

**SIMONE WATANABE**

**Avaliação da Biocompatibilidade e Citotoxicidade dos  
Cimentos: Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus  
MTA<sup>®</sup>.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em Odontopediatria.

**Orientador Prof. Adj. João Eduardo Gomes Filho**

Araçatuba

2008

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

W324a      Watanabe, Simone  
Avaliação da biocompatibilidade e citotoxicidade dos cimentos :  
Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> / Simone  
Watanabe. - Araçatuba : [s.n.], 2008  
70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2008  
Orientador: Prof. Adjunto João Eduardo Gomes Filho

1. Cimentos dentários 2. Materiais biocompatíveis 3. Endodontia

Black D27  
CDD 617.645

## DADOS CURRICULARES

SIMONE WATANABE

Nascimento	07 de outubro de 1981 Birigui/SP
Filiação	Akira Watanabe Keiko Watanabe
2001-2006	Curso de graduação em Odontologia – Faculdade de odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
2007-2008	Curso de Pós-graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho

Aos meus pais *Akira e Keiko*, pelo amor, dedicação e incentivo para que meu sonho se realizasse. Obrigada pelo apoio incondicional sempre!

Ao meu irmão *Márcio* e minha cunhada *Ana*, pela convivência, amizade e união que existe nas nossas vidas.

Ao meu amor *Rafael*, pelo carinho, confiança, companheirismo e compreensão. Obrigada por sonhar os meus sonhos e lutar comigo para realizá-los. Amo você!

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

### *A Deus*

Por iluminar e abençoar sempre o meu caminho. Pela fé, esperança e forças concedidas em todos os momentos de minha vida.

### *Ao Professor Dr João Eduardo Gomes Filho*

Pela agradável e valiosa convivência. Serei eternamente grata pelo carinho, confiança, orientação e dedicação dispensados a mim. Obrigada pela ajuda incansável na realização deste trabalho e pela constante presença.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho” – UNESP, nas pessoas dos professores Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, digníssimo diretor e Dra. Ana Maria Pires Soubhia, digníssima vice – diretora.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Profa. Dra. Rosângela dos Santos Nery e Profa. Dra. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar, pelo aprendizado, companheirismo e contribuição na minha formação profissional.

A todos os docentes do programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP que lecionaram durante meu curso de Mestrado. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados.

Aos professores da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Dr. Eloi Dezan Júnior, Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho, José Arlindo Otoboni Filho, Prof. Dr. Mauro Juvenal Nery, Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, Prof. Dr. Roberto Holland, Prof. Dr. Valdir de Souza, pela permissão da utilização do laboratório da disciplina de Endodontia. Obrigada pelo apoio, aprendizado e amizade.

Aos professores da disciplina de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Sandra Helena Penha de Oliveira e Cristina Antoniali Silva, pela permissão da utilização do laboratório da disciplina de Farmacologia para realização dos experimentos.

Aos meus amigos de turma, Tatyana, Leciana, Lílian, Daniela e Marcelo. Obrigada pela convivência, amizade e apoio.

À amiga Isabelle, pela amizade, paciência, descontração e conselhos dados. Obrigada pelo carinho e apoio!

À amiga Alessandra Cury, pelo carinho, apoio e atenção. Obrigada!

À Alessandra Gomes, pela amizade, ensinamentos e participação neste trabalho.

À Mariana, pela amizade e dedicação. Obrigada pela troca de experiências e apoio!

Ao Prof. Dr. Roberto Holland e Prof. Dr. Valdir de Souza, pelo carinho e apoio. Obrigada pelos ensinamentos e incentivo!

À Sueli, pela amizade e carinho. Obrigada pelo apoio e grande incentivo na reta final deste trabalho!

Aos amigos Thaís, Tiago, Gustavo e Guilherme, que sempre torceram e acreditaram em mim. Obrigada pela amizade e apoio!

Aos amigos da “Prótese”, Aldiéris, Valentim, Úrsula, Aline, Douglas, Paula e Daniela, pela amizade, companheirismo, carinho e pelas horas de alegria. Obrigada pela torcida! Vocês estarão sempre no meu coração!

À Marcela, Priscile, Karol e Érica, pela amizade, confiança e carinho. Obrigada pela torcida!

Aos demais colegas de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Obrigada pelo agradável convívio!

Aos funcionários da disciplina de Endodontia, Hermelinda de Jesus Pereira Brefore, Nelci Vieira e Neuza Angélica dos Santos, pela amizade, carinho e total apoio para realização deste trabalho. Muito Obrigada!

À Magda Requena Caciatore, secretária do departamento de Odontologia Restauradora, pelo carinho, paciência e atenção.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria, Maria Bertolina Mesquita de Oliveira, Maria dos Santos Ferreira Fernandes e Mário Luís da Silva, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti, Ana Paula Rímoli de Oliveira, Cláudio Hideo Matsumoto, Cláudio Maciel Júnior, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da Silva Freitas, Luis Cláudio Sedlacek, Luzia Anderlini e Maria Cláudia de Castro Benez, pela paciência e disposição.

Ao Diogo, Marina e Valéria, funcionários da Seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pela atenção e paciência.

Aos funcionários do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Alan Roger Cenerine Carvalho, Camilo Roberto Venâncio e João Batista Alves Correa, pelo apoio e auxílio no tratamento dos animais.

À empresa Ângelus® e à empresa EGEO®, por terem cedido os materiais para serem utilizados nos experimentos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

***MUITO OBRIGADA!***

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	14
Resumo	16
Abstract	18
Introdução	21
Proposição	24
Artigo 1	26
Artigo 2	43
Discussão	57
Conclusão	65
Referências	67
Anexo 1	77
Anexo 2	95
Anexo 3	105

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\text{Al}_2\text{O}_3$  – Trióxido de alumínio

$\text{BaSO}_4$  – Sulfato de bário

$\text{Bi}_2\text{O}_3$  – Trióxido de bismuto

$\text{CaCO}_3$  – Carbonato de cálcio

$\text{CaO}$  – Óxido de cálcio

$\text{CO}_2$  – Gás carbônico

CPM Sealer – Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium

GMA – Glicol metacrilato

IL – Interleucina

IL-1 – Interleucina-1

IL-1 $\beta$  – Interleucina-1 $\beta$

IL-6 – Interleucina-6

$\text{K}_2\text{O}$  – Óxido de potássio

mL – Mililitros

mm – Milímetros

$\mu\text{L}$  – Microlitros

MTA – Agregado de trióxido mineral

MTT – Metiltetrazolium (Mosmann)

$\text{SiO}_2$  – Óxido de Silício

$\text{SO}_3$  – Sulfito

TNF – fator de necrose tumoral

TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral-alfa

Watanabe, S. Avaliação da biocompatibilidade e citotoxicidade dos cimentos: Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup>. Araçatuba, 2008. 105p. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

## **RESUMO**

A necessidade de melhorar a qualidade dos materiais utilizados no tratamento endodôntico tem estimulado o estudo de vários materiais, buscando melhores condições de trabalho, biocompatibilidade e propriedade de estimular a ocorrência do selamento biológico. Este trabalho teve a finalidade de avaliar quantitativamente e qualitativamente a resposta tecidual frente ao implante de tubos de polietileno preenchidos pelos cimentos Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> em tecido subcutâneo de ratos e a citotoxicidade e a produção de citocinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) por fibroblastos de camundongos estimulados por estes cimentos. Para os testes de biocompatibilidade foram utilizados 30 ratos, os quais receberam individualmente três implantes de tubos de polietileno contendo os cimentos a serem testados e mais um tubo vazio como controle. Após 7, 15, 30, 60 e 90 dias do período de implantação, os animais foram sacrificados e os tubos de polietileno juntamente com o tecido que o circunda foram removidos, fixados e processados para análise em microscopia de luz. Após inclusão em glicol metacrilato, foram realizados cortes seriados de 3 $\mu$ m, corados com hematoxilina-eosina e cortes de 10 $\mu$ m, corados com Von Kossa e sem coloração para serem analisados sob luz polarizada. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis. Os materiais Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> causaram reações moderada no tempo experimental de 7

dias que diminuiu com o tempo. A resposta foi similar entre os grupos Controle, Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> no tempo experimental de 30 dias. Aos 60 dias todos os grupos foram semelhantes ao Controle. Mineralizações e granulações birrefringentes à luz polarizada foram observadas com todos os materiais. Foi possível concluir que o Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> foi biocompatível e estimulou a mineralização. Para o teste de citotoxicidade fibroblastos de camundongos (L929) foram incubados em placas de 24 poços e estimulados com os cimentos testados. Cultura de células sem os materiais foi usada como controle. Após 24 horas de incubação a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT. Os resultados foram lidos no espectrofotômetro (leitor de ELISA) e o dados foram analisados pelo teste ANOVA com correção de BonFerroni. Os cimentos Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> não inibiram a viabilidade celular. Para a avaliação de IL-1 $\beta$  e IL-6, os materiais foram inseridos em poços de fundo chato e condensados até atingirem aproximadamente 1 mm de espessura e o mesmo diâmetro dos poços. O material foi deixado tomar presa por 2 semanas em meio de cultura DMEM. Fibroblastos da linhagem L929 foram semeados nos poços contendo os materiais ao fundo. Após 24 horas de incubação, os meios de cultura foram coletados e analisados para IL-1 $\beta$  e IL-6 por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Poços sem material, mas com cultura de células serviram como controle. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA com correção de BonFerroni. Todos os materiais liberaram IL-6, mas a quantidade não foi estatisticamente significativa em relação ao Controle. Somente o Ângelus MTA<sup>®</sup> liberou IL-1 $\beta$  em quantidade estatisticamente significativa maior que o controle.

**Palavras-chave:** Cimentos dentários; Materiais biocompatíveis; Endodontia; Citocinas;

Elisa.

Watanabe, S. Evaluation of the biocompatibility and cytotoxicity of sealers: Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> and Ângelus MTA<sup>®</sup>. Aracatuba, 2008. 105p. Dissertation (Master in Pediatric Dentistry) – Dental School of Araçatuba, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”.

## **ABSTRACT**

The need of improving the quality of materials used in endodontic treatment has stimulated the study of various materials seeking better working conditions, biocompatibility and property to stimulate the occurrence of biological sealing. The aim of this study was to evaluate quantitatively and qualitatively the tissue response to the implantation of polyethylene tubes filled with Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> and Ângelus MTA<sup>®</sup> in subcutaneous tissue of rats and cytotoxicity and production of cytokines (IL-1 $\beta$  and IL-6) by mouse fibroblasts stimulated by these sealers. Thirty rats were used for the biocompatibility tests. Each animal received three implants of polyethylene tubes containing the cement to be tested and one empty polyethylene tube was used as control. After 7, 15, 30, 60 and 90 days from the implantation time, the animals were killed and the tubes with surrounding tissues were removed, fixed and processed for analysis using a light microscope. After inclusion in glycol methacrylate, they were serially sectioned into 3  $\mu$ m or 10  $\mu$ m cuts and stained with hematoxylin-eosin, Von Kossa or remained without staining to be observed under polarized light. The results were statistically analyzed by Kruskal Wallis test. The materials Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> and Ângelus MTA<sup>®</sup> caused moderate reactions at 7 days which decreased with time. The response was similar among the control group, Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> and Ângelus MTA<sup>®</sup> at the 30th day. At 60th day all groups were similar

to control group. Mineralization and granulations birefringent to the polarized light were observed with all materials. It was possible to conclude that Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> was biocompatible and stimulated mineralization. To test the cytotoxicity of mouse fibroblast (L929) were incubated in plate of 24 wells and stimulated with the sealers tested. Cell culture without the material was used as control. After 24 hours of incubation cell viability was assessed by the MTT colorimetric method. The results were read in spectrophotometer (ELISA reader) and the data were analyzed by ANOVA with correction of BonFerroni. The sealer Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> and Ângelus MTA<sup>®</sup> didn't inhibit cell viability. For the evaluation of IL-1 $\beta$  and IL-6 the materials were placed in the wells of flat-bottom and condensed to reach approximately 1 mm in thickness and the same diameter of the wells. The materials was left to take setting for 2 weeks in the culture medium DMEM. Fibroblasts line L929 were seed in the wells containing the material on the botton. After 24 hours of incubation, the culture media were collected and analyzed for IL-1 $\beta$  and IL-6 by ELISA. Wells without material but with cells culture served as controls. The data were analyzed by ANOVA with correction of BonFerroni. All materials released IL-6, but the amount was not statistically significant. Only the Ângelus MTA<sup>®</sup> released IL-1 $\beta$  in quantity statistically significant higher than the control.

**Key words:** Sealer; Biocompatible materials; Endodontics; Cytokines; Elisa.

## INTRODUÇÃO

A obturação de canais radiculares compreende o preenchimento completo do espaço criado com a remoção da polpa e preparo biomecânico, com materiais de propriedades física e biológica apropriadas, proporcionando condições para que ocorra a reparação.

É reconhecido que os cimentos endodônticos podem entrar em contato direto com os tecidos periapicais. Em tais condições eles podem influenciar o processo de reparação periapical, o que justifica a importância do estudo da reação tecidual em modelos experimentais animais antes da sua utilização clínica.

Os cimentos endodônticos podem ter variadas bases: óxido de zinco e eugenol, resina epóxica, ionômero de vidro e hidróxido de cálcio. A presença e liberação de substâncias do cimento podem gerar diferentes reações quando em contato com os tecidos vivos. A reação varia em função da substância, da quantidade liberada e da taxa de reabsorção (1).

Os cimentos à base de hidróxido de cálcio para obturação de canal foram objeto de uma série de trabalhos experimentais que analisaram tanto suas propriedades físico-químicas quanto biológicas. O Sealapex® tem mostrado adequada biocompatibilidade em relação à polpa dental, excelente ação bactericida por apresentar um pH elevado, boa capacidade de selamento, induz a reparação por formação de tecido duro, apresenta baixa infiltração marginal e controle da reabsorção radicular inflamatória (1,2,3,4,5,6,7).

Outro material que tem merecido destaque na literatura científica é o cimento reparador MTA (Agregado de Trióxido Mineral). Este material foi desenvolvido para ser utilizado como material selador de comunicações entre dente e o periodonto (8,9).

Inúmeros trabalhos têm sido realizados comprovando sua efetividade confirmando a sua aceitação internacional (8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19).

Por ser um material biocompatível, indutor de dentinogênese, cementogênese e osteogênese, hidrófilo, radiopaco, por possuir ação antimicrobiana e promover selamento marginal adequado prevenindo infiltrações, o MTA tem sido empregado com sucesso em pulpotomias, capeamentos pulparem diretos, apicificações, apicigênese e perfurações radiculares (9,10,13,14,15,17,18,20,21,22,23,24). Encontra-se atualmente disponível no mercado odontológico sob os nomes comerciais de MTA ProRoot<sup>®</sup> (Dentsply) e Ângelus MTA<sup>®</sup> (Ângelus), ambos com características físico-químicas e biológicas semelhantes (25).

Até recentemente, o MTA não apresentava formulação adequada para ser utilizado como cimento endodôntico. Contudo, foi lançada no mercado uma nova formulação de agregado de trióxido mineral denominado de Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> (CPM Sealer) (EGEO S.R.L., Buenos Aires, Argentina), indicada para ser utilizado como cimento endodôntico em obturação do sistema de canais radiculares. Por ter uma composição química semelhante a do cimento reparador MTA, espera-se resposta biológica semelhante aquela observada com o MTA ProRoot<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup>.

Como não se observam trabalhos na literatura que comprovem a resposta tecidual, frente a esta nova formulação de MTA, o objetivo deste estudo foi avaliar quantitativamente e qualitativamente a resposta tecidual frente ao implante de tubos de polietileno preenchidos pelo cimento Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> em tecido subcutâneo de ratos, bem como avaliar a citotoxicidade e a produção de citocinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) por fibroblastos de camundongos estimulados por estes cimentos.

## **PROPOSIÇÃO**

1 – Avaliar quantitativamente e qualitativamente a resposta tecidual frente ao implante de tubos de polietileno preenchidos pelos cimentos Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> em tecido subcutâneo de ratos.

2 – Avaliar a citotoxicidade e a produção de citocinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) por fibroblastos de camundongos estimulados pelos cimentos Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup>.

# *ARTIGO 1*

# **CIMENTO ENDODÔNTICO À BASE DE AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL ESTIMULOU A MINERALIZAÇÃO**

## **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual do tecido subcutâneo de rato ao implante de tubos de polietileno preenchidos com Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> (Portland Cement Modified Sealer) comparado com Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup>. Estes materiais foram colocados em tubos de polietileno e implantados no tecido conjuntivo dorsal de ratos Wistar por 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Os espécimes foram preparados para serem corados com HE, Von Kossa e sem coloração para luz polarizada. Foi realizada análise qualitativa e quantitativa das reações. Os materiais Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> causaram reação moderada no tempo experimental de 7 dias que diminuiu com o tempo. A resposta foi similar entre os grupos Controle, Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> no tempo experimental de 30 dias. Aos 60 dias todos os grupos foram semelhantes ao Controle. Mineralizações e granulações birrefringentes à luz polarizada foram observadas com todos os materiais. Foi possível concluir que o Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> foi biocompatível e estimulou a mineralização.

Palavras-chave: MTA; Biocompatibilidade; Tecido conjuntivo.

## **INTRODUÇÃO**

O Agregado de Trióxido Mineral (MTA) foi introduzido para ser utilizado em perfurações radiculares patológicas ou iatrogênicas assim como em cavidades no ápice radicular (1,2). Estudos têm demonstrado que o MTA promove reações teciduais favoráveis, caracterizado pela ausência de respostas inflamatórias

severas, presença de cápsula fibrosa e a indução do reparo tecidual pela formação de tecido mineralizado (3,4). A natureza hidrófila das partículas do MTA permite seu uso mesmo na presença de umidade (1). O MTA tem sido utilizado em capeamentos pulpare e pulpotomias em animais e em humanos, demonstrando um sucesso similar ao observado com o hidróxido de cálcio (5,6,7,8,9,10).

Contudo, apesar das características favoráveis, o MTA não apresenta propriedades físicas para ser utilizado como cimento endodôntico (9,11). O resultado da mistura do pó do cimento com a água dificulta a manipulação (9), e o tempo de presa que tem sido estabelecido é de 2 h e 45 min, mas o tempo de trabalho é menor do que 4 min (12). Umidade adicional também é necessária para ativar a estabilidade do cimento (9).

A nova formulação de MTA denominada de Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> (CPM Sealer) (EGEO S.R.L., Buenos Aires, Argentina) foi proposta para ser utilizada como cimento endodôntico. O CPM-Sealer após a mistura é composto por Agregado de Trióxido Mineral ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SO}_3$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ): 50%;  $\text{SiO}_2$ : 7%;  $\text{CaCO}_3$ : 10%;  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ : 10%;  $\text{BaSO}_4$ : 10%; Alginato de Propilenoglicol: 1%; Propilenoglicol: 1%; Citrato de sódio: 1%; Cloreto de Cálcio: 10% de acordo com as recomendações dos fabricantes. As informações na bula sobre o material afirmam que a composição química é semelhante ao MTA, mas com a adição de carbonato de cálcio que reduz o pH de 12.5 para 10.0 depois de manipulado. Dessa forma a necrose de superfície do tecido em contato com o material é restrita porque permite a ação da fosfatase alcalina.

Embora aparentemente o CPM Sealer apresente características positivas para ser utilizado como cimento endodôntico, não existem estudos avaliando a reação tecidual após a sua implantação. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a

resposta tecidual e a capacidade para estimular a mineralização em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos do Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, comparado com Sealapex<sup>®</sup> e MTA Ângelus<sup>®</sup>.

## **MATERIAL E MÉTODO**

Trinta ratos albinos machos (Wistar), entre 4 e 6 meses de idade, pesando entre 250 e 280 g foram usados. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e receberam ração e água ad libitum. O cuidado dos animais foi realizado de acordo com a Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP, que aprovou o projeto antes do início dos experimentos (Anexo 3).

Noventa tubos de polietileno (Abbott Lab of Brazil, Sao Paulo, SP, Brazil) estéreis com 1,0mm de diâmetro interno e 1,6mm de diâmetro externo e 10,0mm de comprimento foram preenchidos com os materiais testados. O Sealapex<sup>®</sup> (Sybron Endo Glendora, Califórnia, USA), Ângelus MTA<sup>®</sup> (Ângelus, Londrina, Brazil) e CPM Sealer (EGEO S.R.L., Buenos Aires, Argentina) foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes e introduzidos nos tubos com uma espiral lentulo (Maillefer Dentsply, Tulsa, OK). Trinta tubos de polietileno permaneceram vazios e foram usados como controle.

Após a anestesia com xilazina (10 mg/kg) e quetamina (25 mg/kg) foi feita a tricotomia da região dorsal e anti-sepsia da área com solução de iodo 5%. Em seguida foi feita uma incisão de 2 cm no sentido da cabeça para o rabo com uma lâmina de bisturi n° 15. A pele foi divulsionada, criando 2 bolsas em cada lado da incisão, uma na porção cranial e outra na porção caudal distante 6 cm um do outro. Os tubos foram implantados nos espaços criados com dissecação roma e a pele foi suturada com fio de seda 4/0.

Após 7, 15, 30, 60 e 90 dias do período de implantação, os animais foram sacrificados por overdose de solução anestésica e os tubos com os tecidos circundantes foram removidos e

fixados em solução formalina 10% e pH 7.0 (13,14). Os tubos foram cortados transversalmente com uma lâmina de bisturi. Isto foi feito no sentido de manter as superfícies em contato direto com as soluções de processamento. Os espécimes foram processados para serem incluídos em glicol metacrilato (GMA), seriadamente seccionados em 3-  $\mu\text{m}$  e corados com hematoxilina e eosina (15). Os cortes em 10-  $\mu\text{m}$  foram corados de acordo com a técnica de Von Kossa, ou permaneceram sem coloração para serem analisados sob luz polarizada. A técnica de Von Kossa foi utilizada para observar estruturas mineralizadas nos tecidos, que estavam coradas de preto. A técnica para luz polarizada permite observar estruturas birrefringentes relacionadas com cristais de carbonato de cálcio originadas da combinação de íons cálcio do material com gás carbônico do tecido (16).

Reações do tecido em contato com o material na abertura do tubo foram avaliadas de acordo com estudos anteriores (14,15,17,18) como 0, nenhuma ou poucas células inflamatórias e nenhuma reação; 1, menos de 25 células e reação leve; 2, entre 25-125 células e reação moderada, e 3, 125 ou mais células e reação severa. Cápsula fibrosa foi considerada fina quando a espessura foi  $<150 \mu\text{m}$  e espessa quando  $> 150 \mu\text{m}$ . Necrose e calcificação foram registradas como presente ou ausente. A média do número de células para cada grupo foi obtido em 10 áreas distintas. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste Kruskal Wallis.

## **RESULTADOS**

### Sealapex<sup>®</sup>

No 7°, 15° e 30° dias, um infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa (Fig. 1A and Fig. 1B). A intensidade da inflamação reduziu no 60° e 90° dias e a cápsula fibrosa próxima ao tubo estava fina e similar ao grupo Controle (Fig. 1C, Fig. 1D). Granulações birrefringentes

para luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas próximas da abertura dos tubos (Fig. 2A, Fig. 2B, Fig. 2C, Fig. 2D).

#### Ângelus MTA<sup>®</sup>

No 7° dia, um infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa (Fig. 1E). A intensidade da inflamação reduziu no 15°, 30°, 60° e 90° dias com uma cápsula fibrosa fina próxima do tubo e quase nenhuma célula inflamatória (Fig. 1F, Fig. 1G, Fig. 1H). Granulações birrefringentes para luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas próximas da abertura dos tubos (Fig. 2E, Fig. 2F, Fig. 2G, Fig. 2H).

#### CPM Sealer

No 7° e 15° dias, um infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa (Fig. 1I). A intensidade da inflamação e a espessura da cápsula fibrosa foram reduzidas no 30° dia, similar ao grupo Controle (Fig. 1J). No 60° e 90° dias, poucas células inflamatórias crônicas consistindo de linfócitos, macrófagos, fibroblastos estavam presentes na fina cápsula fibrosa similar ao grupo do Sealapex<sup>®</sup> e Controle (Fig. 1L, Fig. 1M). Granulações birrefringentes para luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas em íntimo contato com o CPM Sealer (Fig. 2I, Fig. 2J, Fig. 2L, Fig. 2M).

#### Controle (Tubos Vazios)

No 7° e 15° dias, um infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos estava presente na cápsula fibrosa (Fig. 1N). A cápsula fibrosa em volta do tubo estava fina com poucas células inflamatórias crônicas no 30°, 60° e

90° dias (Fig. 1O, Fig. 1P, Fig. 1Q). O grupo Controle não foi positivo para coloração de Von Kossa e não foram observadas estruturas birrefringentes para luz polarizada (Fig. 2N, Fig. 2O, Fig. 2P, Fig. 2Q).

#### Comparação entre os grupos

Os dados foram comparados em cada período experimental e estão presentes na Tabela 1.

#### 7 Dias

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os escores para resposta celular inflamatória dos diferentes grupos (média do escore de 2).

#### 15 Dias

Houve diferença estatisticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre o número de células inflamatórias do Ângelus MTA<sup>®</sup> e dos outros grupos ( $P < 0.05$ ). A média do escore de células inflamatórias para o MTA (média do escore de 1) foi mais baixo do que outros grupos (média do escore de 2) ( $p < 0.05$ ).

#### 30 Dias

Houve diferença estatisticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre o número de células inflamatórias do Sealapex<sup>®</sup> e de outros grupos ( $P < 0.05$ ). A média do escore de células inflamatórias para o Sealapex<sup>®</sup> (média do escore de 2) foi maior do que outros grupos (média do escore de 1) ( $p < 0.05$ ).

#### 60 Dias e 90 Dias

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $P > 0.05$ ) entre os escores dos diferentes grupos (média do escore de 1).

## **DISCUSSÃO:**

Os tubos vazios neste estudo causaram poucas reações nos tecidos conjuntivos subcutâneos, similar aos resultados previamente relatados (14,15,16,17,18,19).

Os resultados observados com CPM Sealer foram similares ao Ângelus MTA<sup>®</sup> e grupo Controle. Uma resposta inflamatória crônica moderada no 7<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dias, que reduziu com o tempo, foi observada na fina cápsula fibrosa de tecido conjuntivo em volta do tubo. Áreas de Von Kossa positivo e estruturas birrefringentes sob luz polarizada também foram observadas demonstrando que este material estimulou a formação de tecido mineralizado no tecido subcutâneo de ratos via formação de carbonato de cálcio pela reação do cálcio do material com o dióxido de carbono do tecido circundante (16).

O MTA contém óxido de cálcio e fosfato de cálcio em sua formulação. O óxido de cálcio pode reagir com a água ou fluidos do tecido formando hidróxido de cálcio, o qual, em contato com a água, dissocia em íon cálcio e íon hidroxila. O íon cálcio reage com o dióxido de carbono dos tecidos formando granulações de carbonato de cálcio apresentado como cristais de calcita birrefringentes para luz polarizada (16), que estimulam a deposição de tecido duro.

O CPM Sealer, de acordo com os fabricantes, tem características física, química e biológica similares, ou melhores, quando comparado ao MTA. O CPM Sealer tem composição similar ao MTA, mas com adição de carbonato de cálcio com a intenção de reduzir o pH depois de manipulado para 10, limitando a necrose de superfície dos tecidos adjacentes e permitindo a fosfatase alcalina. No presente estudo, realmente não foram notadas extensas áreas de necrose em íntimo contato com CPM Sealer ou MTA. Além disso, a atividade da fosfatase alcalina pode ser indiretamente demonstrada pela formação de áreas mineralizadas uma vez que o MTA é capaz de induzir a expressão

prematura e melhorada da atividade da fosfatase alcalina pela população de fibroblastos (20) que está associada com a mineralização. O CPM Sealer também contém cloreto de cálcio que já havia sido demonstrado que sua adição ao MTA reduziu o tempo de presa e melhorou as características de manipulação e selamento (21,22,23,24) sem qualquer alteração na resposta tecidual (25).

A composição do CPM Sealer pode explicar a diferença relativa observada na resposta tecidual quando foi comparado com o Sealapex<sup>®</sup>, um material devidamente desenvolvido para ser utilizado como cimento endodôntico e foi empregado no presente estudo como uma referência. Este cimento exibiu uma reação moderada no 7° e 15° dias. No entanto, no 30° dia, é apresentado um processo inflamatório mais intenso do que o grupo Controle e CPM Sealer. A resposta inflamatória diminuiu e a cápsula fibrosa se tornou mais fina no 60° e 90° dias. Além disso, os resultados do presente estudo, juntamente com aqueles relatados anteriormente, corroboram a promoção de estruturas mineralizadas birrefringentes para luz polarizada ou Von Kossa positivo (26). Estas calcificações podem se originar a partir do óxido de cálcio presente no Sealapex<sup>®</sup> que reage com os fluídos do tecido formando hidróxido de cálcio. As granulações birrefringentes observadas próximas do Sealapex<sup>®</sup> são provavelmente cristais de calcita originados da reação de íons cálcio com o dióxido de carbono dos tecidos (16). Esses cristais, juntamente com a fibronectina podem representar um passo na formação da barreira de tecido duro (26).

Em conclusão, o cimento endodôntico Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> estimulou a mineralização e os resultados observados e o mecanismo de ação são semelhantes aos relatados para o Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup>. Outros estudos são necessários para melhor analisar o comportamento deste material e confirmar os dados observados.

## REFERÊNCIAS:

1. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a Mineral trioxide Aggregate when used as a root end filling material. *J Endod* 1993;19:591-5.
2. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;19:541-4.
3. Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of Mineral Trioxide Aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995;79:56-63.
4. Bernabe PF, Holland R, Morandi R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E, Gomes-Filho JE. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. *Braz Dent J* 2005;16:149-55.
5. Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001;17:163-6.
6. Andelin WE, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. *J Endod* 2003;29:646-50.
7. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:376-9.
8. Chacko V, Kurikose S. Human pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA): a histologic study. *J Clin Pediatr Dent* 2006;30:203-9.
9. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21:349-53.

10. Gomes-Filho JE, de Faria MD, Bernabé PF, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Júnior E, de Moraes Costa MM, Cannon M. Mineral trioxide aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. *J Endod* 2008;34:62-5.
11. Grossman LI. Physical properties of root canal cements. *J Endod* 1976;2:166-75.
12. Matt GD, Thorpe JR, Strother JM, McClanahan SB. Comparative study of white and gray mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one- or two-step apical barrier technique. *J Endod* 2004;30:876-9.
13. American National Standards Institute/Revised American National Standards Institute American Dental Association Document No. 41. For recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. 1979. New York, NY: Am National Standards Institute.
14. Federation Dentaire International Recommended standart practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International Commission on Dental Materials, Equipment, and Theropeutics. (1980) Part 4.11: Subcutaneous implantation test. *Int Dental J* 1980;30:173-4.
15. Gomes Filho JE, Gomes BPFA, Zaia AA, Novaes PD, Souza Filho FJ. Glycol Methacrylate: An alternative method for embedding subcutaneous implants. *J Endod* 2001;27:266-8.
16. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999;25:161-6.
17. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod* 2004;30:95-9.

18. Costa CA, Teixeira HM, do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive resins. *J Endod* 2000;26:512-6.
19. Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. *Int Endod J* 2003;36:281-7.
20. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res* 2004;83:408-13.
21. Wiltbank KB, Schwartz SA, Schindler WG. Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod* 2007;33:1235-8.
22. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of proroot mta to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod* 2007;33:1231-4.
23. Bortoluzzi EA, Juárez Broon N, Antonio Hungaro Duarte M, de Oliveira Demarchi AC, Monteiro Bramante C. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement. *J Endod* 2006;32:1194-7.
24. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod* 2006;32:897-900.
25. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Consolaro A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernadineli N. Mineral Trioxide Aggregate with or without Calcium Chloride in Pulpotomy. *J Endod* 2008;34:172-5.

26. Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E, Murata SS. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod* 2002;28:173-6.

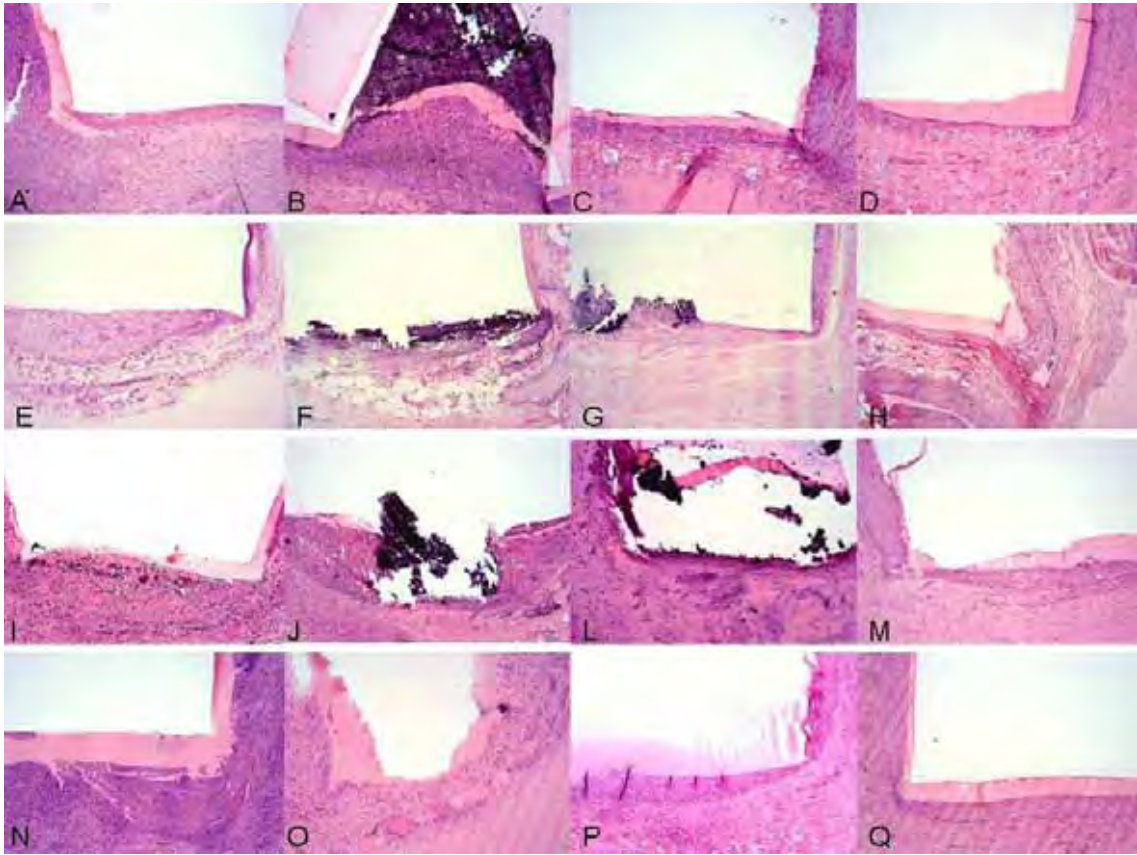
Figura 1. **Sealapex**. (A) formação de cápsula fibrosa espessa e infiltrado celular inflamatório moderado (7 dias, hematoxilina-eosina, 10x). (B) formação de cápsula fibrosa espessa e infiltrado celular inflamatório moderado (30 dias, hematoxilina-eosina, 10x). (C) redução da espessura da cápsula fibrosa e infiltrado celular inflamatório leve (60 dias, hematoxilina-eosina, 10x). (D) cápsula fibrosa fina e infiltrado inflamatório leve (90 dias, hematoxilina-eosina, 10x). **Ângelus MTA**. (E) cápsula fibrosa espessa e infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos (7 dias, hematoxilina-eosina, 10x). (F, G, H) cápsula fibrosa em volta do tubo estava fina com poucas células inflamatórias crônicas (30, 60, 90 dias respectivamente, hematoxilina-eosina, 10x). **CPM Sealer**. (I) cápsula fibrosa espessa e infiltrado celular inflamatório moderado (7 dias, hematoxilina-eosina, 10x). (J, L, M) infiltrado celular inflamatório leve na fina cápsula fibrosa (30, 60, 90 dias respectivamente, hematoxilina-eosina, 10x). **Controle**. (N) infiltrado celular inflamatório crônico moderado e cápsula fibrosa espessa (7 dias, hematoxilina-eosina, 10x). (O, P, Q) redução da espessura da cápsula fibrosa e de células inflamatórias próximas do tubo (30, 60, 90 dias respectivamente, hematoxilina-eosina, 10x).

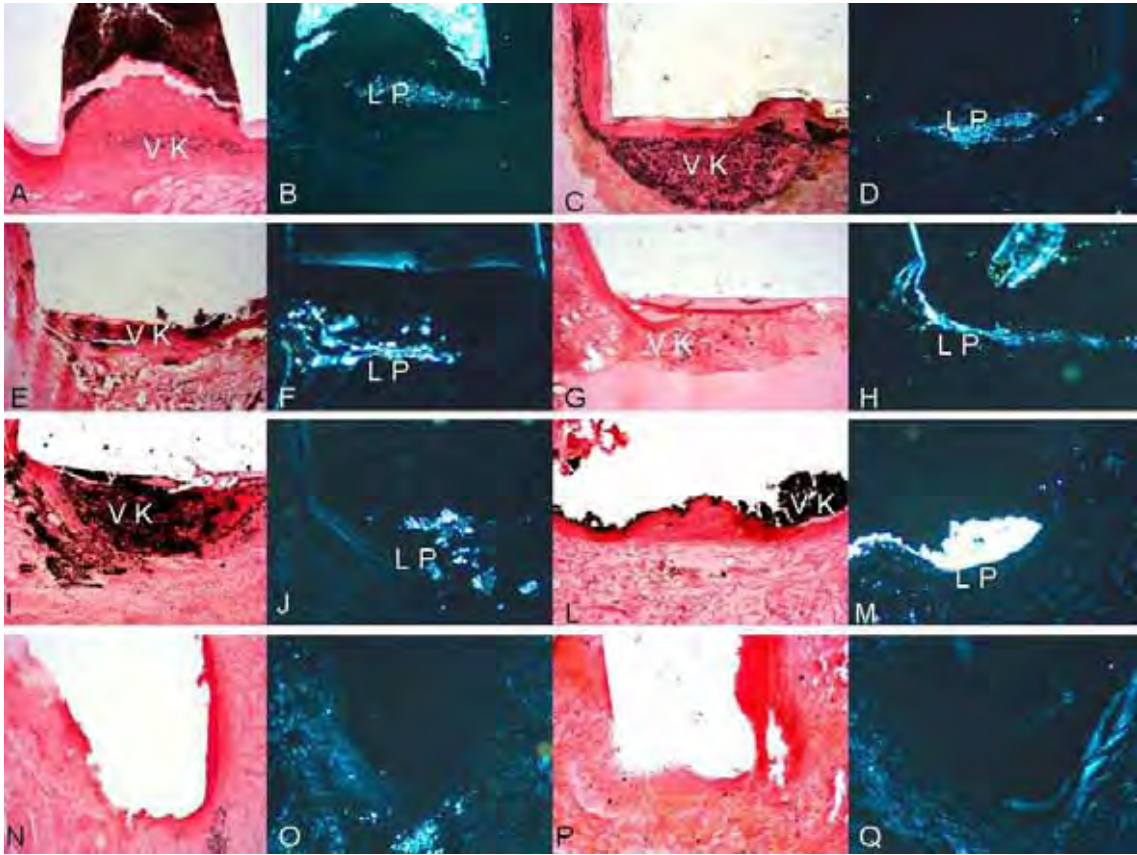
Figura 2. **Sealapex**. (A, C) presença de calcificação distrófica na abertura do tubo (30 e 90 dias respectivamente, Von Kossa, 10x). (B, D) presença de estruturas birrefringentes para luz polarizada (30 e 90 dias respectivamente, luz polarizada,

5x). **Ângelus MTA.** (E, G) presença de calcificação distrófica na abertura do tubo (30 e 90 dias respectivamente, Von Kossa, 10x). (F, H) presença de estruturas birrefringentes para luz polarizada (30 e 90 dias respectivamente, luz polarizada, 5x). **CPM Sealer.** (I, L) presença de calcificação distrófica na abertura do tubo (30 e 90 dias respectivamente, Von Kossa, 10x). (J, M) presença de estruturas birrefringentes para luz polarizada (30 e 90 dias respectivamente, luz polarizada, 5x). **Controle.** (N, P) ausência de calcificação distrófica na abertura do tubo (30 e 90 dias respectivamente, Von Kossa, 10x). (O, Q) ausência de estruturas birrefringentes para luz polarizada (30 e 90 dias respectivamente, luz polarizada, 5x).

MATERIAL	ESCORES				
	0	1	2	3	calcificação
7 dias					
Sealapex	0	0	100	0	100
MTA	0	0	100	0	100
CPM Sealer	0	0	100	0	100
Controle	0	0	100	0	0
15 dias					
Sealapex	0	0	100	0	100
MTA	0	100	0	0	100
CPM Sealer	0	0	100	0	100
Controle	0	0	100	0	0
30 dias					
Sealapex	0	0	100	0	100
MTA	0	100	0	0	100
CPM Sealer	0	90	10	0	90
Controle	0	90	10	0	0
60 dias					
Sealapex	0	90	10	0	90
MTA	0	100	0	0	100
CPM Sealer	0	100	0	0	90
Controle	0	100	0	0	0
90 dias					
Sealapex	0	100	0	0	90
MTA	0	100	0	0	100
CPM Sealer	0	100	0	0	90
Controle	0	100	0	0	0

Percentual das Amostras de Cada Grupo Classificado de Acordo com Escore Inflamatório, Presença de Necrose e Espessura da Cápsula Fibrosa





## *ARTIGO 2*

## **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE MATERIAIS ENDODÔNTICOS EM FIBROBLASTOS IN VITRO**

### **RESUMO:**

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> sobre a viabilidade celular e a produção de citocinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) por fibroblastos de camundongos. Os fibroblastos (L929) foram estimulados com os cimentos inseridos em “inserts” Millipore. Depois de 24 horas de incubação a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT. Cultura de células sem os cimentos foi utilizada como controle. Os resultados foram lidos em espectrofotômetro (leitor de ELISA) e os dados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA com correção de BonFerroni. Para a avaliação de IL-1 $\beta$  e IL-6, os materiais foram inseridos em poços de fundo chato, condensados e deixados tomar presa por 2 semanas em meio de cultura DMEM. Fibroblastos da linhagem L929 foram semeados nos poços contendo os materiais ao fundo. Depois de 24 horas de incubação os meios de cultura foram coletados e analisados para IL-1 $\beta$  e IL-6 por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Poços sem material, mas com cultura de células serviram como controle. Os dados foram estatisticamente analisados pelo teste ANOVA com correção de BonFerroni. Os cimentos Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> não reduziram significativamente a viabilidade celular. Todos os materiais liberaram IL-6, mas a quantidade não foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Somente o Ângelus MTA liberou IL-1 $\beta$  em quantidade estatisticamente significativa maior que o controle.

**Palavras-chave:** Materiais endodônticos; Cultura de células; Citocinas.

## **INTRODUÇÃO:**

O material ideal para obturação de canal radicular deveria ser biocompatível, dimensionalmente estável, induzir osteogênese e cementogênese, ser de fácil manipulação e uso, esterilizável, radiopaco, de baixo custo (1,2).

O agregado de trióxido mineral (MTA) foi criado para ser utilizado em perfurações patológicas ou iatrogênicas da raiz, bem como para selar cavidades (2,3). Estudos têm mostrado que o MTA promove reações favoráveis em contato com os tecidos, caracterizadas pela ausência de respostas inflamatórias severas, presença de uma cápsula fibrosa e indução de reparação pela formação de tecido mineralizado (4,5,6). No entanto, o MTA possui algumas propriedades que não são ideais. O cimento resultante da mistura de pó com a água é difícil de manipular (7) e seu tempo de presa tem sido relatado como sendo de quase 3 horas, enquanto que o tempo de trabalho é inferior a 4 minutos (8).

Uma nova formulação de MTA denominado de Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> (CPM Sealer) (Egeo SRL, Buenos Aires, Argentina) foi proposto para ser utilizado como cimento de canal radicular. O CPM Sealer após a mistura é composto por Agregado de Trióxido Mineral (SiO<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>O, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SO<sub>3</sub>, CaO, Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): 50%; SiO<sub>2</sub>: 7%; CaCO<sub>3</sub>: 10%; Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 10%; BaSO<sub>4</sub>: 10%; Alginato de Propilenoglicol: 1%; Propilenoglicol: 1%; Citrato de sódio: 1%; Cloreto de Cálcio: 10% de acordo com as recomendações dos fabricantes. A composição química é semelhante à do MTA, mas com a adição de carbonato de cálcio com a finalidade de reduzir o pH de 12,5 para 10,0 após sua manipulação.

O cimento endodôntico Sealapex<sup>®</sup> (Sybron Endo Glendora, Califórnia, E.U.A.) é um cimento que contém hidróxido de cálcio em sua composição sendo clinicamente

favorável devido ao processo de cicatrização do tecido (9,10). A difusão de íons liberados pelo cimento no canal radicular contribui para que ocorra um aumento do pH na superfície da raiz adjacente aos tecidos periodontais, favorecendo a reparação (11), a ação antimicrobiana (12), a degradação de lipopolissacarídeos bacterianos (13), bem como a indução da formação de tecido duro (14), e o controle da reabsorção radicular inflamatória (15, 16).

Alguns modelos experimentais são utilizados para avaliação da citotoxicidade dos materiais. Um deles utiliza-se das técnicas de cultivo celular (17) tendo como vantagens, ser um método relativamente barato e rápido para ser aplicado para diversos materiais (18). Além disso, ensaios de citotoxicidade apresentam elevada confiabilidade e reprodutibilidade (19).

O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos dos cimentos endodônticos Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> e Sealapex<sup>®</sup> e do cimento reparador Ângelus MTA<sup>®</sup>, sobre a viabilidade celular em fibroblastos, bem como avaliar os efeitos destes materiais sobre a liberação de IL-6 e IL-1 $\beta$ .

## **MATERIAL E MÉTODOS:**

Fibroblastos de camundongos (L929) foram cultivados em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL, Gaithersburg, Md), estreptomicina (50g/mL), e 1% antibiótico / coquetel antimicótico (300 unidades / mL, 300 mg / mL estreptomicina, 5 mg / mL anfotericina 100 g / mL) [Gibco BRL, Gaithersburg, Md] sob condições padrão de cultivo celular (37°C, 100% de umidade, 95% ar, e 5% CO<sub>2</sub>).

Os materiais utilizados neste estudo foram os cimentos endodônticos Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> (Egeo SRL, Buenos Aires, Argentina) e Sealapex<sup>®</sup> (Sybron Endo

Glendora, Califórnia, E.U.A.), e o cimento reparador Ângelus MTA<sup>®</sup> (Angelus, Londrina, Brasil). Os materiais testados foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Para o teste de citotoxicidade fibroblastos foram distribuídos em placas de 24 poços ( $3 \times 10^6$  células/poço). Após um período de 24 horas, os fibroblastos em confluência foram utilizados nos ensaios. As culturas foram mantidas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Tubos de polietileno com 1,1 mm de diâmetro interno e 10,0 mm de comprimento foram preenchidos com os cimentos testados (BARD, CR, Bard Ltda Irlanda, Galway, Irlanda). Os tubos contendo os cimentos foram adicionados em um “insert” Millipore, para evitar o contato direto entre os cimentos e as células e foram mantidos por 24 horas. Seis poços foram utilizados para cada material e tubos vazios foram utilizados como controle.

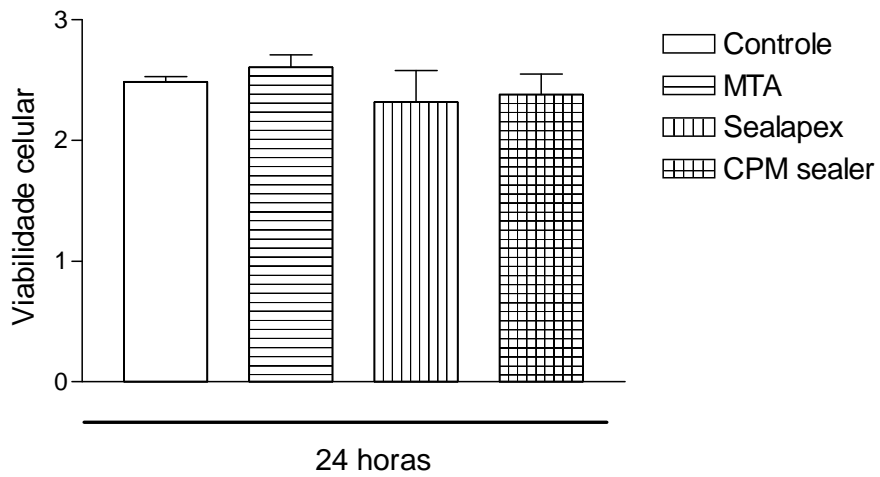
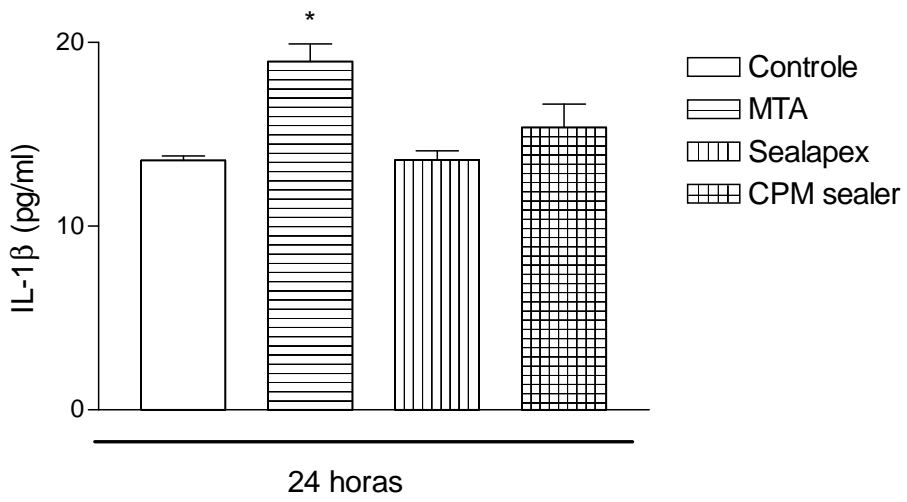
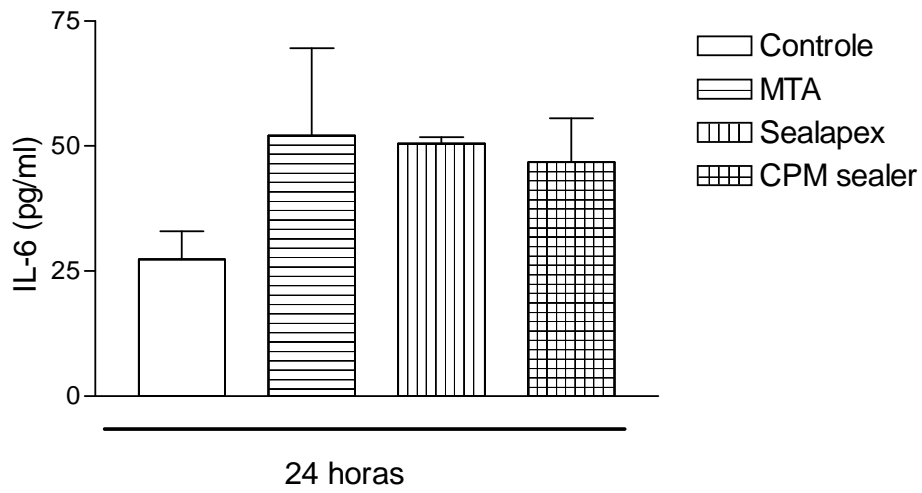
A análise do metabolismo celular foi realizada pelo método colorimétrico do MTT (3 - [4,5-dimethylthiazol-2-il] -2,5-difenil brometo de tetrazolium) (MTT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, E.U.A.). A solução MTT (5mg de 2,5-difenil brometo de tetrazolium de marca comercial Sigma<sup>®</sup>/1mL de PBS) foi filtrada e esterilizada utilizando filtro Millipore 0,22 µm. A solução foi adicionada em cada poço ( 10 µL de MTT por 90 µL de meio de cultura), contendo os fibroblastos pós-estímulo os quais permaneceram incubados por 4 horas a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a solução de MTT foi retirada dos poços e descartada. Álcool isopropílico (100 µL) foi adicionado às células, deixadas em mesa agitadora à temperatura ambiente por 30 minutos para dissolver os cristais azuis (cristais de formazan). A solução azul foi transferida para uma placa de 96 poços e levada ao espectrofotômetro com comprimento de onda ajustado para 570 nm, no qual a leitura de absorbância foi realizada (20).

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para avaliação da liberação de citocinas por fibroblastos estimulados por cimentos. Os materiais foram inseridos nos poços de fundo chato (Corning), e condensados até atingirem aproximadamente 1 mm de espessura e o mesmo diâmetro dos poços. O material foi deixado tomar presa por 2 semanas em meio de cultura DMEM a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado todos os dias durante esse tempo. Fibroblastos da linhagem L929 foram semeados nos poços (10<sup>6</sup> células/poço) contendo os materiais ao fundo. As placas foram incubadas por 24 horas. Após a incubação, os meios de cultura foram coletados e analisados para IL-1β e IL-6 por ELISA (R & D Systems, Inc, Minneapolis, Minn). Poços sem material, mas com cultura de células serviram como controle.

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA com correção de BonFerroni (p<0,05).

## **RESULTADOS:**

Após 24 horas de contato dos materiais testados com os fibroblastos, a viabilidade das células estimuladas com os cimentos foi comparada com o grupo controle. O CPM Sealer, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> produziram um leve efeito tóxico aos fibroblastos em cultura, porém este efeito não foi estatisticamente significativo quando comparado ao controle (fig. 3). O ensaio imunoenzimático ELISA revelou que a média dos níveis de IL-6 (pg/ml) foi mais elevada quando as células foram cultivadas na presença do CPM Sealer, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup>, do que no controle, por 24h, contudo sem diferença estatisticamente significativa (fig. 1). A liberação de IL-1β foi estatisticamente significativa maior que o controle somente para o Ângelus MTA<sup>®</sup> (fig. 2).



## **DISCUSSÃO:**

Materiais endodônticos devem ser biocompatíveis e ter propriedades físico-químicas satisfatórias (1). Os efeitos tóxicos dos materiais utilizados para a terapia endodôntica são de particular preocupação, pois podem causar danos ou irritação, degeneração dos tecidos periapicais e retardo da cicatrização (17).

Neste estudo, o ensaio MTT foi escolhido baseado na capacidade das enzimas desidrogenase succínica presentes em mitocôndrias de células vivas em quebrar os anéis de Tetrazolium da solução de MTT, formando cristais de formazan que possuem coloração violeta. As vantagens deste método são sua simplicidade, rapidez e precisão (20,21).

Fibroblastos de camundongos foram utilizados e já foi comprovada a viabilidade celular dessa linhagem em estudos anteriores (22). Fibroblastos são as células predominantes no tecido conjuntivo periodontal e são responsáveis pela formação e manutenção das fibras do ligamento periodontal, bem como, estão envolvidos no reparo, remodelação e regeneração do osso e cimento adjacente (23). Por isso, acredita-se que a função dos fibroblastos seja importante para o sucesso no processo de reparo (19,23). A cementogênese é similar a osteogênese, requerendo a ação reguladora de células especializadas (cementoblastos e osteoblastos) e com potencial para se diferenciarem em fibroblastos (24).

Os materiais testados foram introduzidos em tubos de polietileno e foram colocados imediatamente no meio de cultura para avaliação da citotoxicidade. É interessante o resultado da investigação dos materiais endodônticos imediatamente após a mistura, pois são inseridos em um meio úmido sem a sua presa completa, e assim, é provável que, durante um tempo relativamente curto, simulando a aplicação clínica, respostas locais sejam provocadas pela reação completa ou parcial dos seus

componentes. Imediatamente após a manipulação, é possível que componentes potencialmente tóxicos sejam liberados a partir dos materiais podendo ser considerados responsáveis pela citotoxicidade do material (21).

Estudos têm demonstrado que o MTA promove reações teciduais favoráveis, caracterizado pela ausência de respostas inflamatórias severas e indução do reparo tecidual pela formação de tecido mineralizado (4,25). Vários estudos *in vitro* demonstram que o MTA não foi citotóxico em fibroblastos (26,27,28). No presente estudo o Ângelus MTA<sup>®</sup> também não se mostrou citotóxico. Os principais componentes presentes no MTA são silicato tricálcio, aluminato tricálcio, óxido tricálcio e óxido de silicato, os quais também são os principais componentes do tecido duro dental (27), que pode ser a razão dos resultados encontrados.

O CPM Sealer apresenta composição química semelhante ao MTA e foi proposto para ser utilizado como cimento endodôntico. De acordo com os fabricantes, tem características física, química e biológica similar, ou melhor, quando comparada ao MTA, mas com adição de carbonato de cálcio com a intenção de reduzir o pH de 12,5 depois de manipulado para 10, limitando a necrose de superfície dos tecidos adjacentes e permitindo a fosfatase alcalina que pode ser indiretamente demonstrada pela formação de áreas mineralizadas uma vez que o MTA é capaz de induzir a expressão prematura e melhorada da atividade da fosfatase alcalina pela população de fibroblastos (28) que está associada com a mineralização. Neste estudo o CPM Sealer não apresentou citotoxicidade estatisticamente significativa maior que o grupo controle. O resultado pode ser explicado pela semelhança na composição do CPM Sealer em relação ao MTA que já foi mostrado ser biocompatível em cultura de fibroblastos (26,27,28).

O Sealapex<sup>®</sup> foi empregado no presente estudo como uma referência de cimento endodôntico contendo hidróxido de cálcio e por ter sido extensamente estudado

(11,12,13,14,15,16) e ser clinicamente utilizado em função do favorável processo de reparo observado com sua utilização (9,10). Este material também não foi citotóxico em relação ao grupo controle, embora tenha inviabilizado maior número de células. O resultado pode estar relacionado com o elevado pH do Sealapex<sup>®</sup> após a mistura (16,29), o que está de acordo com os resultados já observados no período de 24 horas apresentando alta citotoxicidade em cultura de fibroblastos L929 (30). Os íons liberados têm avaliações diferentes em função do modelo experimental utilizado. Por um lado produtos com hidróxido de cálcio são mais citotóxicos que outros materiais em cultura de células (29,30), mas por outro estimulam a reparação com formação de tecido mineralizado quando avaliados in vivo (10,14).

Quanto à síntese de citocinas, estudos anteriores demonstraram que o MTA estimulou a produção de IL-1 $\beta$  por osteoblastos (31,32,33). A IL-1 $\beta$  é uma citocina que medeia a reabsorção óssea. É sintetizada por várias células, assim como macrófagos próximos da área de reabsorção óssea e osteoclastos (34). Neste estudo, somente o Ângelus MTA estimulou a liberação de IL-1 $\beta$  em quantidade estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. A IL-6, por outro lado, é uma citocina que medeia a resposta do hospedeiro para a injúria e infecção, sendo secretada durante o processo inflamatório com a finalidade de regular vários aspectos da resposta imune, fase aguda da reação, hematopoiese e controle da infecção (35). Animais depletados de IL-6 mostraram lesões periapicais mais amplas que ratos normais (35). De acordo com os resultados encontrados, todos os materiais liberaram IL-6, mas a quantidade não foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, mostrando que podem ter um papel importante no controle da infecção e no favorecimento do processo de reparo.

Pode-se concluir com a metodologia empregada que os cimentos Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> não inibiram de forma significativa a viabilidade

celular. Todos liberaram IL-6, mas a quantidade não foi estatisticamente diferente do controle. Somente o Ângelus MTA<sup>®</sup> liberou IL-1 $\beta$  em quantidade estatisticamente significante maior que o controle.

#### **REFERÊNCIAS:**

1. Grossman LI. Physical properties of root canal cements. *J Endod* 1976;2:166-75.
2. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod* 1993;19:591-5.
3. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;19:541-4.
4. Gomes-Filho JE, de Faria MD, Bernabé PF, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan Júnior E, de Moraes Costa MM, Cannon M. Mineral Trioxide Aggregate but not light-cure Mineral Trioxide Aggregate stimulated mineralization. *J Endod* 2008;34:62-5.
5. Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of Mineral Trioxide Aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995;79:756-63.
6. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabe PFE, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J* 2001;12:3-8.
7. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21:349-53.

8. Matt GD, Thorpe JR, Strother JM, McClanahan SB. Comparative study of white and gray mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one- or two-step apical barrier technique. *J Endod* 2004;30:876-9.
9. Holland R, Otoboni Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Dezan Junior E. Calcium hydroxide and a corticosteroid-antibiotic association as dressings in cases of biopulpectomy. A comparative study in dogs' teeth. *Braz Dent J* 1998;9:67-76.
10. Tagger M & Tagger E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH 26 in monkeys. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:139-46.
11. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981;7:17-21.
12. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985;1:170-5.
13. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod* 1993;19:76-8.
14. Holland R, de Mello W, Nery MJ, Bernabe PFE, de Souza V. Reaction of human periapical tissue to pulp extirpation and immediate root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1977, 3:63-7.
15. Tronstad L. Root resorption - etiology, terminology and clinical manifestations. *Endod Dent Traumatol* 1988;4:241-52.
16. Eldeniz AU, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T, Kirikale K, Turkey I. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and

- Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:86-91.
17. Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endod* 2002;28:749-53.
  18. Vajrabhaya L, Sithisarn P. Multilayer and monolayer cell cultures in a cytotoxicity assay of root canal sealers. *Int Endod J* 1997;30:141-4.
  19. Arenholt-Bindslev D, Hörsted-Bindslev P. A simple model for evaluating relative toxicity of root filling materials in cultures of human oral fibroblasts. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:219-26.
  20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
  21. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J* 2002;35:153-8.
  22. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod* 1998;24:91-6.
  23. Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol* 2000 2000;24:28–55.
  24. Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology* 2000 2000;24:73–98.
  25. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205.

26. Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, Ural AU. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2007;33:1450-4.
27. Vajrabhaya LO, Korsuwannawong S, Jantararat J, Korre S. Biocompatibility of furcal perforation repair material using cell culture technique: Ketac Molar versus ProRoot MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:48-50.
28. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res* 2004;83:408-13.
29. Huang TH, Ding SJ, Hsu TZ, Lee ZD, Kao CT. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. *Journal of materials science: materials in medicine* 2004; 15:767-71.
30. Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J Endod* 2000;26:328-30.
31. Key JE, Rahemtulla FG, Eleazer PD. Cytotoxicity of a new root canal filling material on human gingival fibroblasts. *J Endod* 2006;32:756-8.
32. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1997;37:432-9.
33. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 1998;24:543-7.
34. Haglund R, He J, Jarvis J, Safavi KE, Spangberg LSW, Zhu Q. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:739-45.

35. Huang GT-J, Do M, Wingard M, Park JS, Chugal N. Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:83-8.

## **DISCUSSÃO:**

A finalidade do presente trabalho foi avaliar in vivo a resposta tecidual frente à implantação de tubos de polietileno preenchidos com CPM Sealer, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, bem como, avaliar in vitro os efeitos destes materiais em fibroblastos de camundongos, com a finalidade de avaliar a citotoxicidade e a produção de citocinas (IL-1 $\beta$  e IL-6).

A avaliação da biocompatibilidade pode ser feita por diferentes modelos experimentais, tais como, reação periapical em dentes de cães, em polpa de dentes de cães, cultura de células e subcutâneo de ratos sendo este o mais realizado pela facilidade operatória e padronização da metodologia e resultados.

Para a inserção dos materiais estudados, optamos por tubos de polietileno, pela facilidade de se estabelecer à quantidade do material a ser pesquisado (26,27). Os tubos de polietileno são largamente empregados e aceitos em protocolos para testes de biocompatibilidade em tecido subcutâneo de ratos. Além disso estes tubos utilizados como matrizes evitam traumas mecânicos exercidos pelos materiais quando implantados sozinhos (26).

As amostras foram processadas e incluídas em glicol metacrilato (GMA). Essa técnica apresenta como vantagens a preservação da morfologia celular, redução dos artefatos durante os procedimentos histológicos, e possibilidade de identificação do tipo celular no processo inflamatório, sendo estas características histológicas fundamentais para avaliação da biocompatibilidade do material (26).

A análise qualitativa adotada, realizada por meio de atribuições de escores, foi baseada nos critérios de trabalhos clássicos (27,28) com a finalidade de tornar nossos resultados mais objetivos, porém com algumas modificações em função do modelo biológico proposto neste trabalho e após algumas observações microscópicas.

Quanto aos resultados obtidos com a metodologia usada, os tubos vazios neste estudo causaram poucas reações no tecido conjuntivo subcutâneo. A cápsula fibrosa em volta do tubo estava fina e o infiltrado inflamatório diminuiu depois do 30º dia, que está de acordo com trabalhos anteriores (10,28,29).

O Ângelus MTA apresentou um infiltrado celular inflamatório moderado no 7º dia, consistindo de linfócitos e macrófagos presentes na cápsula fibrosa. A intensidade da inflamação reduziu à partir do 15º dia. Granulações birrefringentes para luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas próximas da abertura dos tubos, justificando a deposição de cristais de calcita através da reação do óxido de cálcio presente no MTA com a água ou fluidos do tecido formando hidróxido de cálcio.

Os resultados observados com CPM Sealer foram similares ao Ângelus MTA® e grupo Controle. Uma resposta inflamatória crônica moderada no 7º e 15º dias, que reduziu com o tempo foi observada na fina cápsula fibrosa de tecido conjuntivo na abertura do tubo. Áreas de Von Kossa positivo e estruturas birrefringentes sob luz polarizada também foram observadas demonstrando que este material estimulou a formação de tecido mineralizado no tecido subcutâneo de ratos via formação de carbonato de cálcio pela reação do cálcio do material com o dióxido de carbono do tecido circundante (10).

O CPM Sealer, de acordo com o fabricante, tem características física, química e biológica similar, ou melhor, quando comparadas ao MTA. O CPM Sealer tem composição similar ao MTA, mas com adição de carbonato de cálcio com a intenção de reduzir o pH depois de manipulado para 10, limitando a necrose da superfície dos tecidos adjacentes e permitindo a fosfatase alcalina. No presente estudo, realmente não foi notado extensas áreas de necrose em íntimo contato com CPM Sealer ou MTA. Além disso, a atividade da fosfatase alcalina pode ser indiretamente demonstrada pela

formação de áreas mineralizadas uma vez que o MTA é capaz de induzir a expressão prematura e melhorada da atividade da fosfatase alcalina pela população de fibroblastos, o qual está associada com a mineralização (30). O CPM Sealer também contém cloreto de cálcio, cuja adição ao MTA conforme demonstrado, reduziu o tempo de presa e melhorou as características de manipulação e selamento (31,32,33,34) sem qualquer alteração na resposta tecidual (35).

A composição do CPM Sealer pode explicar a diferença relativa observada na resposta tecidual quando foi comparado com o Sealapex<sup>®</sup>, um material devidamente desenvolvido para ser utilizado como cimento endodôntico e foi empregado no presente estudo como uma referência. Este cimento exibiu uma reação moderada no 7° e 15° dias. No entanto, no 30° dia, é apresentado um processo inflamatório mais intenso do que o grupo Controle e CPM Sealer. A resposta inflamatória diminuiu e a cápsula fibrosa se tornou mais fina no 60° e 90° dias. Além disso, os resultados do presente estudo, juntamente com aqueles relatados anteriormente, corroboram a promoção de estruturas mineralizadas birrefringentes para luz polarizada ou Von Kossa positivo (36). Estas calcificações podem se originar a partir do óxido de cálcio presente no Sealapex<sup>®</sup> que reage com os fluídos do tecido formando hidróxido de cálcio, o qual, em contato com a água, dissocia em íon cálcio e íon hidroxila. O íon cálcio reage com o dióxido de carbono dos tecidos formando granulações de carbonato de cálcio apresentado como cristais de calcita birrefringentes para luz polarizada (10). Esses cristais, juntamente com a fibronectina podem apresentar um papel fundamental para o início da formação da barreira de tecido duro (36,37).

Quanto aos resultados obtidos com os testes de citotoxicidade, os materiais testados foram introduzidos em tubos de polietileno e foram colocados imediatamente no meio de cultura. É interessante o resultado da investigação dos materiais

endodônticos imediatamente após a mistura, pois são inseridos em um meio úmido sem a sua presa completa, e assim, é provável que, durante um tempo relativamente curto, simulando a aplicação clínica, respostas locais sejam provocadas pela reação completa ou parcial dos seus componentes. Imediatamente após a manipulação, é possível que componentes potencialmente tóxicos sejam liberados a partir dos materiais podendo ser considerados responsáveis pela citotoxicidade do material (38).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o Ângelus MTA<sup>®</sup> não foi citotóxico, de acordo com trabalhos anteriores (30,39,40). Os principais componentes presentes no MTA também fazem parte do tecido duro dental como silicato tricálcio, aluminato tricálcio, óxido tricálcio e óxido de silicato (40), que pode ser a razão do resultado encontrado.

O CPM Sealer não apresentou citotoxicidade estatisticamente significante maior que o grupo controle. O resultado pode ser explicado pela semelhança na composição do CPM Sealer em relação ao MTA que já foi mostrado ser biocompatível em cultura de fibroblastos (30,32,39,40).

O Sealapex<sup>®</sup> também não foi citotóxico em relação ao grupo controle, embora tenha inviabilizado maior número de células. O resultado pode estar relacionado com o elevado pH do Sealapex<sup>®</sup> após a mistura (41,42), que está de acordo com os resultados já observados apresentando alta citotoxicidade em cultura de fibroblastos L929 num período de 24 horas (41). Os íons liberados têm avaliações diferentes em função do modelo experimental utilizado. Por um lado produtos com hidróxido de cálcio são mais citotóxicos que outros materiais em cultura de células (41,42), mas por outro estimulam a reparação com formação de tecido mineralizado quando avaliados in vivo (43,44).

Quanto às citocinas, desempenham papel importante na modulação de reações inflamatórias. São produzidas não somente por células imune assim como linfócitos,

monócitos, macrófagos e granulócitos, mas também por células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos. A IL-1 $\beta$  é uma citocina que desempenha um papel importante na mediação de várias respostas inflamatórias. Um dos efeitos da IL-1 $\beta$  é estimular fibroblastos a produzir metaloproteinases que degradam componentes da matriz extracelular nas artrites reumatóide e periodontites. A IL-1 $\beta$  está envolvida também nos processos de reabsorção óssea por aumentar a maturação e atividade de osteoclastos (45). A IL-1 $\beta$  é sintetizada por macrófagos próximos da reabsorção óssea e por osteoclastos (46). No presente estudo somente o Ângelus MTA<sup>®</sup> promoveu a liberação de IL-1 $\beta$  pelos fibroblastos em quantidade maior estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, colaborando com alguns estudos anteriores que demonstraram a produção de IL-1 $\beta$  por osteoblastos estimulados por MTA, estatisticamente significantes (47,48,49).

A IL-6, por outro lado, é uma citocina que medeia a resposta do hospedeiro para injúria e infecção. Tem como finalidade regular vários aspectos da resposta imune, fase aguda da reação, hematopoiese e tem efeitos no crescimento e diferenciação das células B e T (50). A IL-6 é considerada uma citocina tanto pró-inflamatória como anti-inflamatória, sendo secretada durante a inflamação e após a secreção do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e IL-1. A IL-6 posteriormente inibe a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-1 (51,52,53). A depleção de IL-6 em ratos resulta no enfraquecimento da resposta neutrofílica e no desenvolvimento de células CD4<sup>+</sup> Th1 após infecção por *Candida albicans* (54) e órgãos altamente infectados por vários tipos de bactérias após infecção com *Listeria monocytogenes* (55). Esses resultados podem ser atribuídos à incapacidade de recrutar um número normal de células imune para o local da infecção ou à deficiência na diferenciação de macrófagos na medula óssea (56), sugerindo que a IL-6 tem um papel protetor contra a infecção. No entanto, outros estudos têm demonstrado o

seu papel conflitante. Por exemplo, níveis elevados de IL-6 correlacionam com a suscetibilidade à infecção (57). Tem sido demonstrado que a neutralização de IL-6 tem um efeito protetor em algumas infecções experimentais (58). A IL-6 está também envolvida na regulação das funções endócrinas e metabólicas, incluindo remodelação óssea. Tem sido demonstrado que a IL-6 estimula a reabsorção óssea *in vitro* (59) e *in vivo* (60) por ter papel direto na osteoclastogênese (61,62). Por estimular o desenvolvimento de osteoclastos, a IL-6 desempenha um profundo papel na homeostase esquelética (50). A IL-6 é considerada fator patogênico da osteoporose e várias outras doenças causadas por aumento de reabsorção óssea por osteoclastos (63). Tem sido relatado que ratos deficientes de IL-6 estão protegidos da reabsorção óssea causada por depleção de estrógeno (64). A IL-6 é produzida em tecidos pulpar, periapical e periodontal inflamados e pode estar envolvida na patogênese de doenças pulpar e periodontal (65,66). Lesões periapicais, que formam a partir da infecção de canal radicular, são caracterizadas por uma resposta imune com invasão de microrganismos e pela reabsorção óssea. Uma complexa rede de citocinas regula a formação de lesões periapicais (67,68,69). Ratos com gene “knock-outs” para diferentes citocinas e seus receptores, como a IL-1 e TNF, tem sido usado para estudo do papel dessas citocinas na formação de lesões periapicais (70). Por causa do complexo papel da IL-6 na regulação de reações imune e reabsorção óssea, esses efeitos sobre a formação de lesão periapical após a infecção do canal radicular são difíceis de prever. De acordo com Huang e colaboradores (71), ratos depletados de IL-6 mostraram lesões periapicais mais amplas e mais rapidamente que ratos normais. De acordo com os resultados encontrados neste estudo, todos os materiais liberaram IL-6, mas a quantidade não foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, mostrando que podem ter um papel importante no controle da infecção e no favorecimento do processo de reparo.

Pode-se concluir com a metodologia empregada que os cimentos Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> não reduziram de forma significativa a viabilidade celular. Todos liberaram IL-6, mas a quantidade não foi estatisticamente significativa. Somente o Ângelus MTA<sup>®</sup> liberou IL-1 $\beta$  em quantidade estatisticamente significativa maior que o grupo controle.

## CONCLUSÃO:

Concluiu-se com base nas metodologias empregadas que:

1. Aos 7 dias, a resposta inflamatória causada pelo Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> foi moderada, sem diferença estatisticamente significativa.
2. Houve diferença estatisticamente significativa entre Ângelus MTA<sup>®</sup> (escore 1) e outros grupos (escore 2) no período experimental de 15 dias.
3. Houve diferença estatisticamente significativa entre o Sealapex<sup>®</sup> (escore 2) e outros grupos (escore 1) no período experimental de 30 dias.
4. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos períodos experimentais de 60 e 90 dias.
5. Granulações birrefringentes à luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas em íntimo contato com o Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup>.
6. Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> foram biocompatíveis em cultura de fibroblastos.
7. Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, Sealapex<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> liberaram IL-6 em cultura de fibroblastos, mas a quantidade não foi estatisticamente significativa em relação ao controle.
8. Somente o Ângelus MTA<sup>®</sup> liberou IL-1 $\beta$  em quantidade estatisticamente significativa maior que o controle.

## REFERÊNCIAS:

1. Gomes-Filho JE, Bernabé PFE, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Júnior E, Costa MMTM, Faria MD, Watanabe S, Gomes AC. Reaction of rat connective tissue to a new calcium hydroxide-based sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:71-6
2. Bezerra da Silva LA, Leonardo MR, Silva RS, Assed S, Guimarães LFL. Calcium hydroxide root canal sealers: evaluation of pH, calcium ion concentration and conductivity. *Int Endod J* 1997;30:205-9.
3. Cobankara FK, Orucoglu H, Sengun A, Bellt S. The quantitative evaluation of apical sealing of four endodontic sealers. *J Endod* 2006;32:66-8.
4. Eldeniz AU, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T. Evaluation of pH and calcium ion release of acrossal sealer in comparison with apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:86-91.
5. Kaplan AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *Int Endod J* 2003;36:527-32.
6. Lee K-W, Williams MC, Camps JJ, Pashley DH. Adhesion of endodontic sealers to dentin and gutta-percha. *J Endod* 2002;28:684-8.
7. Yücel AÇ, Güler E, Güler AU, Ertas E. Bacterial penetration after obturation with four different root canal sealers. *J Endod* 2006;32:890-3.
8. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;11:541-4.
9. Fischer EI, Arens DE, Miller CH. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and super-eba as a root-end filling material. *J Endod* 1998;24:176-9.

10. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Bernabé PFE, Dezan-Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999;25:161-6.
11. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod* 1995;21:403-6.
12. Bernabe PF, Holland R, Morandi R, Souza V, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Junior E, Gomes-Filho JE. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. *Braz Dent J* 2005;16:149-55.
13. Cintra LTA, Moraes IG, Bernabé PFE, Gomes-Filho JE, Bramante CM, Garcia RB, Bernardinelli N. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: Microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *J Endod* 2006;32:556-9.
14. Holland R, Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni-Filho JA, Dezan-Júnior E. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or portland cement. *Braz Dent J* 2001;12:109-13.
15. Holland R, Otoboni-Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Dezan-Júnior. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 2001;27:281-4.
16. Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endod* 1995;21:109-12.
17. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 1995;21:295-9.

18. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21:349-53.
19. Baek SH, Plenk-Júnior H, Kim S. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, superEBA, and MTA as root-end filling materials. *J Endod* 2005;31:444-9.
20. Estrela C, Bammann LL, Estrela CRA, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of mta, portland cement, calcium hydroxide paste, sealapex and dycal. *Braz Dent J* 2000;11:3-9.
21. Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: A long-term study. *J Endod* 2004;30:80-3.
22. Nakata TT, Bae KS, Baumgartner JC. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. *J Endod* 1998;24:184-6.
23. Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2003;29:407-12.
24. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205.
25. Ruiz PA, Souza AHF, Amorim RFB, Carvalho RA. Agregado de trióxido mineral (MTA): uma nova perspectiva em endodontia. *RBO* 2003;60:33-5.
26. Gomes-Filho JE, Gomes BPF, Zaia AA, Novaes PD, Souza Filho FJ. Glycol Methacrylate: An alternative method for embedding subcutaneous implants. *J Endod* 2001;27:266-8.
27. Olsson B. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod* 1981;7:355-69.

28. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod* 2004;30:95-9.
29. Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. *Int Endod J* 2003;36:281-7.
30. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res* 2004;83:408-13.
31. Wiltbank KB, Schwartz SA, Schindler WG. Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod* 2007;33:1235-8.
32. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of proroot mta to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod* 2007;33:1231-4.
33. Bortoluzzi EA, Juárez Broon N, Antonio Hungaro Duarte M, de Oliveira Demarchi AC, Monteiro Bramante C. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and whiten Portland cement. *J Endod* 2006;32:1194-7.
34. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod* 2006;32:897-900.
35. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Consolaro A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernadineli N. Mineral Trioxide Aggregate with or without Calcium Chloride in Pulpotomy. *J Endod*. 2008;34:172-5.

36. Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E, Murata SS. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod* 2002;28:173-6.
37. Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol* 1991;36:117-28.
38. Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J* 2002;35:153-8.
39. Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, Pekel A, Baran Y, Avcu F, Ural AU. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2007;33:1450-4.
40. Vajrabhaya LO, Korsuwannawong S, Jantarat J, Korre S. Biocompatibility of furcal perforation repair material using cell culture technique: Ketac Molar versus ProRoot MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:48-50.
41. Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J Endod* 2000;26:328-30.
42. Huang TH, Ding SJ, Hsu TZ, Lee ZD, Kao CT. Root canal sealers induce cytotoxicity and necrosis. *Journal of materials science: materials in medicine* 2004; 15:767-71.
43. Tagger M & Tagger E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH 26 in monkeys. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:139-46.

44. Holland R, de Mello W, Nery MJ, Bernabe PFE, de Souza V. Reaction of human periapical tissue to pulp extirpation and immediate root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1977, 3:63-7.
45. Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. *J Periodontol* 2003;74:103-10.
46. Haglund R, He J, Jarvis J, Safavi KE, Spangberg LSW, Zhu Q. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:739-45.
47. Key JE, Rahemtulla FG, Eleazer PD. Cytotoxicity of a new root canal filling material on human gingival fibroblasts. *J Endod* 2006;32:756-8.
48. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1997;37:432-9.
49. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 1998;24:543-7.
50. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 1993;54:1-78.
51. van Deventer SJ, Buller HR, Ten Cate JW, Aarden LA, Hack CE, Sturk A. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood* 1990;76:2520-6.
52. Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manogue KR, Palladino MA Jr, Cerami A, et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 1988;166:147-53.
53. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and

- tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood* 1990;75:40-7.
54. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Toniatti C, Puccetti P, et al. Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med* 1996;183:1345-55.
55. Dalrymple SA, Lucian LA, Slattery R, McNeil T, Aud DM, Fuchino S, et al. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. *Infect Immun* 1995;63:2262-8.
56. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994;368:339-42.
57. Yoshimoto T, Nakanishi K, Hirose S, Hiroishi K, Okamura H, Takemoto Y, et al. High serum IL-6 level reflects susceptible status of the host to endotoxin and IL-1/tumor necrosis factor. *J Immunol* 1992;148:3596-603.
58. Suzuki Y, Yang Q, Conley FK, Abrams JS, Remington JS. Antibody against interleukin-6 reduces inflammation and numbers of cysts in brains of mice with toxoplasmic encephalitis. *Infect Immun* 1994;62:2773-8.
59. Ishimi Y, Miyaoura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, et al. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* 1990;145:3297-303.
60. Binkley NC, Sun WH, Checovich MM, Roecker EB, Kimmel DB, Ershler WB. Effects of recombinant human interleukin-6 administration on bone in rhesus monkeys. *Lymphokine Cytokine Res* 1994;13:221-6.

61. Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, et al. 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* 1992;89:883-91.
62. Passeri G, Girasole G, Manolagas SC, Jilka RL. Endogenous production of tumor necrosis factor by primary cultures of murine calvarial cells: influence on IL-6 production and osteoclast development. *Bone Miner* 1994;24:109-26.
63. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med* 1998;128:127-37.
64. Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H, et al. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J* 1994;13:1189-96.
65. Barkhordar RA, Hayashi C, Hussain MZ. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:26-7.
66. Irwin CR, Myrillas TT. The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis* 1998;4:43-7.
67. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:498-521.
68. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J* 1998;31:311-25.
69. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* 1999;44:55-66.

70. Chen CP, Hertzberg M, Jiang Y, Graves DT. Interleukin-1 and tumor necrosis factor receptor signaling is not required for bacteria-induced osteoclastogenesis and bone loss but is essential for protecting the host from a mixed anaerobic infection. *Am J Pathol* 1999;155:2145-52.
71. Huang GT-J, Do M, Wingard M, Park JS, Chugal N. Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:83-8.

***ANEXO 1***

## **A Mineral Trioxide Aggregate sealer stimulated mineralization**

### **ABSTRACT:**

The aim of this study was to evaluate the rat subcutaneous tissue response to implanted polyethylene tubes filled with Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> (Portland Cement Modified Sealer) compared to Sealapex<sup>®</sup> and Ângelus MTA<sup>®</sup>. These materials were placed in polyethylene and dentin tubes and implanted into dorsal connective tissue of Wistar rats for 7, 15, 30, 60 and 90 days. The specimens were prepared to be stained with HE, Von Kossa and not stained for polarized light. Qualitative and quantitative evaluations of the reaction were performed. Both materials caused mild to moderate reactions at 7 days which decreased with time. The response was similar to the control at the 30th day with Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> and Ângelus MTA<sup>®</sup> and at 60th day with Sealapex<sup>®</sup>. Mineralization and birrefringent granulations to the polarized light were observed with all materials. It was possible to conclude that Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> was biocompatible and stimulated mineralization.

**Key Words:** MTA, Biocompatibility, connective tissue.

### **INTRODUCTION:**

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) was introduced to be used in pathologic or iatrogenic root perforations as well as in root end cavities (1,2). Studies have shown that MTA promotes favorable tissue reactions, characterized by absence of several inflammatory responses, presence of a fibrous capsule and the induction of formation of mineralized repair tissue (3,4). The hydrophilic nature of the particles from MTA powder allows its usage even in the presence of moisture (1). MTA has also been used in pulp capping or pulpotomy in animals and in humans, demonstrating remarkable success similar to that observed with calcium hydroxide (5-10).

However, despite of favorable characteristics, MTA do not presents physical properties to be used as a sealer (9,11). The resulting cement from the mixing of powder to water is difficult to manipulate (9), and its setting time has been reported to be 2 h 45 min but the working time less than 4 min (12). Additional moisture is also required to activate the setting of the cement (9).

A new formulation of MTA labeled Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> (CPM Sealer) (EGEO S.R.L., Buenos Aires, Argentina) was purposed to be used as root canal sealer. The material sheet states that the chemical composition is similar to the MTA but with the addition of calcium carbonate to reduce the pH from 12.5 to 10.0 after set. This way the surface necrosis in contact with the material is restricted allowing the action of the alkaline phosphatase.

Although CPM Sealer apparently presents positive characteristics to be properly used as a sealer, there is no study evaluating the reaction after its implantation. Thus, the aim of this study was to evaluate the tissue response and the ability of Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup>, compared with Sealapex<sup>®</sup> and MTA Ângelus<sup>®</sup> to stimulate mineralization in subcutaneous connective tissue of rats.

## **MATERIALS AND METHODS:**

Thirty male 4- to 6-month-old Wistar Albino rats, weighing 250-280g were used. The animals were housed in temperature-controlled rooms and received water and food ad libitum. The care of the animals was carried out according to Araçatuba School of Dentistry-UNESP Ethical Committee, which approved the project before the beginning of the experiments.

Ninety polyethylene tubes (Abbott Lab of Brazil, Sao Paulo, SP, Brazil) with 1.0-mm internal diameter, 1.6-mm external diameter, and 10.0-mm length were filled with the tested materials. The Sealapex<sup>®</sup> (Sybron Endo Glendora, Califórnia, USA), Ângelus MTA<sup>®</sup> (Ângelus, Londrina, Brazil) and CPM Sealer (EGEO S.R.L., Buenos Aires, Argentina) were prepared according to the manufacturer's recommendations and inserted into the tubes with a lentulo spiral (Maillefer Dentsply, Tulsa, OK). Thirty polyethylene tubes remained empty and were used as control.

The composition of CPM Sealer after mixing is Mineral Trioxide Aggregate (SiO<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>O, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SO<sub>3</sub>, CaO, Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): 50%; SiO<sub>2</sub>: 7%; CaCO<sub>3</sub>: 10%; Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 10%; BaSO<sub>4</sub>: 10%; Propyleneglycol Alginate: 1%; Propyleneglycol: 1%; Sodium citrate: 1%; calcium chloride: 10% according to the manufacturer.

The animals were shaved under xylazine (10 mg/kg) and ketamine (25 mg/kg) anesthesia before the antiseptis with 5% iodine solution. Then the shaved backs received a 2-cm incision in a head to tail orientation with a number 15 BP blade. The skin was reflected, creating 3 pockets in each side of the incision. The tubes were implanted into the spaces created with blunt dissection, and the skin was closed with 4/0 silk suture.

After 7, 15, 30, 60 and 90 days from the implantation time, the tubes and surrounding tissues were removed and fixed in 10% buffered formalin at pH 7.0

(13,14). The tubes were then bisected transversely and both halves were cut again longitudinally using a sharp blade. This was made to allow the surfaces being readily kept in contact with the processing solutions. The specimens were processed for glycol methacrylate (GMA) embedding, serially sectioned into 3-  $\mu\text{m}$  cuts and stained with hematoxylin-eosin (15). The 10- $\mu\text{m}$  cuts were stained according to Von Kossa technique or remained without staining to be observed under polarized light. Von Kossa technique was used to observe mineralized structures in the tissue, which is stained dark. Polarized light technique allows observing birefringent structures related to calcium carbonate crystals originated from the combination of calcium ions from the material with carbonic gas from the tissue (10).

Reactions in the tissue in contact with the material on the opening of the tube were scored according to previous studies (14,16,17) as 0, none or few cells and no reaction; 1, less than 25 cells and mild reaction; 2, between 25–125 cells and moderate reaction; and 3, 125 and more cells and severe reaction. Fibrous capsules were considered to be thin when thickness was  $<150 \mu\text{m}$  and thick at  $> 150 \mu\text{m}$ . Necrosis and calcification were recorded as present or absent. An average of value for each material was obtained from the sum of cells counted in 10 separate areas. Results were statistically analyzed by ANOVA and Kruskal Wallis tests.

## **RESULTS:**

### **CPM Sealer**

On the 7<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> days, a moderate inflammatory cell infiltration consisting of lymphocytes and macrophages was present in a fibrous capsule. The intensity of the inflammation and the thickness of the fibrous capsule were reduced at 30<sup>th</sup> days, similar to the Control group. At 60<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> days, few chronic inflammatory cells consisting of

lymphocytes, macrophages, fibroblasts were present in a thin fibrous capsule similar to the Sealapex<sup>®</sup> and Control group. Birefringent granulations to polarized light and structures Von Kossa positive were observed in close contact with the CPM Sealer (Fig.1 and Fig.2).

#### Sealapex<sup>®</sup>

On the 7<sup>th</sup>, 15<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days, a moderate inflammatory cell infiltration consisting of lymphocytes and macrophages was present in the fibrous capsule. The intensity of the inflammation was reduced at 60<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> days and the fibrous capsule near the tube was thin and similar to the control. Granulations birefringent to polarized light and Von Kossa positive were observed near the tube opening (Fig.1 and Fig.2).

#### Ângelus MTA<sup>®</sup>

On the 7<sup>th</sup> day, a moderate inflammatory cell infiltration consisting of lymphocytes and macrophages was present in a fibrous capsule. The intensity of the inflammation was reduced at 15<sup>th</sup>, 30<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> days with a thin fibrous capsule near the tube and almost none inflammatory cells. Granulations birefringent to polarized light and Von Kossa positive were observed near the tube opening (Fig.1 and Fig. 2).

#### Control (Empty Tubes)

At 7<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> days, a moderate chronic inflammatory cell infiltration consisting of lymphocytes and macrophages was present in a fibrous capsule. The fibrous capsule surrounding the tube was thin with few chronic inflammatory cells at 30<sup>th</sup>, 60<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> days. The empty tubes were not positive to Von Kossa stain and no birefringent structures were observed under the polarized light (Fig.1 and Fig.2).

## Comparison among the groups

### Day 7

There was no statistically significant difference among the scores of the different groups (median score of 2).

### Day 15

There was statistically difference ( $P < 0.05$ ) between inflammatory cell numbers of the Anglus MTA<sup>®</sup> and the other groups ( $P < 0.05$ ). The median inflammatory cell score for MTA (median score of 1) was lower than the other groups (median score of 2) ( $p < 0.05$ ).

### Day 30

There was statistically difference ( $P < 0.05$ ) between inflammatory cell numbers of the Sealapex<sup>®</sup> and the other groups ( $P < 0.05$ ). The median inflammatory cell score for Sealapex<sup>®</sup> (median score of 2) was higher than the other groups (median score of 1) ( $p < 0.05$ ).

### Day 60 and Day 90

There was not statistically significant difference ( $P > 0.05$ ) among the scores of the different groups (median score of 1).

## **DISCUSSION:**

Polyethylene tubes in subcutaneous implantation method was used in this study since it is one of the most appropriate test to determine the local effects of materials (14,15,16,17,18,19). The reactions to empty tubes in this study caused few reactions in subcutaneous connective tissues. The fibrous capsule surrounding the tube was thin and

inflammatory infiltration subsided after the 30<sup>th</sup> days, which is according to previous reports (16,18,19).

The results observed with CPM Sealer were similar to the Ângelus MTA<sup>®</sup> and Control group. A moderate chronic inflammatory response at 7<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> day, which reduced with time was observed in a thin fibrous connective tissue capsule surrounding the tube. Positive Von Kossa areas and birefringent structures under polarized light were also observed demonstrating that this material stimulated the formation of mineralized tissue in subcutaneous tissue of rats via calcium carbonate formation from the calcium of the material and carbon dioxide from the surrounding tissue (19).

MTA has calcium oxide and calcium phosphate in its formulation. Calcium oxide may react with water or tissue fluids forming calcium hydroxide, which, in contact with water, dissociate in calcium ions and hydroxyl ions. The calcium ions react with the carbon dioxide in the tissues and form calcium carbonate granulations presented as calcite crystals birefringent to polarized light (19), which would stimulate the deposition of hard tissue.

CPM Sealer, according to the manufacturer, has similar or better physical, chemical and biological characteristics compared to MTA, with the same clinical indications. CPM Sealer has similar composition to MTA but with the addition of calcium carbonate aiming to reduce pH after set to 10 limiting the surface necrosis of the adjacent tissue and allowing the alkaline phosphatase. In the present study, it was really not observed extent necrotic areas in close contact with CPM Sealer nor MTA. Moreover, the activity of alkaline phosphatase could be indirectly showed by the formation of mineralized areas once MTA is able to induced premature and enhanced expression of alkaline phosphatase activity for fibroblast populations, which is associated to mineralization (20). CPM Sealer also contains calcium chloride which was

already demonstrated that its addition to MTA reduced the setting time and improved the handling characteristics and the sealability (20,21,22,23,24) with no change in the tissue response (25).

The composition of CPM Sealer can explain the relative difference observed in the tissue response when it was compared to Sealapex<sup>®</sup>, a material properly developed to be used as a sealer and was employed in the present paper as a reference. This sealer exhibited a moderate reaction on the 7<sup>th</sup> and 15<sup>th</sup> days. However, at the 30<sup>th</sup> day, it presented a more intense inflammatory process than the Control and CPM Sealer groups. The response decreased and the fibrous capsule became thinner at the 60<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> days. Moreover, the results of the present study, together with those previously reported, corroborate the promotion of mineralized structures birefringent to polarized light or Von Kossa-positive (26). These calcifications can originate from the calcium oxide present in Sealapex that react with tissue fluids to form calcium hydroxide. The birefringent granulations observed next to Sealapex<sup>®</sup> are probably calcite crystals originating the same way already described (19). These crystals, together with fibronectin can be an initiating step in the formation of a hard tissue barrier (26).

In conclusion, the observed results and the mechanism of action of Endo-CPM-Sealer<sup>®</sup> is very similar to those reported for Sealapex<sup>®</sup> and Ângelus MTA<sup>®</sup>. Other studies are necessary to better analyze the behavior of this material and confirm the observed data.

#### **REFERENCES:**

27. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a Mineral trioxide Aggregate when used as a root end filling material. J Endod 1993; 19: 591-5.

28. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993; 19: 541-4.
29. Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of Mineral Trioxide Aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995; 79: 756-63.
30. Bernabe PF, Holland R, Morandi R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E, Gomes-Filho JE. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. *Braz Dent J* 2005; 16: 149-55.
31. Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol*. 2001 Aug;17(4):163-6.
32. Andelin WE, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. *J Endod*. 2003 Oct;29(10):646-50.
33. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Sep;98(3):376-9.
34. Chacko V, Kurikose S. Human pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA): a histologic study. *J Clin Pediatr Dent* 2006;30:203-9.
35. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995; 21: 349-53.
36. Gomes-Filho JE, de Faria MD, Bernabé PF, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Júnior E, de Moraes Costa MM, Cannon M. Mineral trioxide aggregate but not

- light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. *J Endod* 2008; 34: 62-5.
37. Grossman LI. Physical properties of root canal cements. *J Endon* 1976;2:166-75
38. Matt GD, Thorpe JR, Strother JM, McClanahan SB. Comparative study of white and gray mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one- or two-step apical barrier technique. *J Endod* 2004;30:876 –9.
39. American National Standards Institute/Revised American National Standards Institute American Dental Association Document No. 41. For recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. 1979. New York, NY: Am National Standards Institute.
40. Federation Dentaire International Recommended standart practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International Commission on Dental Materials, Equipment, and Therapeutics. (1980) Part 4.11: Subcutaneous implantation test. *Inter Dental J* 1980; 30: 173–4.
41. Gomes Filho JE, Gomes BPFA, Zaia AA, Novaes PD, Souza Filho FJ. Glycol Methacrylate: An alternative method for embedding subcutaneous implants. *J Endod* 2001; 27: 266-8.
42. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod* 2004; 30: 95-9.
43. Costa CA, Teixeira HM, do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive resins. *J Endod* 2000; 26: 512-6.
44. Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. *Inter Endod J* 2003; 36: 281-7.

45. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999; 25:161-6. .
46. Bonson S, Jeansonne BG, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res* 2004; 83:408-13.
47. Wiltbank KB, Schwartz SA, Schindler WG. Effect of selected accelerants on the physical properties of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *J Endod* 2007; 33: 1235-8.
48. Ber BS, Hatton JF, Stewart GP. Chemical modification of proroot mta to improve handling characteristics and decrease setting time. *J Endod* 2007; 33: 1231-4.
49. Bortoluzzi EA, Juárez Broon N, Antonio Hungaro Duarte M, de Oliveira Demarchi AC, Monteiro Bramante C. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of mineral trioxide aggregate and white Portland cement. *J Endod* 2006; 32: 1194-7.
50. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. *J Endod* 2006; 32: 897-900.
51. Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Consolaro A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernadineli N. Mineral Trioxide Aggregate with or without Calcium Chloride in Pulpotomy. *J Endod*. 2008 Feb;34(2):172-5.
52. Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E, Murata SS. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod* 2002; 28:173-6.

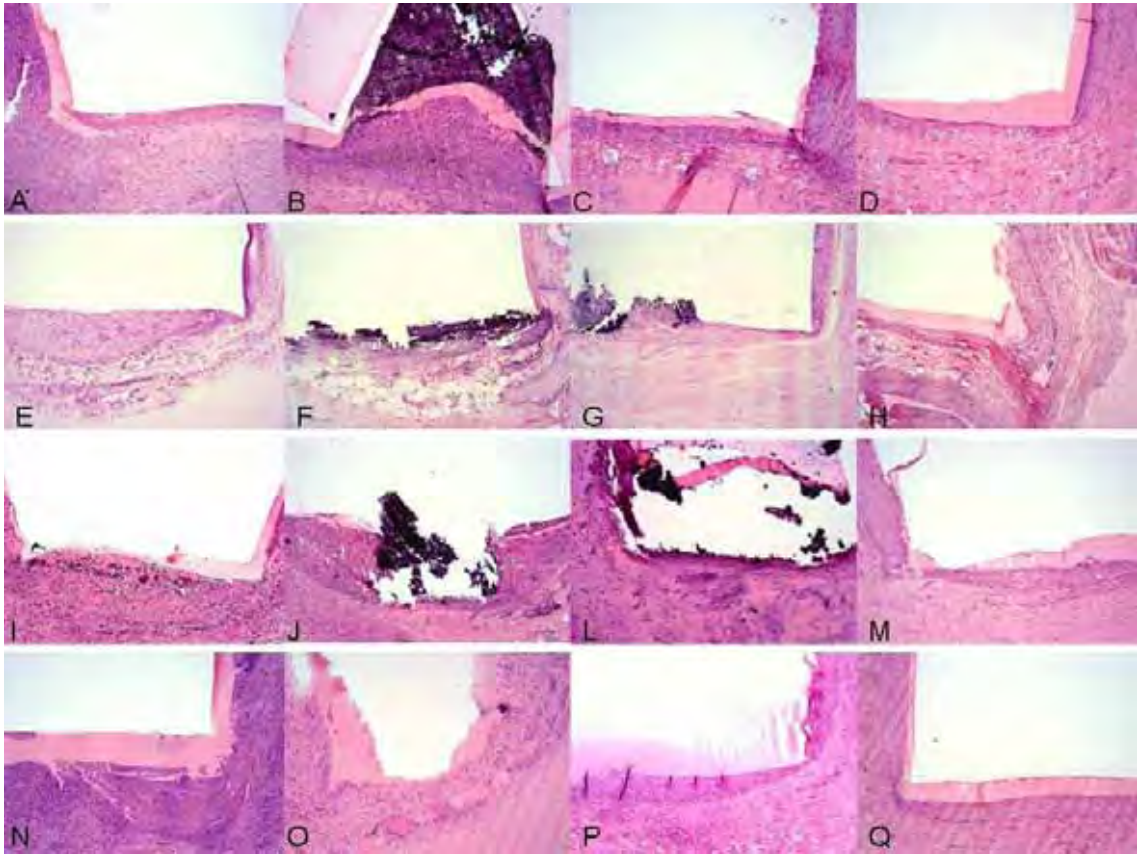
Figura 1. **Sealapex**. (A) formação de cápsula fibrosa espessa e infiltrado celular inflamatório moderado (7 dias, hematoxilina-eosina, 10x). (B) formação de cápsula fibrosa espessa e infiltrado celular inflamatório moderado (30 dias, hematoxilina-eosina, 10x). (C) redução da espessura da cápsula fibrosa e infiltrado celular inflamatório leve (60 dias, hematoxilina-eosina, 10x). (D) cápsula fibrosa fina e infiltrado inflamatório leve (90 dias, hematoxilina-eosina, 10x). **Ângelus MTA**. (E) cápsula fibrosa espessa e infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos (7 dias, hematoxilina-eosina, 10x). (F, G, H) cápsula fibrosa em volta do tubo estava fina com poucas células inflamatórias crônicas (30, 60, 90 dias respectivamente, hematoxilina-eosina, 10x). **CPM Sealer**. (I) cápsula fibrosa espessa e infiltrado celular inflamatório moderado (7 dias, hematoxilina-eosina, 10x). (J, L, M) infiltrado celular inflamatório leve na fina cápsula fibrosa (30, 60, 90 dias respectivamente, hematoxilina-eosina, 10x). **Controle**. (N) infiltrado celular inflamatório crônico moderado e cápsula fibrosa espessa (7 dias, hematoxilina-eosina, 10x). (O, P, Q) redução da espessura da cápsula fibrosa e de células inflamatórias próximas do tubo (30, 60, 90 dias respectivamente, hematoxilina-eosina, 10x).

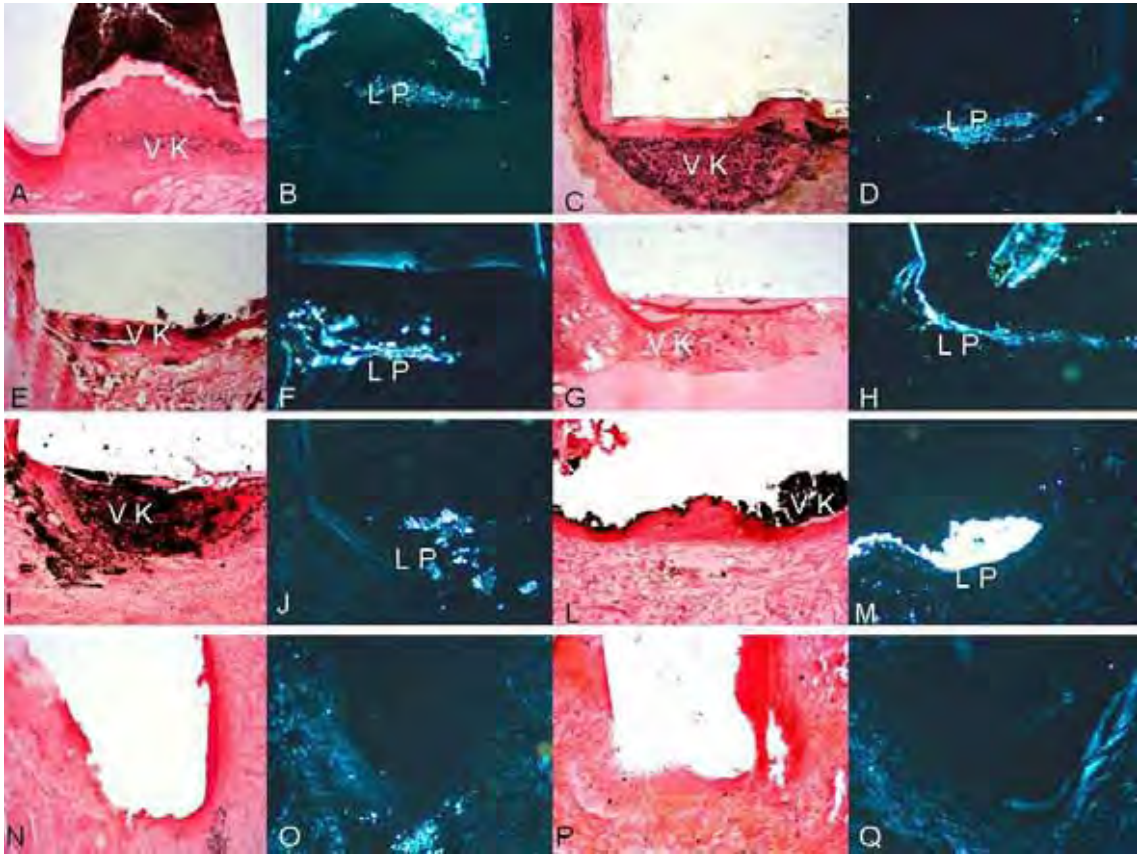
Figura 2. **Sealapex**. (A, C) presença de calcificação distrófica na abertura do tubo (30 e 90 dias respectivamente, Von Kossa, 10x). (B, D) presença de estruturas birrefringentes para luz polarizada (30 e 90 dias respectivamente, luz polarizada, 5x). **Ângelus MTA**. (E, G) presença de calcificação distrófica na abertura do tubo (30 e 90 dias respectivamente, Von Kossa, 10x). (F, H) presença de estruturas birrefringentes para luz polarizada (30 e 90 dias respectivamente, luz polarizada, 5x). **CPM Sealer**. (I, L) presença de calcificação distrófica na abertura do tubo (30 e

90 dias respectivamente, Von Kossa, 10x). (J, M) presença de estruturas birrefringentes para luz polarizada (30 e 90 dias respectivamente, luz polarizada, 5x). **Controle.** (N, P) ausência de calcificação distrófica na abertura do tubo (30 e 90 dias respectivamente, Von Kossa, 10x). (O, Q) ausência de estruturas birrefringentes para luz polarizada (30 e 90 dias respectivamente, luz polarizada, 5x).

MATERIAL	ESCORES				
	0	1	2	3	calcificação
7 dias					
Sealapex	0	0	100	0	100
MTA	0	0	100	0	100
CPM Sealer	0	0	100	0	100
Controle	0	0	100	0	0
15 dias					
Sealapex	0	0	100	0	100
MTA	0	100	0	0	100
CPM Sealer	0	0	100	0	100
Controle	0	0	100	0	0
30 dias					
Sealapex	0	0	100	0	100
MTA	0	100	0	0	100
CPM Sealer	0	90	10	0	90
Controle	0	90	10	0	0
60 dias					
Sealapex	0	90	10	0	90
MTA	0	100	0	0	100
CPM Sealer	0	100	0	0	90
Controle	0	100	0	0	0
90 dias					
Sealapex	0	100	0	0	90
MTA	0	100	0	0	100
CPM Sealer	0	100	0	0	90
Controle	0	100	0	0	0

Percentual das Amostras de Cada Grupo Classificado de Acordo com Escore Inflamatório, Presença de Necrose e Espessura da Cápsula Fibrosa





## ***ANEXO 2***

## **Guidelines for Publishing Papers in the Journal of Endodontics**

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

1. The *JOE* publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the *JOE* has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.

### **2. General Points on Composition**

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

a. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs,

sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c”, below), or sentences with little to no transition within a paragraph.

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

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

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

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

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

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

### **3. General Points on the Organization of Original Research Manuscripts**

a. **Title Page:** The title should describe the major conclusion of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at [www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

b. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe the

new contributions made by this study. The word limitations (150 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.

c. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to provide sufficient detail. However, many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals.

d. **Material and Methods:** The objective of the methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The three components to this section are the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the particular aspects used in the present study. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a commercial product, the manuscript should state that they either followed manufacturer’s protocol or specify any changes made to the protocol. Studies on humans should conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB approved the protocol and that informed consent was obtained. Studies

involving animals should state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis, drop-outs from clinical trials, etc.

e. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (i.e., neither methods nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study. Do not include all available data without justification, any repetitive findings will be rejected from publication. All Figs./Charts/Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings.

f. **Figures:** There are two general types of figures. The first type of figure includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two column-width figure (i.e., about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing on your part given the small size of each panel, you will only be able to illustrate the most important feature of each photomicrograph. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (e.g., "A", "B", etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Chang, et al, (*JOE* 28:90, 2002), Hayashi, et al, (*JOE* 28:120, 2002) and by Davis, et al (*JOE* 28:464, 2002). At the Editor's discretion, color figures may be published at no cost to the authors. However,

the Editor is limited by a yearly allowance and this offer does not include printing of reprints.

The second type of figure are graphs (i.e., line drawings) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

**Tables:** Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not necessary:

<b>% NaOCl</b>	<b>N/Group</b>	<b>% Inhibition of Growth</b>
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100
3	5	100

Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include

***ANEXO 3***



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA RESPOSTA TECIDUAL DE CIMENTOS: COM (CIMENTO PORTLAND MODIFICADO) E SEALAPEX. ANÁLISE MICROSCÓPICA DE IMPLANTES REALIZADOS EM SUBCUTÂNEOS DE RATOS" sob responsabilidade do Prof. Dr. JOÃO EDUARDO GOMES FILHO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 26 de setembro de 2007, de acordo com o protocolo no. 2007-002467.

Aracatuba, 17 de outubro de 2007

  
PROF. DR. CRISTINA ANTONIALI SILVA  
Presidente da CEEA - FEA/UNESP