de material amorfo. As células apresentam-se em degeneração em meio à discreta concentração de neutrófilos (PMN) no tecido conjuntivo. Não há congestão vascular. Há fibroblastos inativos e poucos macrófagos. Pelo T.M. observa-se em meio a células, reduzida quantidade de fibrilas colágenas coradas em azul (Figuras 17 e 18).

7 dias

Há discreto infiltrado inflamatório de PMN e retenção de líquido tissular em meio a pequenas fibrilas colágenas se formando (Figura 19). Na periferia da abertura do tubo, os capilares sangüíneos apresentam-se hiperemiados (Figura 20).

20 dias

Há presença de material amorfo na abertura do tubo. O tecido conjuntivo apresenta discreta quantidade de células inflamatórias (Figura 21). Há presença de fibras colágenas formadas ao longo da abertura do tubo (Figura 22).

30 dias

O material amorfo permanece na abertura do tubo adjacente a moderado infiltrado inflamatório (Figura 23). Há neoformação de fibrilas colágenas vistas pelo T.M. coradas em azul (Figura 24).

Os grupos foram classificados em escores (Tabela 3) por um único examinador.

Tabela 3. Escores atribuídos aos grupos nos períodos.

Períodos	Grupo I					Grupo II					
3 dias	3	3	4	2	3	1	1	2	2	2	2
7 dias	3	3	3	3	3	2	2	1	1	2	2
20 dias	3	2	3	3	3	1	1	2	2	2	2
30 dias	3	2	2	2	2	4	4	3	3	3	3

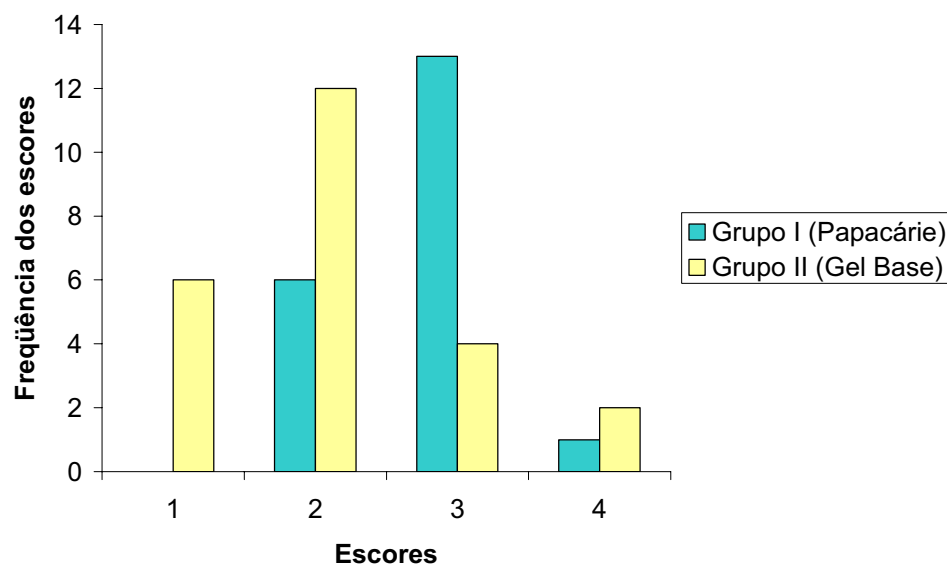


Gráfico 1. Frequência dos escores nos períodos.

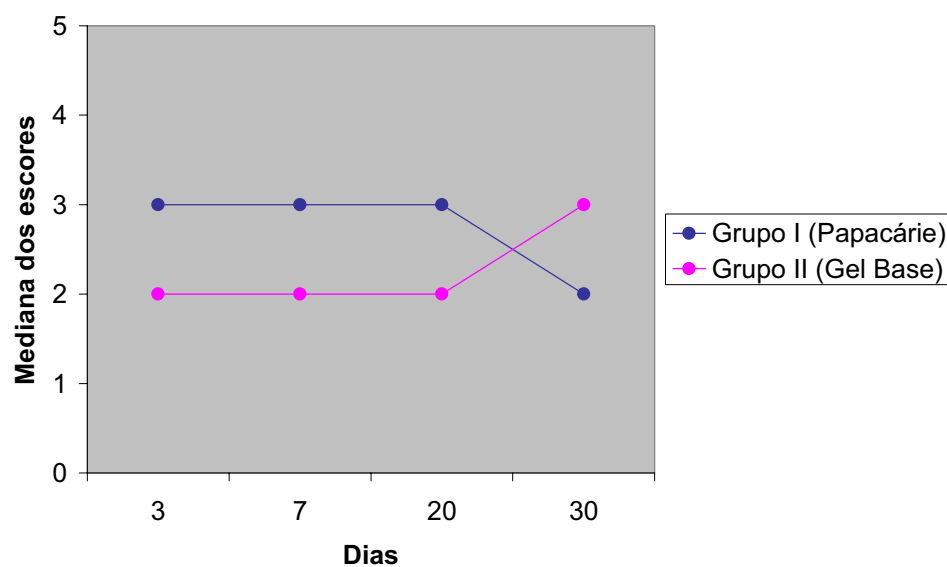


Gráfico 2. Evolução dos escores de severidade da inflamação em função dos períodos.

Os Gráficos 1 e 2 indicam que há uma maior estabilidade do escore 3 no grupo I e do escore 2 no grupo II.

Como a avaliação do grau de resposta inflamatória forneceu dados ordinais e foram comparados grupos diferentes, o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney^{*a} foi utilizado para verificar se há diferença entre os grupos experimentais.

Quando se comparam os períodos, verifica-se que existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II em todos os períodos (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de p obtidos com o teste de Mann-Whitney^{*a}

	p
Grupo I x Grupo II	0,0067*
3 dias x 3 dias	0,0176*
7 dias x 7 dias	0,0062*
20 dias x 20 dias	0,0176*
30 dias x 30 dias	0,0176*

*nível de significância a 5% ($p < 0,05$)

DISCUSSÃO

Desde a década de 70, o método de remoção químico-mecânica da lesão de cárie tem sido estudado como uma proposta alternativa em substituição à tradicional remoção do tecido cariado¹⁹ e recentemente, foi desenvolvido um produto nacional com esta finalidade, o Papacárie^{®8,33,37}.

O mecanismo de ação do Papacárie[®] baseia-se no componente ativo (papaína), que possui uma função proteolítica, ou seja, dissolver material

^{*a} Programa Bioestat 3.0

orgânico, no caso da lesão de cárie, o colágeno da dentina cariada³⁷. Este material também é indicado para ser utilizado em bolsas periodontais profundas, previamente aos procedimentos de raspagem e alisamento radicular, facilitando a remoção de cálculo³¹.

Todo material odontológico deve ser submetido a testes laboratoriais e clínicos que comprovem, entre outras propriedades, a sua biocompatibilidade, promovendo sua utilização clínica segura e fornecendo maiores subsídios para seu emprego pelos profissionais^{6,16,38}.

O tecido conjuntivo subcutâneo de pequenos animais apresenta aspectos histofisiológicos comuns e inerentes ao tecido conjuntivo dos mamíferos, que nos permitem projetar, dentro de certos limites, o que poderia resultar os efeitos agressivos de materiais em tecido conjuntivo e pulpar^{6,38}.

O teste in vivo desenvolvido em animais é um método relativamente simples e rápido para identificar o grau de irritabilidade dos materiais odontológicos e têm a finalidade apenas comparativa, não eliminando a necessidade de desenvolver pesquisas em seres humanos^{13,24,42}.

A espécie animal é selecionada de acordo com o tamanho da amostra e a duração prevista do teste em relação ao período de vida do animal. Para testes de implante de curta duração (em média 12 semanas) em tecido subcutâneo são comumente utilizados camundongos, ratos, hamsters e coelhos^{5,10,42}. O modelo experimental utilizado foi o camundongo, que serviu adequadamente para o propósito deste estudo por ser um animal pequeno, resistente, de fácil manutenção e manipulação. O detergente de mamona a 16% foi utilizado como antisséptico

por ser um efetivo agente antimicrobiano com alto poder de limpeza e desinfecção²¹.

A metodologia deste trabalho é recomendada por organizações que buscam a uniformização e padronização dos testes de biocompatibilidade, para que se tenha a possibilidade de comparar resultados, além de serem amplamente aceitos pela comunidade científica internacional^{16,20}.

Para o implante de substância na forma de gel, como o Papacárie[®], é necessário um dispositivo para o seu acondicionamento. Neste estudo foi utilizado o tubo de polietileno, um veículo sólido de fácil manipulação e implantação, quimicamente estável, que não sofre influência de medicamentos que possam ser acondicionados em seu interior, apresenta comportamento comprovadamente inerte diante do tecido conjuntivo e, portanto, não influencia na resposta tecidual^{39,40}. A lateral do tubo serviu como controle como preconizado pela FDI¹⁶.

Existem trabalhos na literatura que avaliaram a biocompatibilidade in vivo de materiais na forma de gel utilizando como metodologia a injeção direta no tecido conjuntivo^{4,25}. A desvantagem da técnica da injeção do material é a extensa área de contato entre o material e o tecido, tornando a resposta inicial muito severa devido à difusão do material, além de dificultar a localização da área de tecido a ser removida para posterior análise¹⁷.

Com a utilização de tubos, há diminuição da área de contato entre o material e o tecido, além de facilitar a localização da área para estudo. O extravasamento do material pôde ser controlado com o selamento de uma das

extremidades como recomendado por Torneck^{39,40} e utilizado por Pascon et al.³² e Carvalho et al.¹¹.

Segundo Wataha⁴², biocompatibilidade é a habilidade de um material em extrair uma resposta biológica do organismo. Neste estudo, os materiais em teste estimularam a ativação de mecanismos sistêmicos de defesa do organismo denominada reação inflamatória, a qual está estreitamente relacionada ao processo de reparação, servindo para destruir ou diluir o material, além desencadear uma série de eventos que levam à cicatrização e reconstituição do tecido conjuntivo^{14,41}.

A resposta inflamatória aguda se manifesta por alterações vasculares, edema e infiltração basicamente neutrofílica^{14,41}. A presença de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) ocasionais, nos períodos iniciais, nos 2 grupos, indica que estas células saíram da corrente sanguínea e povoaram o tecido conjuntivo e denota a característica aguda do processo de inflamação inicial.

No período de 3 dias, o grupo do Papacárie[®], que contém na sua fórmula carboximetilcelulose, provocou moderado infiltrado inflamatório, enquanto no grupo II, a resposta inflamatória foi mais discreta. Em ambos os grupos houve predomínio de PMN (neutrófilos), que são células características de inflamação aguda. Resultados semelhantes foram encontrados por Poi et al.³⁴, quando avaliaram uma pasta para tratamento de alveolite em tecido conjuntivo de ratos, observaram que a carboximetilcelulose associada ao metronidazol a 10% (grupo II), à lidocaína 2% (grupo III) e à menta (grupo IV), no período de 48 horas, apresentaram moderado infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos.

Aos 7 dias, no grupo I (Papacárie®) observou-se moderado infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos. Estes resultados são concordantes com Bussadori et al.⁷ e Martins et al.²⁵.

Até o período de 20 dias, o Papacárie® provocou maior reação tecidual sobre o tecido conjuntivo do que a base do gel. Porém aos 30 dias, houve uma diminuição na reação inflamatória no grupo I, enquanto no grupo II a reação aumentou. Os resultados deste trabalho sugerem que a base do gel demora mais para ser reabsorvida pelo organismo. O mesmo resultado foi encontrado por Magro Filho et al.²², onde o material testado apresentou bons níveis de biocompatibilidade até os 10 dias, decrescendo a seguir, em razão do predomínio dos efeitos irritantes do veículo.

A inflamação crônica é considerada uma inflamação de duração prolongada (semanas ou meses) na qual se processam, simultaneamente: (1) infiltrado inflamatório de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos e reflete uma reação persistente à agressão; (2) destruição tecidual, amplamente induzida pela inflamação das células e (3) tentativa de reparação mediante a substituição por tecido conjuntivo, ou seja, proliferação de pequenos vasos sangüíneos (angiogênese) e de fibroblastos, com conseqüente aumento de fibras colágenas no local¹⁴. Ocorre habitualmente quando o material é insolúvel ou pouco agressivo¹². Nos dois grupos, nos períodos tardios (20 e 30 dias), foi observado infiltrado inflamatório crônico caracterizado pelo predomínio de células mononucleares e macrófagos.

O processo de reparo inicia-se durante as fases iniciais da inflamação, mas só é concluído depois que a influência nociva for neutralizada. A neoformação fibrilar observada no grupo II, nos períodos iniciais, e no grupo I, a partir de 20 dias indicam uma tendência ao processo de resolução tecidual.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Os materiais provocaram reação tecidual inflamatória em todos os períodos, podendo-se diferenciá-los pela predominância dos tipos celulares e pela intensidade.
- A hipótese nula não é válida, pois há diferença entre as reações provocadas pelos materiais no tecido conjuntivo.

REFERÊNCIAS

1. Ammari MM, Moliterno LFM. Remoção químico-mecânica da cárie: evidências atuais. Rev Bras Odontol. 2005; 62: 125-7.
2. Barbosa CM, Marckezi M, Oliveira MRB, Lima FCBA. Biocompatibilidade de uma pasta à base de óxido de zinco associado à clorexidine e nimesulide, em implantes subcutâneos em ratos [resumo 16]. In: Anais da XI Jornada Acadêmica de Araraquara; 1997 nov. 3-5; Araraquara. Araraquara; 1997.
3. Beeley JA, Yip HK, Stevenson AG. Chemochemical caries removal: a review of the techniques and latest developments. Br Dent J. 2000; 188: 427-30.

4. Bernardes SR, Schellini AS, Padovani CR, Marques ME. Avaliação da injeção de polietileno gel no subcutâneo de ratos. Rev Bras Oftal. 2003; 62: 525-34.
5. Biomedical research educational trust. [cited 2007 Feb 22]. Available from: <http://www.bret.org.uk/num2.htm>.
6. Browne RM. Animal tests for biocompatibility of dental materials – relevance, advantages and limitations. J Dent. 1994; 22 (Suppl 2): 21-4.
7. Bussadori SK, Santos EM, Abrahão IJ, Osaki J, Masuda M. Avaliação da biocompatibilidade in vitro em subcutâneo de ratos, o potencial microbiológico e MEV do gel de papaína. [resumo Pb170]. Braz Oral Res. 2004; 18: 178.
8. Bussadori SK, Castro LC, Galvão AC. Papain gel: a new chemo-mechanical caries removal agent. J Clin Pediat Dent 2005; 2: 115-9.
9. Bussadori SK, Martins MD, Fernandes KPS, Guedes CC, Motta LJ, Redá SH. Avaliação da biocompatibilidade “in vitro” de um novo material para a remoção química e mecânica da cárie – Papacárie. Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr. 2005; 5: 253-9.
10. Canadian Council on Animal Care. [cited 2007 Feb 22]. Available from: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/ENGLISH/V2_84/CHXIX1.HTM.
11. Carvalho DR, Magro Filho O, Carvalho ACP. Implante de matriz óssea humana desmineralizada em forma de gel (Grafton DBM gel) em cavidades ósseas e tecido conjuntivo subcutâneo: avaliação histológica em ratos. Rev Bras Implantodont Protese Implant. 2003; 10: 48-55.

12. Carvalho PSP, Bassi APF, Pereira LAVD. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Implant News* 2004; 1: 255-60.
13. Costa CAS, Hebling J, Souza PPC. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: Estrela, C. Metodologia científica. 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 231-71.
14. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. 1251p.
15. Ericson D, Zimmerman M, Raber H, Götrick B, Bornstein R, Thorell J. Clinical evaluation of efficacy and safety of a new method for chemo-mechanical removal caries. A multi-centre study. *Caries Res.* 1999; 33: 171-7.
16. Federation Dentaire Internationale. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1980; 30: 140-88.
17. Figueiredo JAP, Pesce HF, Gioso MA, Figueiredo MAZ. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. *Int Endod J.* 2001; 34: 377-85.
18. Fusayama T. Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. *Oper Dent.* 1979; 4: 63-70.
19. Habib CM, Kronman J, Goldman MA. A chemical evaluation of collagen and hydroxyproline after treatment with GK-101 (N-Chloroglycine). *Pharmacol Ther Dent.* 1975; 2: 209-15.
20. International Organization for Standardization. ISO 7405: Dentistry – preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials. Genève: ISO; 1997.

21. Leonardo MR, Silva LA, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. *J Endod.* 2001; 27: 717-9.
22. Magro Filho O, Carvalho ACP, Martins AL, Câmara PRL. Reações do tecido conjuntivo à pomada de confrei, própolis e mel. Estudo histológico em ratos. *Rev Bras Odontol.* 1987; 44: 44-8.
23. Maragakis GM, Hahn P, Hellwig E. Chemomechanical caries removal: a comprehensive review of the literature. *Int Dent J.* 2001; 51: 291-9.
24. Marion L, Haugen E, Mjör IA. Methodological assessment of subcutaneous implantation techniques. *J Biomed Mater Res.* 1980; 14: 343-57.
25. Martins MD, Fernandes KPS, Pavesi VCS, Motta LJ, Redá SH, Bussadori SK. Avaliação da biocompatibilidade em subcutâneo de ratos de materiais para remoção química e mecânica de cárie. [resumo Pc198]. *Braz Oral Res.* 2006; 20: 291.
26. Moresco FC, Souza MAL. Estudo microscópico dos efeitos de clareadores dentais na mucosa bucal e no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. *Rev Odonto Cienc.* 2001; 16: 251-8.
27. Myiagi SPH, Bussadori SK, Marques MM. Resposta de fibroblastos pulparens humanos ao gel Papacárie [resumo PA69]. *Rev Pos-Grad.* 2004; 11: 287.
28. Nevins A, Finkelstein F, Borden BG, Moodnik R. Formation of mineralized scar tissue induced by implants containing collagen-calcium phosphate gel. *J Endod.* 1975; 1: 303-9.

29. Ohgushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res.* 1975; 54: 209-15.
30. Paiva FP, Maffili VV, Santos ACS. Curso de manipulação de animais de laboratório. Salvador, 2005. 28p.
31. Papacárie: gel [bula do produto]. Responsável técnico Márcia Bouças Miziara. São Paulo: Fórmula & Ação; 2006.
32. Pascon EA, Paiva JG, Langeland K. Biocompatibilidade do Endogel. *Rev Bras Odontol.* 1987; 44: 10-20.
33. Pereira SA, Silva LR, Motta LJ, Bussadori SK. Remoção químico mecânica de cárie por meio do gel Papacárie®. *Rev Gaucha Odontol.* 2004; 52: 385-8.
34. Poi WR, Carvalho PSP, Andrade ED. Estudo histológico do comportamento do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao implante de uma pasta à base de metronidazol a 10% e lidocaína a 2%. *Rev Gaucha Odontol.* 1999; 47: 102-9.
35. Ribeiro GG. Avaliação da reação do tecido subcutâneo de ratos ao digluconato de clorexidina a 2% e à pasta de hidróxido de cálcio: análises edemogênica e microscópica óptica [Dissertação de Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.
36. Serafim DS, Ramalho LTO. Implantes de poliuretano sob a forma de gel em tecido conjuntivo: estudo histológico em camundongos [resumo 25]. In: Anais da XII Jornada Acadêmica de Araraquara; 1998 nov. 9-11; Araraquara. Araraquara; 1998.

37. Silva LR, Motta LJ, Reda SH, Façanha RAA, Bussadori SK. Papacárie – um novo sistema para a remoção química e mecânica do tecido cariado – relato de caso clínico. Rev Paul Odontol. 2004; 26: 4-8.
38. Stanley HR. Biological evaluation of dental materials. Int Dent J. 1992; 42: 37-46.
39. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. Part I. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1966; 21: 379-87.
40. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. Part II. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1967; 24: 674-83.
41. Trowbridge HO, Emling RC. Inflamação – uma revisão do processo. Quintessence: São Paulo; 1996. 170p.
42. Wataha JC. Biocompatibilidade dos materiais dentários. In: Anusavice KJ. Phillips – materiais dentários. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 161-90.

Grupo I - Papacárie® (3 dias)

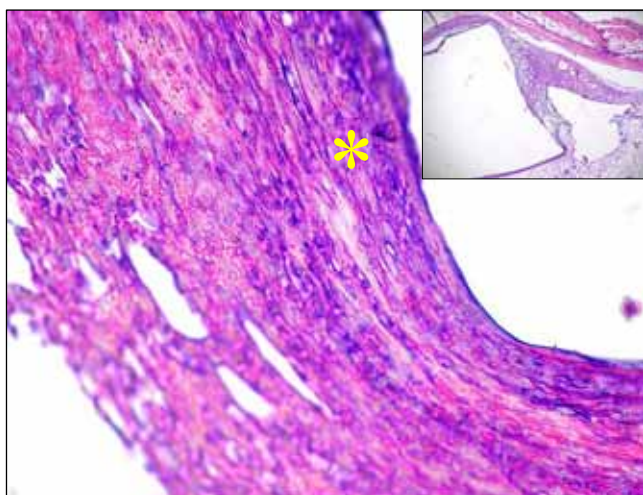


FIGURA 1 - Material amorfo na abertura do tubo(*).
H.E.

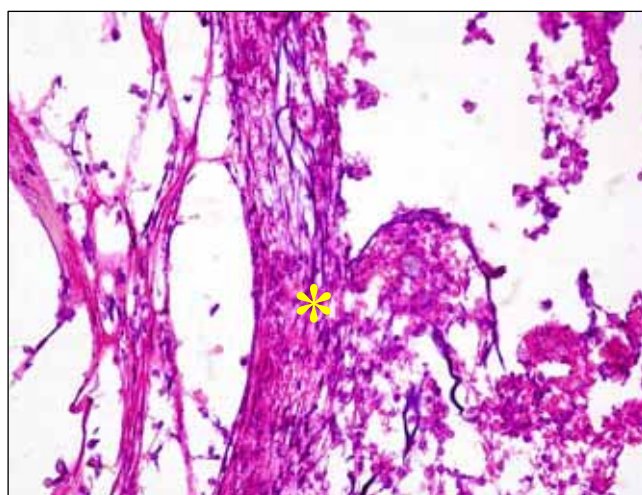


FIGURA 2- Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

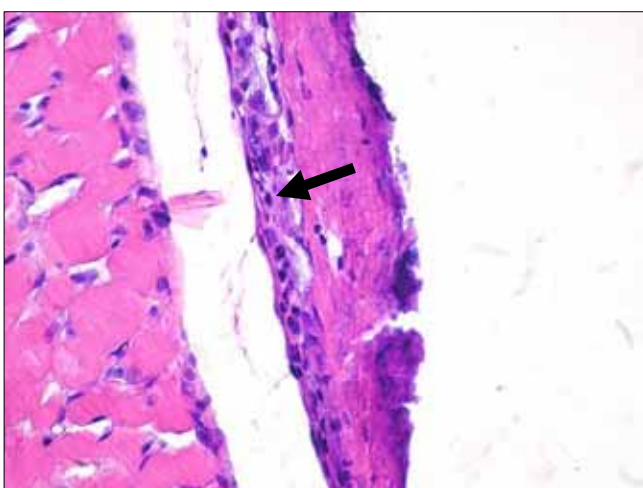


FIGURA 3 – Marginação leucocitária e infiltrado inflamatório moderado (←).
H.E. 400X

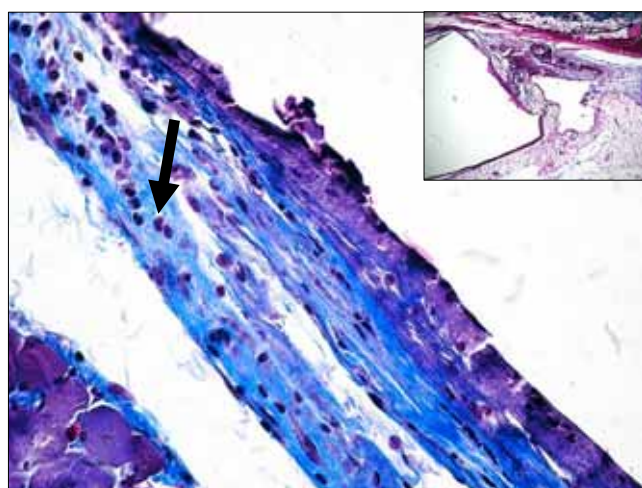


FIGURA 4 - Presença de fibroblastos e macrófagos (↓). T.M. 400X

Grupo I - Papacárie® (7 dias)

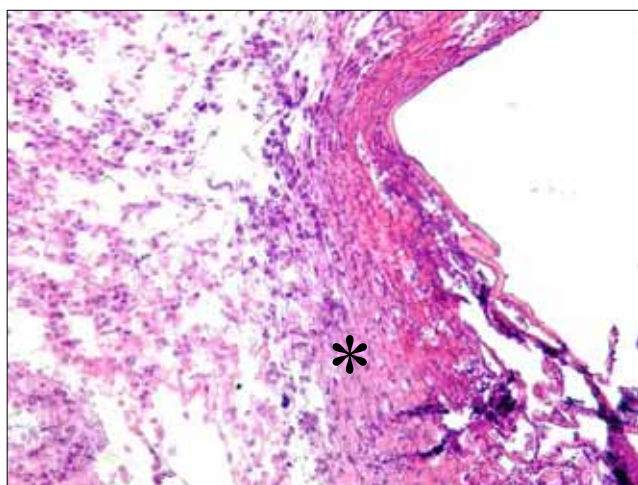


FIGURA 5- Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 200X

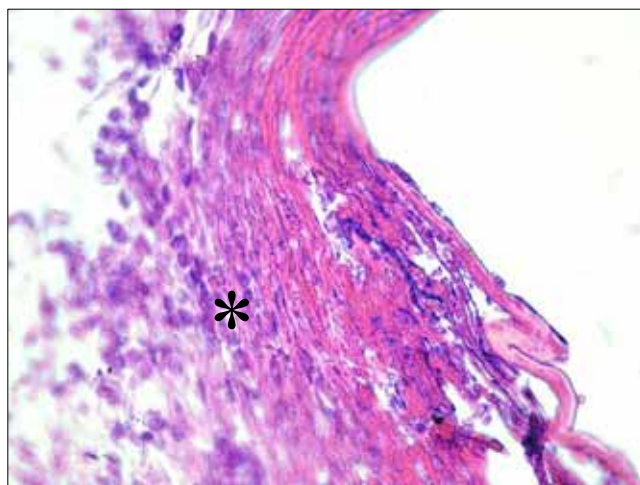


FIGURA 6- Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

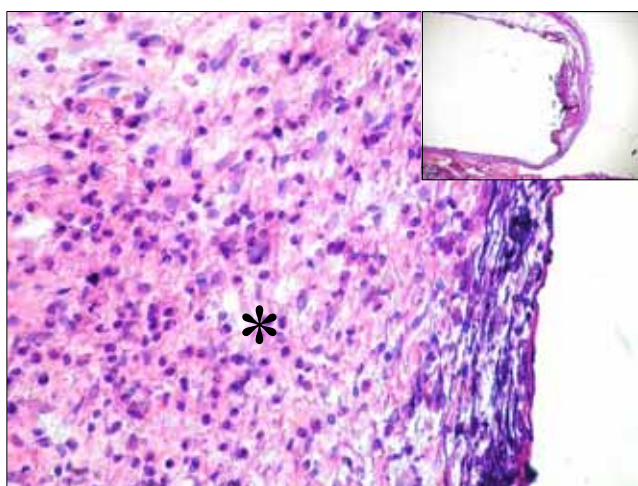


FIGURA 7- Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

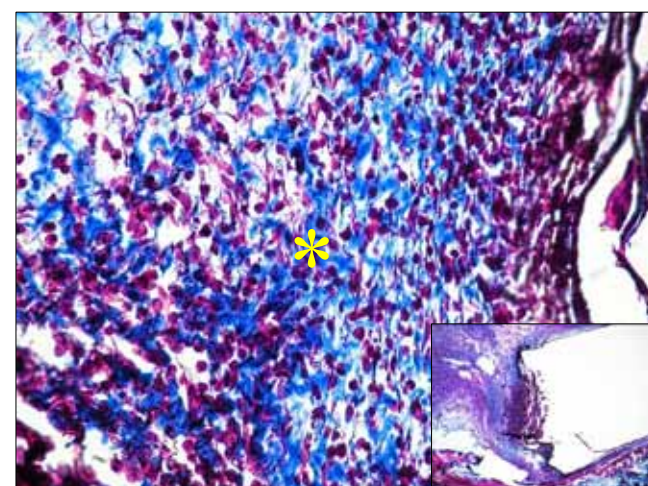


FIGURA 8- Moderado infiltrado inflamatório(*).
T.M. 400X

Grupo I - Papacárie® (20 dias)

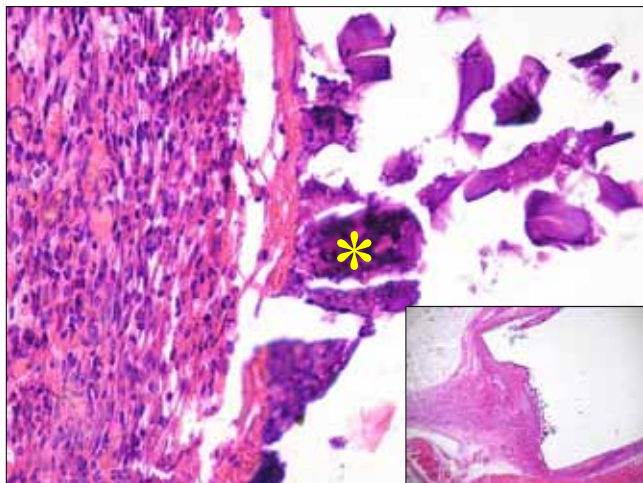


FIGURA 9 - Material amorfo na abertura do tubo(*).
H.E. 400X

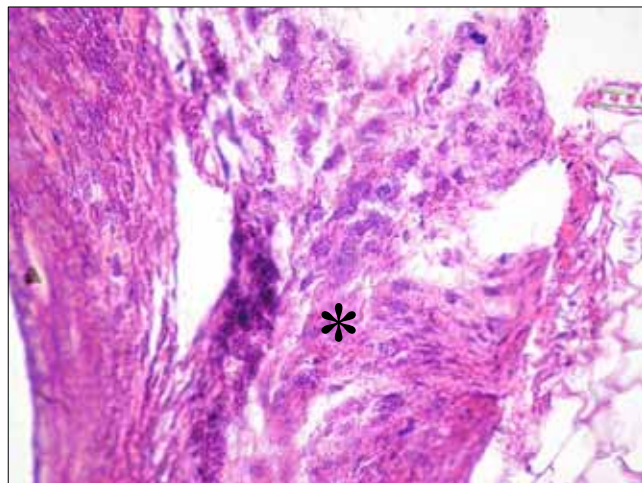


FIGURA 10- Discreto infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

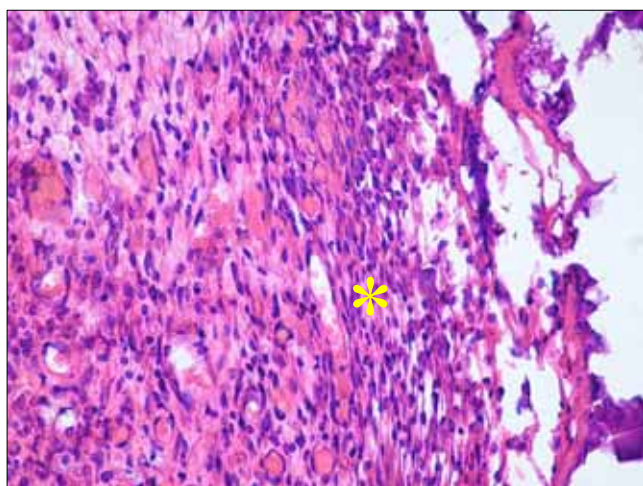


FIGURA 11-Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

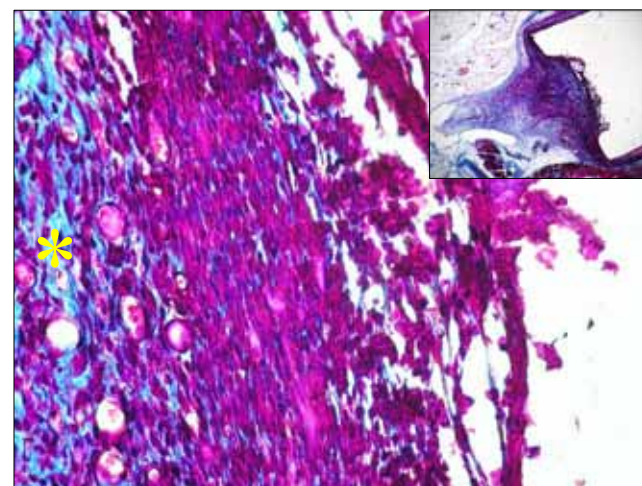


FIGURA 12 - Neoformação de fibras colágenas distantes da abertura do tubo(*).
T.M. 400X

Grupo I - Papacárie® (30 dias)

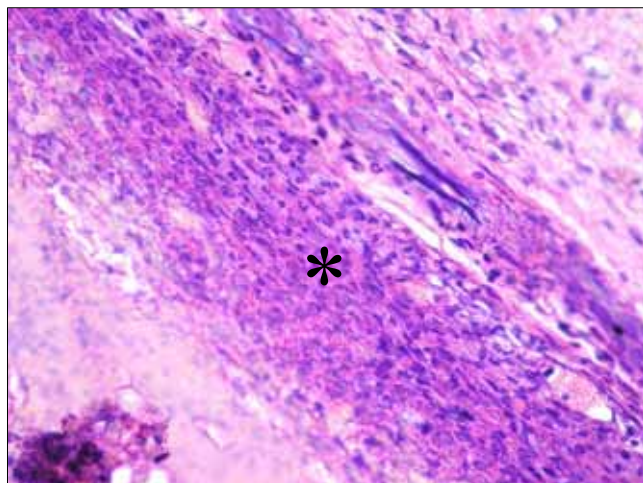


FIGURA 13-Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

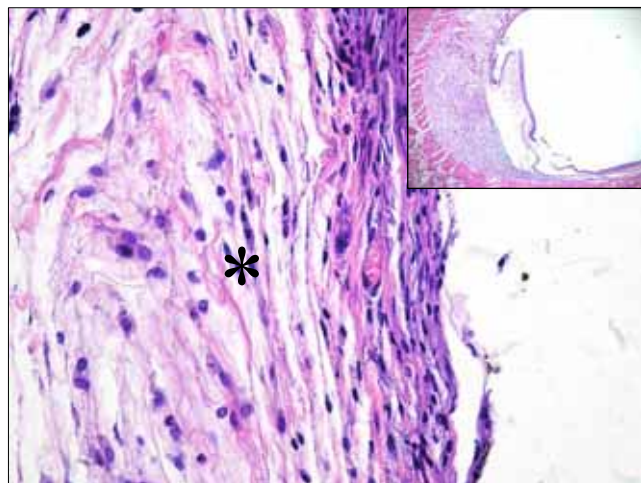


FIGURA 14 - Discreto infiltrado inflamatório
com linfócitos(*). H.E. 400X

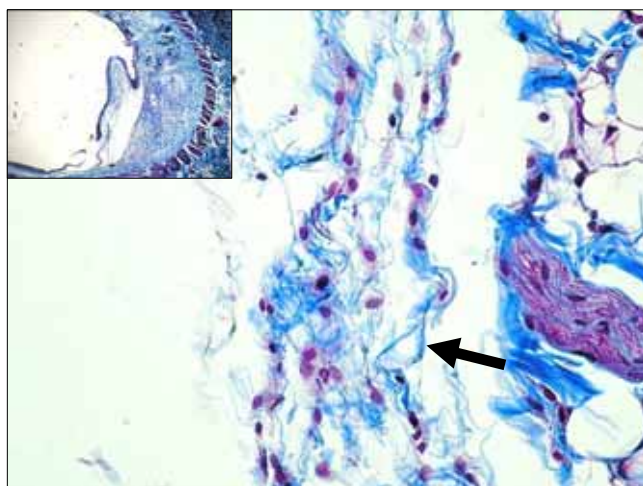


FIGURA 15 - Neoformação fibrilar (←).
T.M. 400X

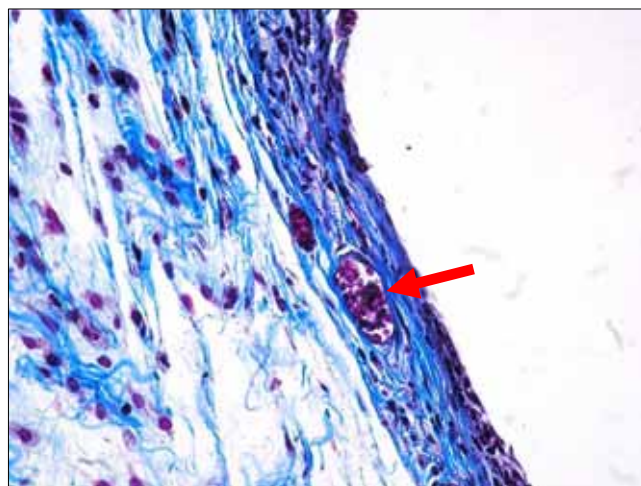


FIGURA 16 - Congestão vascular (←).
T.M. 400X

Grupo II – Base de gel (3dias)

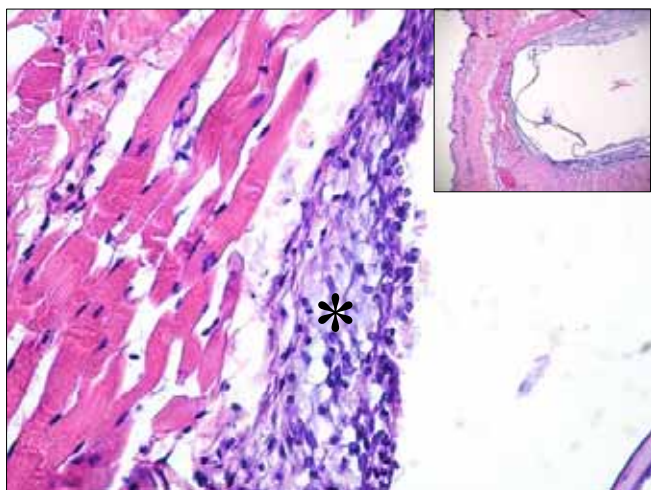


FIGURA 17 - Discreta inflamação(*). H.E. 400X

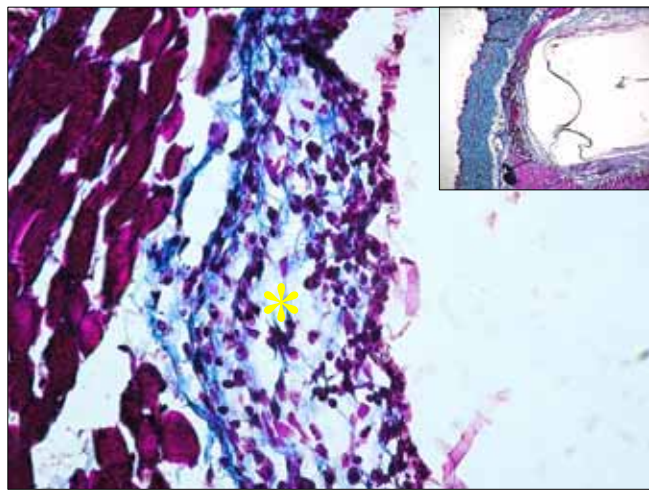


FIGURA 18 - Discreta inflamação(*). T.M. 400X

Grupo II – Base de gel (7dias)

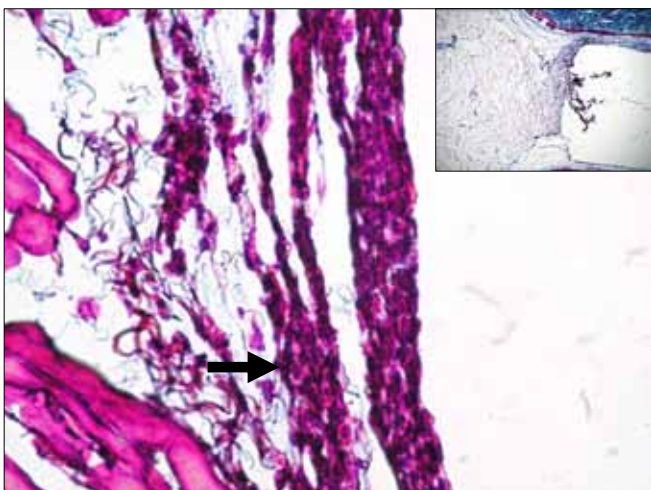


FIGURA 19 - Discreta inflamação e retenção de líquido tissular(→). T.M. 400X

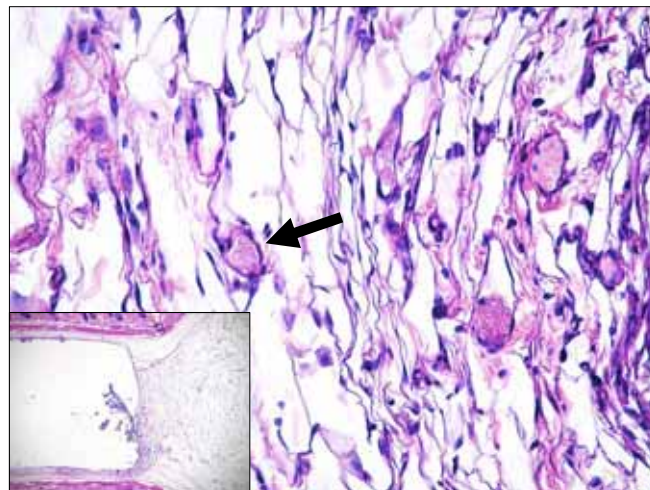


FIGURA 20 - Hiperemia vascular(←).H.E. 400X

Grupo II – Base de gel (20 dias)

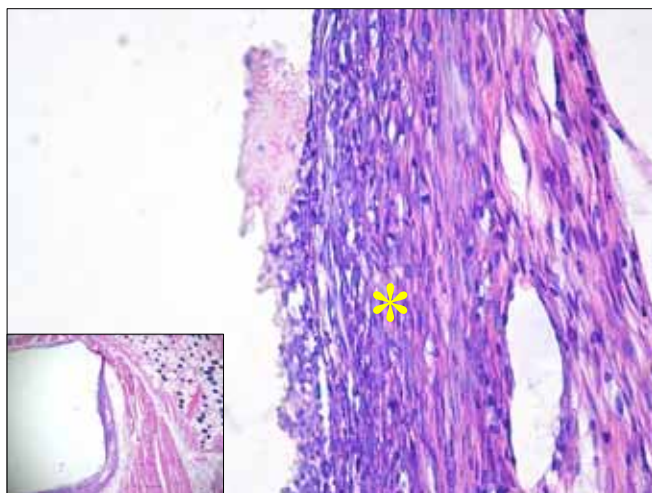


FIGURA 21 - Discreto infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

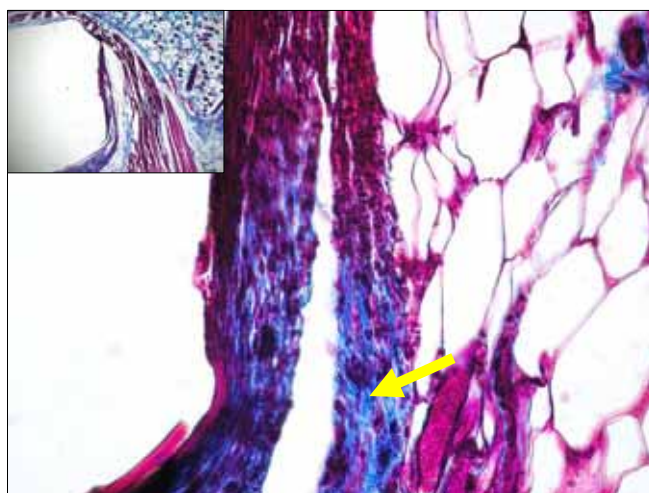


FIGURA 22-Neoformação de fibras colágenas(↑).
T.M. 400X

Grupo II – Base de gel (30 dias)

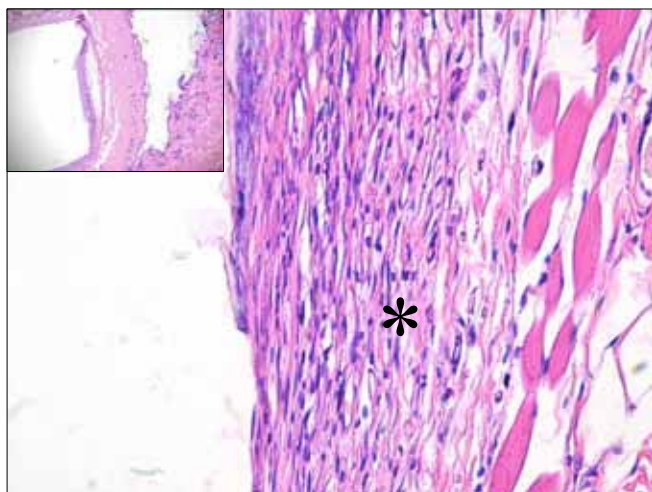


FIGURA 23- Moderado infiltrado inflamatório(*).
H.E. 400X

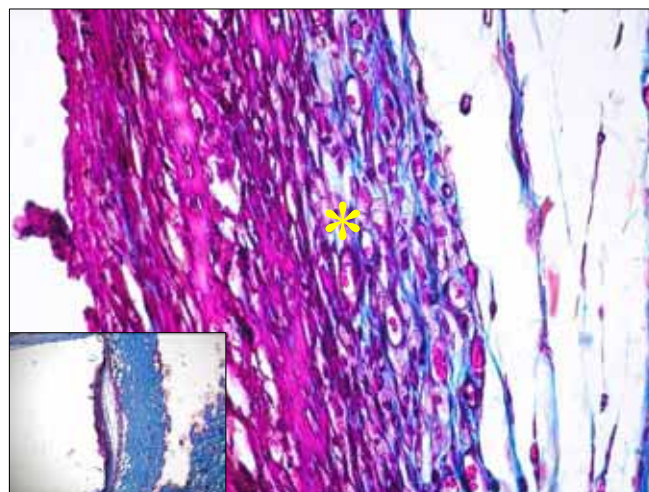


FIGURA 24- Moderado infiltrado inflamatório(*).
T.M. 400X

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O implante de amostras de materiais no tecido conjuntivo de pequenos animais^{6,38} é indicado para avaliar a biocompatibilidade de materiais odontológicos^{16,21}. Esta metodologia oferece diversas vantagens como: execução relativamente simples e rápida, permitir a implantação de materiais recentemente manipulados, possibilidade de comparar a resposta tecidual num mesmo animal, para mais de um material experimental implantado; por não envolver tecido calcificado, não há necessidade de descalcificação dos espécimes, o que acelera o processamento laboratorial e o custo para o desenvolvimento da metodologia de implantação é relativamente baixo^{12,41}.

Este teste não pode ser de imediato extrapolado para o homem, mas é recomendado pela FDI¹⁶ e ISO²¹ como preliminar para se comparar o grau de irritabilidade de materiais odontológicos.

O tecido conjuntivo subcutâneo de pequenos animais apresenta aspectos histofisiológicos comuns e inerentes ao tecido conjuntivo dos mamíferos, que nos permitem projetar, dentro de certos limites, o que poderia resultar os efeitos agressivos de materiais odontológicos em tecido conjuntivo dentinário e pulpar^{6,38}.

O ideal seria a avaliação da biocompatibilidade em seres humanos, mas as exigências da sociedade moderna por normas apropriadas de ética e segurança limitam o número de ocasiões em que isto pode ser realizado, pelo menos na avaliação inicial^{11,41}.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

1. Al-kilani MG, Whitworth JM, Dummer PMH. Preliminary in vitro evaluation of CarisolvTM as a root canal irrigant. *Int Endod J*. 2003; 36: 433-40.
2. Ammari MM, Moliterno LFM. Remoção químico-mecânica da cárie: evidências atuais. *Rev Bras Odontol*. 2005; 62: 125-7.
3. Barbosa CM, Marckezi M, Oliveira MRB, Abreu e Lima FCB. Biocompatibilidade de uma pasta à base de óxido de zinco associado à clorexidine e nimesulide, em implantes subcutâneos em ratos [resumo 16]. In: *Anais da XI Jornada Acadêmica de Araraquara*; 1997 nov. 3-5; Araraquara. Araraquara; 1997.
4. Beeley JA, Yip HK, Stevenson AG. Chemochemical caries removal: a review of the techniques and latest developments. *Br Dent J*. 2000; 188: 427-30.
5. Berto PM, Rickli AC, Melo CSA, Silva LP, Bezerra ACB, Toledo OA. Reaction of mouse subcutaneous tissue to Carisolv – a morphologic study. *Gen Dent*. 2004; 52: 506-8.
6. Browne RM. Animal tests for biocompatibility of dental materials – relevance, advantages and limitations. *J Dent*. 1994; 22 (Suppl 2): S21-4.
7. Bulut G, Zekioglu O, Eronat C, Bulut H. Effect of Carisolv on the human dental pulp: a histological study. *J Dent*. 2004; 32: 309-14.
8. Bussadori SK, Castro LC, Galvão AC. Papain gel: a new chemo-mechanical caries removal agent. *J Clin Pediat Dent* 2005; 2: 115-9.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site:
http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

9. Bussadori. SK, Martins MD, Fernandes KPS, Guedes CC, Motta LJ, Redá SH. Avaliação da biocompatibilidade “in vitro” de um novo material para a remoção química e mecânica da cárie – Papacárie. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr*. 2005; 5: 253-9.
10. Carvalho DR, Magro Filho O, Carvalho ACP. Implante de matriz óssea humana desmineralizada em forma de gel (Grafton DBM gel®) em cavidades ósseas e tecido conjuntivo subcutâneo: avaliação histológica em ratos. *RBP: Rev Bras Implantodont Protese Implant*. 2003; 10: 48-55.
11. Carvalho PSP, Bassi APF, Pereira LAVD. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais. *Implant News* 2004; 1: 255-60.
12. Costa CAS, Hebling J, Souza PPC. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: Estrela, C. *Metodologia científica*. 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 231-71.
13. Dammaschke T, Stratmann U, Mokrys K, Kaup M, Ott KHR. Histocytological evaluation of the reaction of rat pulp tissue to Carisolv. *J Dent*. 2001; 29: 283-90.
14. Dammaschke T, Stratmann U, Danesh G, Schäfer E, Ott KHR. Reaction of rat pulp tissue to Carisolv ‘new gel’ – a histocytological evaluation. *Aust Dent J*. 2006; 51: 57-63.
15. Ericson D, Zimmerman M, Raber H, Götrick B, Bornstein R, Thorell J. Clinical evaluation of efficacy and safety of a new method for chemo-mechanical removal of caries. A multi-centre study. *Caries Res*. 1999; 33: 171-7.

16. Federation Dentaire International. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1980; 30: 140-88.
17. Fure S, Lingström P. Evaluation of the chemomechanical removal of dentine caries in vivo with a new modified Carisolv gel. *Clin Oral Investig.* 2004; 8:139-44.
18. Fusayama T. Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. *Oper Dent.* 1979; 4: 63-70.
19. Grisi DC, Theodoro LH, Sampaio JEC, Grisi MFM, Salvador SLS. Scanning electron microscopic analysis of the effect of Carisolv gel on periodontally compromised human root surfaces. *Braz Dent J.* 2006; 17: 110-6.
20. Habib CM, Kronman J, Goldman M. A chemical evaluation of collagen and hydroxyproline after treatment with GK-101 (N-Chloroglycine). *Pharmacol Ther Dent.* 1975; 2: 209-15.
21. International Organization for Standardization. ISO 7405: Dentistry – preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials. Genève: ISO; 1997.
22. Kronman JH, Goldman M, Habib CM, Mengel L. Electron microscopic evaluation of altered collagen structure induced by N-monochloroglycine (GK-101). *J Dent Res.* 1977; 56: 1539-45.
23. Magro Filho O, Carvalho ACP, Martins AL, Câmara PRL. Reações do tecido conjuntivo à pomada de confrei, própolis e mel. Estudo histológico em ratos. *Rev Bras Odontol.* 1987; 44: 44-8.

24. Maragakis GM, Hahn P, Hellwig E. Chemomechanical caries removal: a comprehensive review of the literature. *Int Dent J*. 2001; 51: 291-9.
25. Martins MD, Fernandes KPS, Pavesi VCS, Motta LJ, Reda SH, Bussadori SK. Avaliação da biocompatibilidade em subcutâneo de ratos de materiais para remoção química e mecânica de cárie [resumo Pc198]. *Braz Oral Res*. 2006; 20: 291.
26. Moresco FC, Souza MAL. Estudo microscópico dos efeitos de clareadores dentais na mucosa bucal e no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. *Rev Odonto Cienc*. 2001; 16: 251-8.
27. Myiagi SPH, Bussadori SK, Marques MM. Resposta de fibroblastos pulpaes humanos ao gel de Papacárie[®] [resumo PA69]. *RPG Rev Pos-Grad*. 2004; 11: 287.
28. Nevins A, Finkelstein F, Borden BG, Moodnik R. Formation of mineralized scar tissue induced by implants containing collagen-calcium phosphate gel. *J Endod*. 1975; 1: 303-9.
29. Ohgushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Res*. 1975; 54: 209-15.
30. Pascon EA, Paiva JG, Langeland K. Biocompatibilidade do Endogel. *Rev Bras Odontol*. 1987; 44: 10-20.
31. Pereira SA, Silva LR, Motta LJ, Bussadori SK. Remoção químico mecânica de cárie por meio do gel Papacárie[®]. *Rev Gaucha Odontol*. 2004; 52: 385-8.

32. Poi WR, Carvalho PSP, Andrade ED. Estudo histológico do comportamento do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao implante de uma pasta à base de metronidazol a 10% e lidocaína a 2%. *Rev Gaucha Odontol.* 1999; 47: 102-9.
33. Rahman S, Whitworth JM, Dummer PMH. CarisolvTM: an alternative to NaOCl in immature root canals? *Int Endod J.* 2005; 38: 448-55.
34. Ribeiro GG. Avaliação da reação do tecido subcutâneo de ratos ao digluconato de clorexidina a 2% e à pasta de hidróxido de cálcio: análises edemogênica e microscópica óptica [Dissertação de Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia da USP; 2002.
35. Santos EM, Bussadori SK, Jaeger MMM, Guedes-Pinto AC. Análise *in vitro* da citotoxicidade do Carisolv em cultura celular [resumo B147]. *Pesqui Odontol Bras.* 2000; 14: 127.
36. Serafim DS, Ramalho LTO. Implantes de poliuretano sob a forma de gel em tecido conjuntivo: estudo histológico em camundongos [resumo 25]. In: *Anais da XII Jornada Acadêmica de Araraquara*; 1998 nov. 9-11; Araraquara. Araraquara; 1998.
37. Silva LR, Motta LJ, Reda SH, Façanha RAA, Bussadori SK. Papacárie[®] – um novo sistema para a remoção química e mecânica do tecido cariado – relato de caso clínico. *Rev Paul Odontol.* 2004; 26: 4-8.
38. Stanley HR. Biological evaluation of dental materials. *Int Dent J.* 1992; 42: 37-46.
39. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. Part I. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966; 21: 379-87.

40. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants.
Part II. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1967; 24: 674-83.
41. Wataha JC. Biocompatibilidade dos materiais dentários. In: Anusavice KJ.
Phillips – materiais dentários. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;
2005. p. 161-90.

ANEXOS



Centro Universitário de Araraquara

Rua Voluntários da Pátria, 1309 - Centro - Araraquara - SP
CEP 14801-320 - Caixa Postal 66 - Fone/Fax: (16) 3301-7100

www.uniara.com.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PROTOCOLO: nº 530 de 20 de julho de 2006..

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: "Avaliação da biocompatibilidade de materiais para remoção químico-mecânica da cárie: estudo histológico em tecido conjuntivo de camundongos"

DOCENTE RESPONSÁVEL: Profa. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho

PARECER

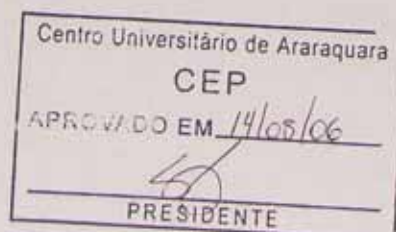
O projeto apresentado tem o objetivo geral de avaliar comparativamente a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos em contato com materiais odontológicos. Serão utilizados 32 camundongos machos, anestesiados com cetamina e relaxante muscular xelazina, submetidos ao tratamentos com Carisolv, Papacárie e gel inerte como controle experimental. Os animais serão mantidos em gaiolas individuais alimentados com ração balanceada e água *ad libitum*. No pós-operatório todos os animais receberão uma dose única de paracetamol. Os implantes dos tubos e os fragmentos contendo os tubos serão removidos dos animais sob anestesia geral. Os animais serão sacrificados por aprofundamento da anestesia.

A análise do projeto referido mostra que o mesmo está adequado às orientações contidas no regimento do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIARA, em conformidade com os princípios internacionais para pesquisas biomédicas envolvendo animais de laboratório.

Assim, considero o mesmo adequadamente estruturado conforme os padrões da ética em pesquisa com animais de laboratório. Portanto sou de parecer favorável à sua execução. .

Araraquara, 14 de agosto de 2006.

RELATOR





Centro Universitário de Araraquara

Rua Voluntários da Pátria, 1209 - Centro - Araraquara - SP
CEP: 14801-222 - Caixa Postal 68 - Fone/Fax: (16) 3301.7100

www.uniara.com.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PROTOCOLO: nº 530 de 20 de julho de 2006..

ASSUNTO: Relatório final sobre o projeto de pesquisa "Avaliação da biocompatibilidade de materiais para remoção químico-mecânica da cárie: estudo histológico em tecido conjuntivo de camundongos"

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Prof.ª Drª Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho
PÓS-GRADUANDA: Simone Di Salvo Mastrantonio

PARECER

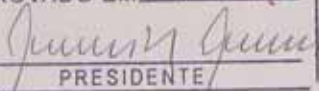
As pesquisadoras Profa. Dra. Lizeti Toledo de Oliveira Ramalho e Simone Di Salvo Mastrantonio apresentam o relatório final da pesquisa "Avaliação da biocompatibilidade de materiais para remoção químico-mecânica da cárie: estudo histológico em tecido conjuntivo de camundongos" que, por motivos de publicação, foi dividido em duas partes: 1) Avaliação da biocompatibilidade do Carisolv e Papacárie: estudo histológico em tecido conjuntivo de camundongos e 2) Avaliação da biocompatibilidade do Papacárie: estudo histológico em tecido conjuntivo de camundongos.

A análise do relatório mostra que as pesquisas foram executadas conforme o protocolo apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIARA, em 14 de agosto de 2006, estando adequado aos princípios internacionais para pesquisas biomédicas envolvendo animais de laboratório.

Assim, sou de parecer favorável à aprovação do relatório apresentado.

Araraquara, 12 de maio de 2007.

RELATOR/PARECERISTA

Centro Universitário de Araraquara
CEP
APROVADO EM 12/03/2007

PRESIDENTE