UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

MARCOS BERTI JACOMINE

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE CRÔNICO NA BIOCOMPATIBILIDADE DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS

Araçatuba - SP
2025

MARCOS BERTI JACOMINE

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE CRÔNICO NA BIOCOMPATIBILIDADE DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia de Araçatuba, para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Angelo Tavares Cintra

Araçatuba - SP
2025

Dedico este trabalho à Marcos e Silmara Jacomine

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar e trilhar meu caminho.

Agradeço a minha família pelo apoio e pela compreensão em todas as etapas de minha vida, especificamente aos meus pais: Marcos Rogerio Jacomine e Silmara Maria Berti Jacomine, que nunca pouparam esforços para me colocarem onde estou hoje. A eles devo tudo.

Agradeço ao meu irmão, Lucas Jacomine por todo apoio em muitos momentos difíceis que enfrentei e por estar do meu lado quando precisei.

Agradeço ao meu Professor e Orientador, Luciano Tavares Angelo Cintra, pela oportunidade de estar dentro de um grupo seleto e especial, o qual me proporcionou um imenso prazer em cada etapa desse projeto. Sem seus ensinamentos e empenho muitas portas que hoje estão abertas eu nunca conseguiria sequer encontrá-las.

Um agradecimento especial a mestre e doutoranda Mariana Pagliusi Justo por toda ajuda durante esse processo de aprendizado dentro de um ambiente, até então, completamente novo e inexplorado. Sua paciência foi muito importante para mim.

Agradeço especialmente aos meus amigos, que mesmo em um ambiente completamente novo e inexplorado para todos, se tornaram minha segunda família por 5 ótimos anos. Espero ter suas companhias para o resto da vida.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, à Universidade Estadual Paulista, e ao Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

Ao programa institucional de bolsas de iniciação cientifica (PIBIC) por aceitarem e acreditarem no meu projeto (Número da Proposta 6601)

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP por acreditar em nosso trabalho (Processo 2021/03861-3).

“Na natureza, nada se cria, nada se perde, tudo se transforma”

Lavoisier, 1785

RESUMO

JACOMINE, M. B. **Influência do Estresse Crônico na Biocompatibilidade de Cimentos Endodônticos**. 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2025.

Os cimentos endodônticos quando em contato com os tecidos são capazes de provocar reações inflamatórias de diferentes intensidades, de acordo com a composição desses materiais. O estresse crônico afeta consideravelmente a resposta imunológica, através do aumento da concentração de glicocorticoides, de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, que podem afetar também a reparação tecidual. O objetivo desse estudo foi correlacionar o estresse crônico com a reposta tecidual de diferentes cimentos endodônticos empregando o modelo de biocompatibilidade (ISO 10993-6:2016) em tecido subcutâneo de ratos. Foram utilizados 28 ratos Wistar divididos em 2 grupos, com 14 animais cada: ratos controle (rC) e ratos estressados (rE). Cada animal recebeu implante de 4 tubos de polietileno em seu tecido subcutâneo, sendo três deles preenchidos de cimentos obturadores (Sealapex, AH Plus e Endofill) e um vazio para controle. Os períodos de avaliação foram de 7 e 30 dias (n=7/tempo). Após a eutanásia, os tubos e o tecido circundante foram removidos e processados para análise microscópica. A inflamação foi avaliada em cortes teciduais corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e o processo reparativo por meio da análise do colágeno, empregando a coloração de Picrosírios red (PSR). A estatística foi realizada de acordo com cada tipo de análise e foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Na análise histológica em rC aos 7 dias observou-se que o grupo Endofill apresentou infiltrado inflamatório mais intenso comparado ao Controle ($p = 0,031$). Em rE não houve diferença entre os grupos em nenhum período ($p > 0,05$). Comparando a resposta de cada grupo em função da presença ou não do estresse, observou-se que apenas aos 7 dias o grupo controle em rE apresentou infiltrado inflamatório mais intenso que o grupo Controle em rC ($p < 0,05$). Para PSR, na comparação entre os grupos em rC, aos 7 dias, os grupos Sealapex e Endofill apresentaram maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras quando comparados aos grupos Controle e AH Plus ($p < 0,05$). O grupo Controle, Sealapex e Endofill em rE apresentaram maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras comparado aos grupos Controle, Sealapex e

Endofill em rC ($p < 0,05$). O grupo AH Plus em rE, tanto aos 7 dias quando aos 30 dias apresentou maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras comparado ao grupo AH Plus em rC $p < 0,05$. Portanto, conclui-se que o estresse crônico influenciou a resposta tecidual de cimentos endodônticos, aumentando o infiltrado inflamatório e retardando o reparo tecidual.

Palavras-chave: Materiais dentários. Inflamação. Endodontia.

ABSTRACT

JACOMINE, M. B. **Influence of Chronic Stress on the Biocompatibility of Endodontic Cements .** 2025. Bachelor's Degree Thesis – School of Dentistry, São Paulo State University (UNESP), Araçatuba, 2025.

When in contact with tissues, endodontic cements are capable of provoking inflammatory reactions of different intensities, depending on the composition of these materials. Chronic stress considerably affects the immune response by increasing the concentration of glucocorticoids, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, which can also affect tissue repair. The aim of this study was to correlate chronic stress with the tissue response of different endodontic cements using the biocompatibility model (ISO 10993-6:2016) in rat subcutaneous tissue. 28 Wistar rats were used, divided into 2 groups of 14 animals each: control rats (rC) and stressed rats (rE). Each animal had 4 polyethylene tubes implanted in its subcutaneous tissue, three of which were filled with filling cements (Sealapex, AH Plus and Endofill) and one was empty for control purposes. The evaluation periods were 7 and 30 days (n=7/time). After euthanasia, the tubes and surrounding tissue were removed and processed for microscopic analysis. Inflammation was assessed in tissue sections stained with Hematoxylin and Eosin (HE) and the repair process through collagen analysis using Picrosirius red (PSR) staining. Statistics were performed according to each type of analysis and a significance level of 5% ($p < 0.05$) was considered. Histological analysis of rC at 7 days showed that the Endofill group had a more intense inflammatory infiltrate compared to the Control group ($p = 0.031$). In rE, there was no difference between the groups at any time ($p > 0.05$). Comparing the response of each group according to the presence or absence of stress, it was observed that only at 7 days did the control group in rE show a more intense inflammatory infiltrate than the Control group in rC ($p < 0.05$). For PSR, when comparing the groups in rC, at 7 days, the Sealapex and Endofill groups showed a higher percentage of immature fibers and a lower percentage of mature fibers when compared to the Control and AH Plus groups ($p < 0.05$). The Control, Sealapex and Endofill groups in rE showed a higher percentage of immature fibers and a lower percentage of mature fibers compared to the Control, Sealapex and Endofill groups in rC ($p < 0.05$). The AH Plus group in rE, both at 7 days and 30 days, showed a higher percentage of immature fibers and a lower percentage of mature fibers compared to the AH Plus group in rC ($p < 0.05$). Therefore, it can be concluded that chronic stress influenced the tissue response to endodontic cements, increasing the inflammatory infiltrate and delaying tissue repair.

Keywords: Dental materials. Inflammation. Endodontics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 20
Figura 2 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escores medianos e interquartis atribuídos para a resposta inflamatória dos grupos Controle e de cimentos endodônticos em rC e rE 22

Tabela 2 – Média das fibras maduras e imaturas de cimentos endodônticos em rC e rE 24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais
HE	Hematoxilina-eosina
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
PSR	Picrosirius red
rC	Ratos controle
rE	Ratos estressados
SNS	Sistema nervoso simpático

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 DESENVOLVIMENTO	14
3 MATERIAIS E METODOS	14
3.1 Materiais	14
3.2 Metodos	15
4 RESULTADOS	19
4.1 Perfil Inflamatório (HE).	19
4.2 Maturação do colagena	22
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

O estresse é um mecanismo fisiológico de defesa do organismo que tem os sistemas nervoso e imunológico atuando no processo adaptativo aos chamados agentes estressores (Dragos & Tănăsescu, 2010). As principais vias de interação entre esses dois sistemas são o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), o sistema nervoso simpático (SNS) e seus componentes pró-inflamatórios, imunológicos e metabólicos (Godoy et al., 2018). Um desajuste no eixo HPA induzido pelo estresse crônico afeta a resposta neuroendócrina e influência na resposta imunológica, através do aumento da concentração de glicocorticoides, de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Keller-Wood, 2015). Entender a resposta inflamatória frente à cimentos endodônticos em animais estressados se torna um tema pertinente para ser discutido atualmente, onde os agentes estressores são eminentes à vida moderna.

Os cimentos endodônticos são encontrados em diferentes formulações de acordo com seu composto principal. Os mais comuns são: os a base de resina epóxi, os que possuem o hidróxido de cálcio e os de óxido de zinco e eugenol. As reações teciduais de materiais que entram em contato com os tecidos vivos devem ser verificadas segundo as normas ISO para testes de avaliação das propriedades biológicas. Dentre estes testes, temos o de avaliação do efeito local, utilizando o método de implantação em tecido subcutâneo de ratos (ISO 10993-6:2016). Para o estudo foram selecionados cimentos endodônticos com formulações diferentes, justamente para analisar os efeitos de vários componentes em função do estresse crônico. Os cimentos Sealapex que contém o hidróxido de cálcio e o cimento AH Plus à base de resina epóxi são considerados biocompatíveis enquanto que o cimento Endofill promove uma inflamação mais exacerbada e que permanece por maiores períodos de análise (Cintra et al., 2017).

O processo inflamatório pode ser avaliado pela coloração de HE (Gomes-Filho et al., 2009). Além disso, podemos analisar o processo de reparo verificando a maturação do colágeno pela coloração de PSR (Benetti et al., 2020), cuja birrefringência permite distinguir as fibras maturas de imaturas.

Assim, a proposta do presente estudo é correlacionar o estresse crônico com as repostas teciduais frente a diferentes tipos de cimentos endodônticos, aplicando metodologias já conhecidas e padronizadas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do estresse por retenção sobre a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos Sealapex, Endofill e AH Plus empregando o modelo ISO 10993-6:2016, para testes de implantação em tecido subcutâneo.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos do estudo foram:

- Avaliar o infiltrado inflamatório frente aos diferentes cimentos, pela coloração de hematoxilina-eosina (HE);
- Avaliar a produção e maturação do colágeno frente aos diferentes cimentos, por meio da coloração de Picrosirius red, em tecido subcutâneo de rE e rC;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

- Animais

Foram utilizados 28 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando entre 250g a 280g, com 75 dias de vida, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24ºC com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, quatro ratos por gaiola, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 24 horas após a intervenção. Os procedimentos experimentais propostos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais – CEUA (Processo FOA nº 0250-2021).

- Drogas

Os animais ficaram em quarentena para adaptação no novo habitat e para contenção de alguma possível doença de fácil propagação. Uma semana antecedente ao procedimento cirúrgico, os animais foram vermifugados com Ivermectina 1%

(Boehringer Ingelheim Animal Health do Brasil Ltda, Paulínia, Brasil) via oral (0,3 ml dissolvidos em 1 litro de água) por um período de 5 dias.

O protocolo anestésico utilizado para o procedimento cirúrgico de implantação dos tubos foi à base de Xilazina 2% (relaxante muscular, analgésico e sedativo, Xilazin, Syntec – Barueri, Brasil – 10mg/Kg) e à base de Cloridrato de Cetamina a 10% (Cetamin, Syntec – Barueri, Brasil – 80mg/Kg), via intramuscular. Para eutanásia, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com Thiopentax® 3% (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil), na dosagem de 150mg/kg e, em seguida, foram decapitados com o auxílio de uma guilhotina.

- Cimentos endodônticos utilizados

Foram utilizados o cimento Sealapex® (Kerr Endodontics, SybronEndo, Joinville, Brasil, Endofill® (DENTSPLY Indústria e Comércio Ltda. Pirassununga, Brasil) e AH Plus® 19 (DENTSPLY Indústria e Comércio Ltda. Pirassununga, Brasil). Cada cimento foi preparado de acordo com a especificações do fabricante e imediatamente inseridos nos tubos de polietileno.

3.2. Métodos

- Implantação dos tubos

Foram utilizados 112 tubos de polietileno (Abbot Lab. Do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) com 1,0 mm de diâmetro interno, 1,6 mm de diâmetro externo e 10,0 mm de comprimento (ISO 10993-6:2016) (International Organization for Standardization, 2016) os quais foram esterilizados em óxido de etileno (ISO 10993-7:2008) (International Organization for Standardization, 2008).

Os animais foram inicialmente pesados, e o protocolo anestésico descrito anteriormente foi utilizado. O período de trabalho com cada animal não ultrapassou 5 minutos e não houve necessidade de complementação anestésica.

Após a anestesia, foi feita a tricotomia da região dorsal e lavagem da área com a finalidade de se evitar contaminação do campo cirúrgico pela presença de pelos. A antissepsia da área desprovida de pelos foi efetuada com solução de iodo 5%. Em seguida, o procedimento cirúrgico iniciou-se, realizando uma incisão com lâmina de bisturi número 15 no dorso do animal (tendo a coluna vertebral como linha média de marcação). Após a divulsão do tecido subcutâneo para o lado esquerdo da porção

cranial e caudal e direito da porção cranial e caudal, cada bolsa recebeu um tubo com auxílio de pinça reta. Assim, cada animal recebeu quatro tubos, sendo três preenchidos com um dos cimentos e um tubo vazio para controle. O tecido foi suturado com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson e Johnson, São Paulo, Brasil) não reabsorvível e antissepsia final foi realizada com solução de iodo 5%. Os animais foram acompanhados até se recuperarem da anestesia antes de retornarem ao biotério.

- Indução do estresse crônico por retenção

Para indução do estresse crônico foi utilizado o modelo de retenção física descrito na literatura (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009; PARÉ; GLAVIN, 1986) com pequena modificação pois tínhamos aparelhos projetados e construídos especificamente para este fim. Os aparelhos foram construídos com material acrílico resistente e transparente composto cada um por 5 espaços retangulares individuais de largura fixa e comprimento ajustável com orifícios para ventilação. Cada espaço possui uma alavanca individual que quando colocada e ativada diminui a área de movimentação do animal para uma área próxima ao seu comprimento, determinando assim, a imobilização física. Para o estímulo estressor os animais foram colocados nas vagas individuais e as alavancas foram ajustadas para indução do estresse por contenção

Os animais a serem submetidos ao estresse (rE), foram transportados da sala da colônia para uma sala tranquila e isolada. Os animais foram submetidos à retenção por 2 horas diárias das 8h às 10h. Empregamos o período de uma sessão de 2 horas que é considerado suficiente para ativar o eixo HPA e aumentar níveis circulantes de corticosterona (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009; ECHEVERRY; GUIMARÃES; DEL BEL, 2004). Com 7 dias de imobilização física, os animais já podem ser considerados estressados, com a ativação do eixo HPA, sendo que 14 dias é o máximo de tempo que esses animais podem ser estressados sem se habituar ao estímulo. No início do experimento, os animais foram submetidos ao estímulo estressor durante 7 dias, para que estivessem estressados no momento da implantação dos tubos. Os animais do primeiro período experimental passaram por 14 dias de indução do estresse para ativar o eixo HPA (7 dias antes e 7 dias depois da cirurgia de implantação dos tubos). Já os animais do segundo tempo experimental (30 dias), embora já sejam considerados animais estressados, passaram por um período de 9 dias sem

imobilização física, e em seguida foram submetidos a mais 7 dias de estresse por retenção, até o momento da eutanásia. Esse cronograma foi adotado para evitar que os animais ficassem habituados com o estímulo estressor. Os animais do grupo controle (rC) foram mantidos em suas gaiolas sem serem perturbados.

- Grupos Experimentais

Os animais foram submetidos ao estresse de forma randomizada, ficando assim divididos em ratos controle (rC) e ratos estressados (rE). Como cada animal recebeu 4 implantes, sendo 3 com cimentos e 1 tubo vazio, ao final obtivemos 8 grupos.

- Eutanásia

Os períodos de avaliação foram de 7 e 30 dias. A cada tempo experimental, 7 animais foram eutanasiados. Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com Thiopentax® 3% (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, Brasil), na dosagem de 150mg/kg. Em seguida foi realizada a eutanásia com o auxílio de equipamento apropriado, a guilhotina.

- Coleta do tecido subcutâneo com os tubos de polietileno e processamento laboratorial

Após sacrifício, foi realizada novamente tricotomia da região dorsal e antissepsia da área com solução de iodo à 5%. Logo após, foi realizada nova incisão com lâmina de bisturi número 15 utilizando a coluna vertebral como linha média de marcação. Os tubos foram localizados e removidos juntamente com os tecidos circundantes e foram fixados em solução formalina à 10% e pH 7. As amostras foram processadas, incluídas em parafina, cortadas seriadamente com 5µm de espessura e montadas em lâminas para as colorações de HE e Picrosírius red.

- Análise histológica

Os resultados foram expostos por meio de análises descritiva, qualitativa e quantitativa, referentes a cada grupo experimental e tempo pós-operatório. As lâminas contendo os cortes mais representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica e utilizadas na análise descritiva. A análise histomorfológica qualitativa consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando

caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais. As análises qualitativa e quantitativa foram realizadas seguindo os critérios previamente definidos:

• Critério infiltrado inflamatório

Esta análise consistiu na avaliação das condições histopatológicas das estruturas examinadas, atribuindo magnitudes registradas sob a forma de escores de 1 a 4 para resposta inflamatória, possibilitando dados para análise estatística no Software SigmaPlot 12.0™ (Chicago, IL, USA). A intensidade do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio de células inflamatórias presentes em diferentes campos, de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400X. O método de avaliação foi pela atribuição de escores e baseado nos critérios descritos por Orstavik (1988), Federation Dentaire International (1980) e Cintra et al. (2017c), assim considerados: Escore 1 - Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível; Escore 2 - Infiltrado inflamatório discreto (menos de 25 células por campo); Escore 3 - Infiltrado inflamatório moderado (entre 25 e 125 células por campo); Escore 4 - Infiltrado inflamatório severo (mais que 125 células por campo).

• Critério fibrosamento (HE)

O fibrosamento foi analisado por meio da mensuração da cápsula fibrosa. A cápsula foi considerada fina quando menor ou igual a 150µm e espessa quando maior que 150µm.

• Critério maturação do Colágeno (PSR)

Os níveis de maturação das fibras de colágeno foram analisados nas secções coradas por PSR sob microscopia de luz polarizada. O programa Leica LAS 4.12 (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) foi utilizado permitindo a seleção de cores correspondentes para cada tipo de fibra de colágeno nos tecidos subcutâneos. Após a seleção de cores, o programa calculou automaticamente a área referente à cada tipo de fibra. As fibras amarelas esverdeadas foram consideradas imaturas e finas, enquanto as fibras vermelhas amareladas foram consideradas maduras e grossas.

- Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot 12.0™ (Chicago, IL, USA). A verificação da distribuição normal das variáveis contínuas quantitativas foi feita pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. As variáveis

que apresentarem distribuição normal foram expressas em média e +- desvio padrão e aquelas que apresentarem distribuição não normal foram expressas em mediana com valor mínimo e máximo e percentis. Os valores quantitativos das análises que seguiram uma distribuição normal foram aplicados o teste ANOVA, enquanto que para comparações múltiplas dos resultados entre os grupos estudados, foi realizado o teste Tukey.

Para as análises em escores e para os valores quantitativos das análises que não seguirão uma distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, e quando observada alguma diferença significativa, foi realizado o cruzamento entre os grupos, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Também foi empregado o teste de Mann Whitney (SIEGEL et al., 1956) para comparação entre dois grupos isoladamente. Para todos os testes empregados foi considerado o nível de significância de 5% ($p<0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Perfil Inflamatório (HE)

As imagens representativas dos diferentes espécimes de todos os grupos são mostradas na figura 1.

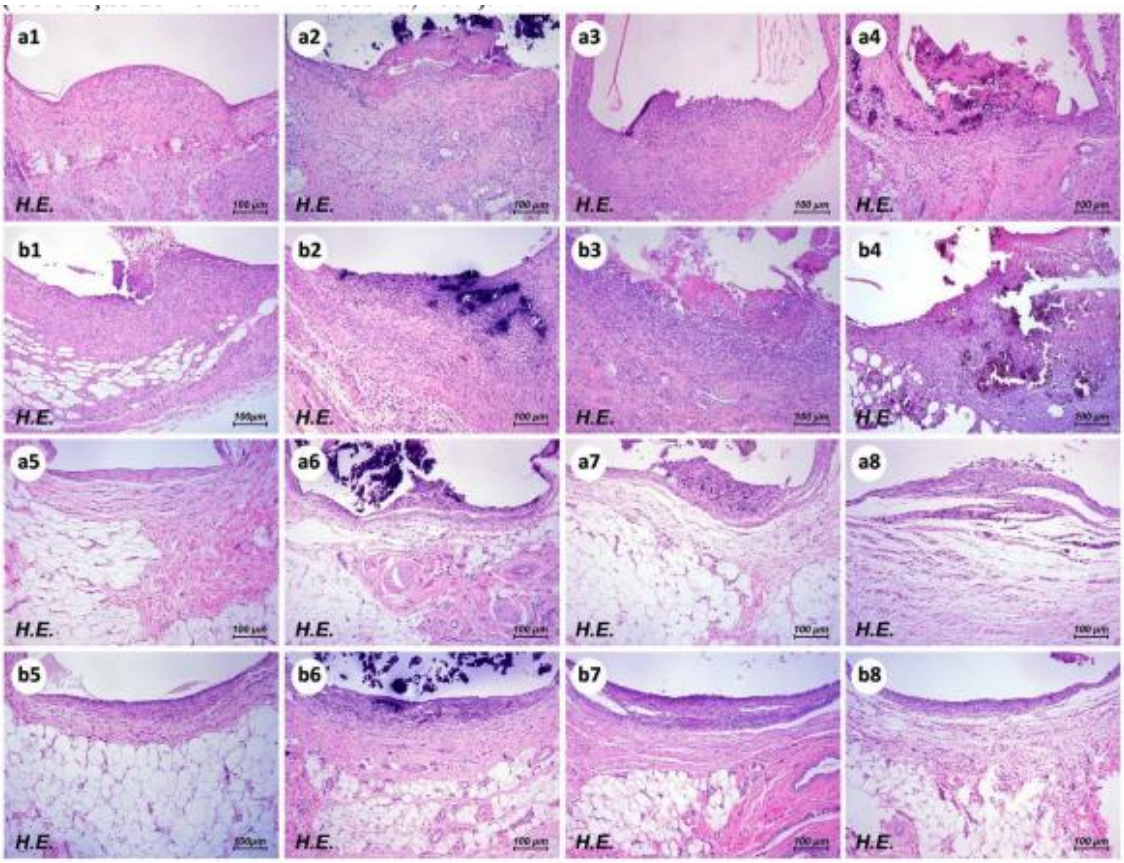


Figura 1. Figura 1. Imagens representativas das reações do tecido subcutâneo para rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento e grupo controle aos 7 dias (a1-a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (Coloração de Hematoxilina-eosina, 100x).

Grupos Controle

Aos 7 dias, o grupo Controle em rC apresentou intensidade da reação inflamatória mais branda e o tecido foi caracterizado pela presença de células crônicas, fibroblastos e sangue vasos, bem como a ausência de células gigantes e cápsulas fibrosas. Aos 30 dias foi possível observar tecido mais organizado com predominância de fibras conjuntivas, fibroblastos e ausência de áreas necróticas e células gigantes. Em rE aos 7 dias, o grupo Controle apresentou reação inflamatória moderada. O tecido foi infiltrado com células crônicas e poucos neutrófilos. Aos 30 dias foi possível observar tecido mais organizado com predominância de fibras conjuntivas, fibroblastos e ausência de áreas necróticas e células gigantes.

Grupo Sealapex

Aos 7 dias, tanto em rC quando em rE, observou-se reação inflamatória moderada composta principalmente de linfócitos e macrófagos na cápsula fibrosa espessa. Aos 30 dias, tanto em rC quando em rE, a intensidade da inflamação foi reduzida e considerada discreta.

Grupo Endofill

Aos 7 dias, tanto em rC quando em rE, observou-se reação inflamatória intensa, com um infiltrado linfoplasmático abundante e grande quantidade de macrófagos. Em algumas amostras, eosinófilos, neutrófilos, células gigantes e formação de abscesso puderam ser observados. A condensação fibrosa era irrelevante ou inexistente após 7 dias e se tornou mais evidente, embora não muito espessa ou desorganizada, após 30 dias.

Grupo AH Plus

Aos 7 dias, em rC quando em rE, observou-se reação inflamatória moderada. O tecido foi infiltrado com neutrófilos e macrófagos. Aos 30 dias, foi possível observar tecido mais organizado com predominância de fibras conectivas, fibroblastos e ausência de áreas necróticas e células gigantes. Uma cápsula fibrosa estava presente, embora não completamente formada.

Comparação entre os grupos

Na comparação entre os grupos em rC aos 7 dias, foi observado que o grupo Endofill apresentou infiltrado inflamatório mais intenso em comparação ao grupo Controle ($p = 0,031$). Aos 30 dias não houve diferença entre os grupos ($p = 0,662$). Em rE, não houve diferença entre os grupos aos 7 ($p = 0,692$) nem aos 30 dias ($p = 0,124$). Comparando a resposta de cada grupo em função da presença ou não do estresse, observou-se que aos 7 dias o grupo Controle em rE apresentou infiltrado inflamatório mais intenso que o grupo Controle em rC ($p = 0,038$). No período de 30 dias não houve diferença em nenhuma das comparações.

Os escores atribuídos para cada um dos parâmetros analisados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Escores medianos e interquartis atribuídos para a resposta inflamatória dos grupos Controle e de cimentos endodônticos em rC e rE.

Período e critérios de análise		Grupos (escores medianos e interquartis)							
		Controle	Controle + estresse	Sealapex	Sealapex + estresse	Endofill	Endofill + estresse	AH Plus	AH Plus + estresse
7 dias	H.E. *	2(2-3)^{Aa}	4(2-4)^{Ab}	3(2-4)^{ABa}	3(2-4)^{Aa}	4(3-4)^{Ba}	4(3-4)^{Aa}	3(2-4)^{ABa}	3(3-4)^{Aa}
30 dias	H.E. *	1(1-2)^{Aa}	2(1-2)^{Aa}	2(1-3)^{Aa}	2(1-4)^{Aa}	2(1-3)^{Aa}	3(2-4)^{Aa}	2(1-3)^{Aa}	2(1-3)^{Aa}

*Letras maiúsculas iguais representam ausência de diferença estatística na análise entre os grupos em rC ou rE em cada tempo. Letras minúsculas iguais representam ausência de diferença estatística na análise entre dois grupos em função do estresse em cada tempo. (Controle versus Controle + estresse; Sealapex versus Sealapex + estresse; Endofill versus Endofill + estresse; AH Plus versus AH Plus + estresse).

4.2. Maturação do Colágeno

As imagens representativas dos diferentes espécimes de todos os grupos são mostradas na Figura 2. Os escores atribuídos para cada um dos parâmetros analisados estão apresentados na tabela 2.

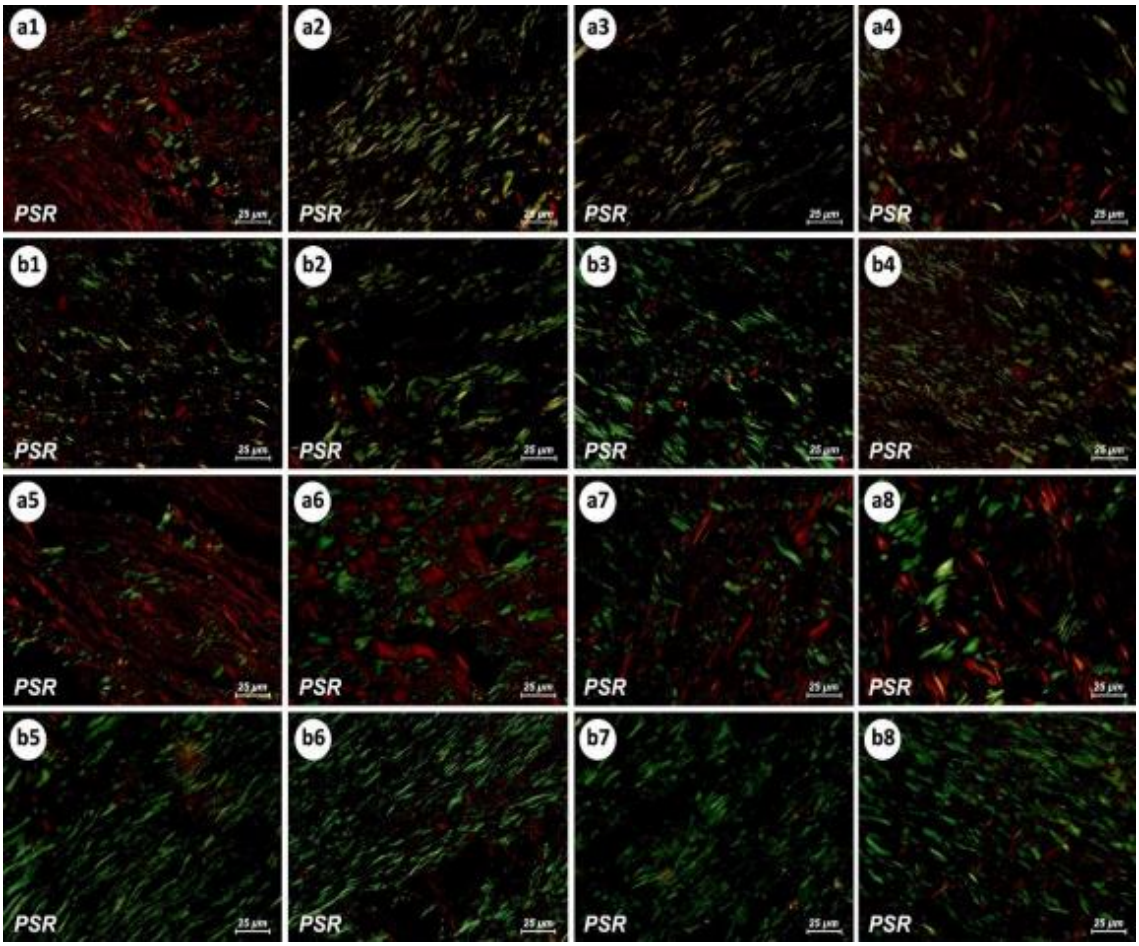


Figura 2 - Imagens representativas da coloração de PSR para identificar a maturação de fibras colágenas em rC (a1-a8) e rE (b1-b8) para cada tipo de cimento e grupo controle aos 7 dias (a1- a4; b1-4) e 30 dias (a5-a8 a b5-b8). (a1, b1, a5, b5 - Controle; a2, b2, a6, b6 - Sealapex; a3, b3, a7, b7 – Endofill; a4, b4, a8, b8 – AH Plus). (Coloração de PSR, 400x)

Tabela 2 - Média das fibras maduras e imaturas de cimentos endodônticos em rC e rE

Tempos	Grupos	Maturação Colágena (%)	
		Fibras imaturas	Fibras maduras
7 dias	Controle	41.97^{Aa}	58.03^{Aa}
	Controle + estresse	59.83^{Aa}	40.17^{Aa}
	Sealapex	68.72^{Ba}	31.28^{Ba}
	Sealapex + estresse	66.56^{Aa}	33.44^{Aa}
	Endofill	74.58^{Ba}	25.42^{Ba}
	Endofill + estresse	65.94^{Aa}	34.06^{Aa}
	AH Plus	44.10^{Aa}	55.90^{Aa}
	AH Plus + estresse	58.27^{Ab}	41.73^{Ab}
30 dias	Controle	35.60^{Aa}	64.40^{Aa}
	Controle + estresse	73.12^{Ab}	26.88^{Ab}
	Sealapex	31.78^{Aa}	68.22^{Aa}
	Sealapex + estresse	81.92^{Ab}	18.08^{Ab}
	Endofill	42.84^{Aa}	57.16^{Aa}
	Endofill + estresse	85.47^{Ab}	14.53^{Ab}
	AH Plus	43.29^{Aa}	56.71^{Aa}
	AH Plus + estresse	86.36^{Ab}	13.64^{Ab}

*Letras maiúsculas iguais representam ausência de diferença estatística na análise entre os grupos em rC ou rE em cada tempo. Letras minúsculas iguais representam ausência de diferença estatística na análise entre dois grupos em função do estresse em cada tempo (Controle versus Controle + estresse; Sealapex versus Sealapex + estresse; Endofill versus Endofill + estresse; AH Plus versus AH Plus + estresse).

Em rC, aos 7 dias, os grupos Sealapex e Endofill apresentaram maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras quando comparados aos grupos Controle e AH Plus ($p < 0,001$). No período de 30 dias, em rC não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos para nenhum tipo de fibra ($p =$

0,222). Em rE, aos 7 dias (p = 0,487) e aos 30 dias (p = 0.198), não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, tanto para fibras imaturas quanto para fibras maduras.

Comparando cada grupo em função do estresse, observamos que o grupo Controle em rE não apresentou diferença para o grupo Controle em rC aos 7 dias (p = 0,152), para nenhum tipo de fibra. Já aos 30 dias, o grupo Controle em rE apresentou maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras comparado ao grupo Controle em rC (p = 44 0,027). O grupo Sealapex em rE não apresentou diferença para o grupo Sealapex em rC aos 7 dias (p = 0,656), para nenhum tipo de fibra. Já aos 30 dias, o grupo Sealapex em rE apresentou maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras comparado ao grupo Sealapex em rC (p < 0,001). O grupo Endofill em rE não apresentou diferença para o grupo Endofill sem estresse aos 7 dias (p = 0,420), para nenhum tipo de fibra. Já aos 30 dias, o grupo Endofill em rE apresentou maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras comparado ao grupo Endofill em rC (p < 0,001). O grupo AH Plus em rE, tanto aos 7 dias (p < 0,027), quando aos 30 dias (p < 0,001) apresentou maior percentual de fibras imaturas e menor percentual de fibras maduras comparado ao grupo AH Plus em rC

5. DISCUSSÃO

Esse estudo buscou investigar a resposta tecidual de cimentos endodônticos já conhecidos na literatura e estudados pelo nosso grupo de pesquisa e sua relação com o organismo estressado cronicamente. O modelo animal para testes de biocompatibilidade é usado para avaliar a resposta de materiais odontológicos, incluindo materiais obturadores do canal radicular. Este modelo é regulado pela norma ISO 10993-6 (International Organization for Standardization, 2016) e fornece provas rápidas e válidas para as respostas biológicas de um determinado material.

Para a indução do estresse crônico foi utilizado aparelho próprio feito de acrílico com compartimentos e regulagens para manter o animal devidamente imobilizado. Esse modelo tem sido muito utilizado em estudos de estresse agudo e crônico, principalmente por sua facilidade de acesso e por tornar possível a exposição de um número relativamente grande de ratos ao estresse (MATALLAH; GUEZI; BAIRI, 2022).

Nosso grupo de pesquisa investiga intensamente a resposta tecidual frente aos cimentos endodônticos (BENETTI et al., 2019; BUENO et al., 2016; CINTRA et al., 2017a). Portanto, para esse estudo escolhemos utilizar três tipos de cimentos, que diferem em sua composição, para que pudéssemos observar a reação de cada um em organismo alterado sistemicamente.

Histologicamente, na comparação entre os grupos em animais não estressados aos 7 dias, foi observado que o grupo Endofill apresentou infiltrado inflamatório mais intenso em comparação ao grupo controle. Estes resultados podem ser explicados pela presença do eugenol, que é responsável por sua forte ação antimicrobiana, mas é um componente muito irritante para os tecidos (CINTRA et al., 2017b; ZMENER et al., 2012). Os cimentos Sealapex e AH Plus provocaram uma resposta inflamatória diferente do grupo controle, porém menor que a do grupo Endofill, sem diferença estatisticamente significante. Isso pode ser explicado pela ação do hidróxido de cálcio que tem efeitos importantes sobre os tecidos, promovendo pH alcalino, tendo efeito antibacteriano e acelerando o processo de reparação de tecidos (OLIVEIRA et al., 2010). Nos estudos de Cintra et al. (2017a) vimos que, aos 7 dias, o AH Plus promoveu uma reação inflamatória moderada que foi reduzida ao longo do tempo sendo após 1 semana, considerado biocompatível

Quando comparamos a resposta dos grupos em função da presença ou não do estresse, ainda em 7 dias, o grupo controle sem estresse apresentou menor infiltrado inflamatório do que o grupo controle com estresse. Muitos estudos mostram que o estresse por restrição foi capaz de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que exacerba a resposta inflamatória do tecido (KIM et al., 2016; LIU et al., 2018; MOGRABI et al., 2020; WANG et al., 2020). A resposta inflamatória aos cimentos aos 7 dias se mostra mais intensa, e neste estudo, não foi possível observar diferença entre a resposta inflamatória pela coloração de HE dos grupos com cimento em um organismo estressado ou não.

Podemos observar que o estresse influenciou na resposta reparativa aos cimentos induzindo alterações na maturação de fibras colágenas.

Comparando cada grupo em função do estresse, aos 7 dias, os grupos Controle, Sealapex e Endofill sem estresse não apresentaram diferença para os mesmos estressados, provavelmente por estar no processo inicial de reparo. As fibras

imaturas são observadas em áreas que estão em processo de renovação de fibras de colágeno (CINTRA et al., 2017c; DIEGELMANN; EVANS, 2004). Como é conhecido, as fases iniciais da cicatrização de feridas são marcadas por uma matriz provisória composta de plaquetas, fibrinas e fibronectina que passam por diferenciação de estruturas, organização e composição (ROGNONI et al., 2018).

Já aos 30 dias, o processo de reparo foi atrasado em todos esses grupos estressados. As fibras maduras indicam áreas lesadas que estão em processo de reparo por períodos mais longos (CINTRA et al., 2017c; DIEGELMANN; EVANS, 2004). O grupo AH Plus teve o processo de reparo atrasado tanto em 7 como em 30 dias pelo estresse. O estudo de Kitagawa et al. (2022), mostrou que o conteúdo de colágeno na pele diminuiu gradualmente após repetidos tratamentos de estresse. Estes resultados indicam que o estresse de contenção repetida pode afetar a saúde da pele através de mudanças tanto na composição de ácidos graxos quanto na concentração de aminoácidos em camundongos.

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir que o estresse crônico produzido por restrição física foi capaz de influenciar a resposta tecidual de cimentos endodônticos aumentando o infiltrado inflamatório e retardando o processo reparativo.

REFERÊNCIAS

Benetti F, Bueno CRE, Reis-Prado AHD, Souza MT, Goto J, Camargo JMP, Duarte MAH, Dezan-Júnior E, Zanotto ED, Cintra LTA. Biocompatibility, Biomineralization, and Maturation of Collagen by RTR®, Bioglass and DM Bone® Materials. Braz Dent J. 2020 Sep-Oct;31(5):477-484.

Benetti F, Queiroz IOA, Oliveira PHC, Conti LC, Azuma MM, Oliveira SHP, Cintra LTA. Cytotoxicity and biocompatibility of a new bioceramic endodontic sealer containg calcium hydroxide. Brazilian Oral Research. 2019; 33, e42

Bueno CR, Valentim D, Marques VAS, Gomes-Filho JE, Cintra LT, Jacinto RC, Dezan-Junior E. Biocompatibility and biomineralizantion assessment of bioceramic, epoxy, and calcium hydroxide-based sealers. Brazilian Oral Research. 2016; 30, 1-9.

Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. Neurosci Biobehav Rev. 2009;33(7):1089-98

Cintra LTA, Benetti F, Azevedo Queiroz ÍO, Ferreira LL, Massunari L, Bueno CRE, Oliveira SHP, Gomes-Filho JE. Evaluation of the cytotoxicity and biocompatibility of new resin epoxy-based endodontic sealer containing calcium hydroxide. J Endod. 2017;43(12):2088-92.

Cintra, L.T.A., Benetti, F., de Azevedo Queiroz, Í.O., de AraújoLopes, J.M., Penha de Oliveira, S.H., Sivieri Araújo, G. et al. Cytotoxicity, biocompatibility, and biomineralization of the new high-plasticity MTA material. Journal of Endodontics. (2017a); 43, 774–778.

Cintra, L.T.A., Benetti, F., de Azevedo Queiroz, Í.O., Ferreira, L.L., Massunari, L., Bueno, C.R.E. et al. Evaluation of the cytotoxicity and biocompatibility of new resin epoxy-based endodontic sealer containing calcium hydroxide. Journal of Endodontics. (2017b); 43, 2088–2092.

Cintra, L.T.A., Ferreira, L.L., Benetti, F., Gastélum, A.A., GomesFilho, J.E., Ervolino, E. et al. The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model. International Endodontic Journal (2017c); 50, 790–798.

Diegelmann, R.F. & Evans, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library. 2004; 9, 283–289.

Dragoş D, Tănăsescu MD. The effect of stress on the defense systems. J Med Life. 2010;3(1):10-8.

Echeverry MB, Guimarães FS, Del Bel EA. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. Neuroscience. 2004;125(4):981-93.

Federation Dentaire International. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. int Dent J 1980 Jun;30(2):140-88.

Godoy LD, Rossignoli MT, Delfino-Pereira P, Garcia-Cairasco N, Umeoka EHL. A comprehensive overview on stress neurobiology: basic concepts and clinical implications. Front Behav Neurosci. 2018;12:127.

Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PF, Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. J Endod. 2009;35:256-60.

International Organization for Standardization. ISO 10993-6. Biological evaluation of medical devices. Part 6: tests for local effects after implantation. Porto: International Standard Norm; 2016.

International Organization for Standardization. ISO 10993-7. Biological evaluation of medical devices. Part 7: ethylene oxide sterilization residuals. Porto: International Standard Norm; 2008.

Keller-Wood M. Hypothalamic-pituitary--adrenal axis-feedback control. Compr Physiol. 2015;5(3):1161-82.

Kim YK, Na KS, Myint AM, Leonard BE. The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2016; 64:277-84.

Kitagawa Y, Hayakawa K, Oikawa D, Ikeda K, Ikeda M, Harada D, Furuse M. Repeated restraint stress modifies fatty acid and amino acid metabolism in the mouse skin. J Vet Med Sci. 2022;84(4):511-9.

Liu S, Xu S, Wang Z, Guo Y, Pan W, Shen Z. Anti-Depressant-Like Effect of Sinomenine on Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression in a Mouse Model. Med Sci Monit. 2018; 24:7646-7653.

Matallah A, Guezi R, Bairi A. Repeated restraint stress induced neurobehavioral and sexual hormone disorders in male rats. AIMS Neurosci. 2022; 9(2):264-276.

Mograbi KM, Suchecki D, da Silva SG, Covolan L, Hamani C. Chronic unpredictable restraint stress increases hippocampal pro-inflammatory cytokines and decreases motivated behavior in rats. Stress. 2020; 23(4):427-436.

Oliveira RL, Oliveira Filho RS, Gomes HC, Franco MF, Enokihara MM, Duarte MA. Influence of calcium hydroxide addition to AH Plus sealer on its biocompatibility. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010;109(1):e50-4..

Orstavik D. Endodontics materials. Adv Dent Res. 1988;2(1):12-24.

Paré WP, Glavin GB. Restraint stress in biomedical research: a review. Neurosci Biobehav Rev. 1986;10(3):339-70.

Siegel S. Nonparametric statistics for the behavioral sciences. New York: McGraw Hill; 1956.

Wang M, Dong W, Wang R, Xu X, Wu Y, Sun G, Sun X. *Gastrodiae Rhizoma* Water Extract Ameliorates Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Hyperactivity and Inflammation Induced by Chronic Unpredictable Mild Stress in Rats. Biomed Res Int. 2020; 2020:8374614.

Zmener, O., Martinez Lalis, R., Pameijer, C.H., Chaves, C., Kokubu, G. & Grana, D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. Journal of Endodontics. 2012; 38, 1233–1238.