

Mariana Machado Teixeira de Moraes Costa

Avaliação da reação tecidual frente aos cimentos
MTA Ângelus[®] cinza e um MTA
fotopolimerizável experimental.
Análise microscópica em alvéolos dentários de
ratos.

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia do Campus de Araçatuba –
UNESP, para a obtenção do Grau de
“Doutor em Odontopediatria”

Orientador: Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho

Araçatuba – SP
2008

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C837a

Costa, Mariana Machado Teixeira de Moraes

Avaliação da resposta tecidual frente aos cimentos MTA
Ângelus® cinza e um MTA fotopolimerizável experimental :
análise microscópica de implantes realizados em alvéolos de ratos /
Mariana Machado Teixeira de Moraes Costa. - Araçatuba : [s.n.],
2008

107 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Odontologia, Araçatuba, 2008

Orientador: Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho

1. Cimentos dentários 2. Inflamação 3. Materiais
biocompatíveis

Black D27
CDD 617.645

Dados Curriculares

Mariana Machado Teixeira de Moraes Costa

| | |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nascimento | 10 de fevereiro de 1979 Lapa – PR |
| Filiação | Araken Lisboa de Moraes Costa Thais Machado Teixeira de Moraes Costa |
| 1998-2001 | Curso de Graduação em Odontologia, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, SP. |
| 2002-2003 | Curso de Especialização em Odontopediatria, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, SP. |
| 2003-2005 | Mestrado em Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, SP. |
| 2005-2008 | Doutorado em Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, SP. |

Dedicatória

A DEUS...

“Perto quero estar, junto aos teus pés.

Pois prazer maior não há, que me render e te adorar

Tudo o que há em mim quero te ofertar

mais ainda é pouco eu sei, se comparado ao que ganhei

Não sou apenas servo, teu amigo me tornei

Te louvarei, não importam as circunstâncias

*Adorarei somente a ti **Jesus**”*

(Kelly Carpenter, Toque no altar)



Dedicatória

*Aos meus pais, **Thais e Araken...***

Muito obrigada pelo apoio constante, pelo carinho

e por todo amor e dedicação... Obrigada por tudo o que representam em minha vida !

"Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar." (Bertrand Russell)

*Ao meu noivo **José Otávio...***

Pelo companheirismo, pela compreensão nas ausências

e por todo incentivo, aumentando a minha força a cada dia !

"A ausência diminui as pequenas paixões e aumenta as grandes, da mesma forma que o vento apaga a vela e atiza a fogueira."

(François de La Rochefoucault)

*Ao meu irmão **Rodrigo**, e minhas "irmãs",*

Rosana, Taís, Luciana, Juliana e Julie...

"...mas há um amigo que é mais chegado do que um irmão"

(Provérbios 18:24)

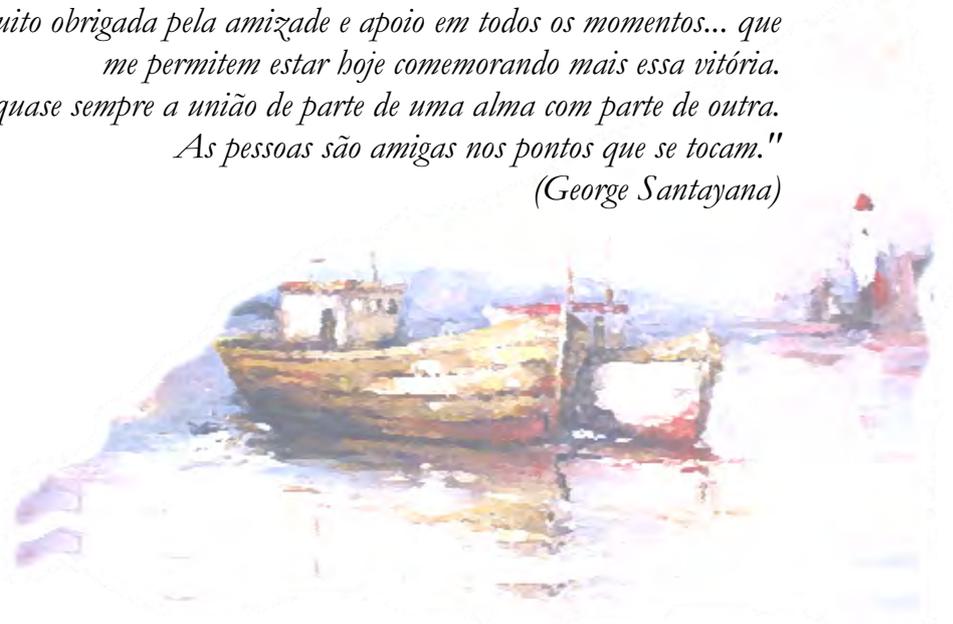
Muito obrigada pela amizade e apoio em todos os momentos... que

me permitem estar hoje comemorando mais essa vitória.

"A amizade é quase sempre a união de parte de uma alma com parte de outra.

As pessoas são amigas nos pontos que se tocam."

(George Santayana)



Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, **Professor Dr João Eduardo Gomes Filho...**

Muito obrigada por toda dedicação, paciência e seriedade com que conduziu este estudo.

Agradeço imensamente pela confiança que depositou em mim e por todas as orientações valiosas neste período de convivência.

*“Um bom professor educa seus alunos para uma profissão,
um professor fascinante os educa para a vida.*

Professores fascinantes são profissionais revolucionários.

Ninguém sabe avaliar o seu poder, nem eles mesmos.

*Eles mudam paradigmas, transformam o destino de um povo
e um sistema social sem armas,*

*tão somente por prepararem seus alunos para a vida
através do espetáculo das suas idéias.”*

Augusto Cury

À **Roberta Okamoto**

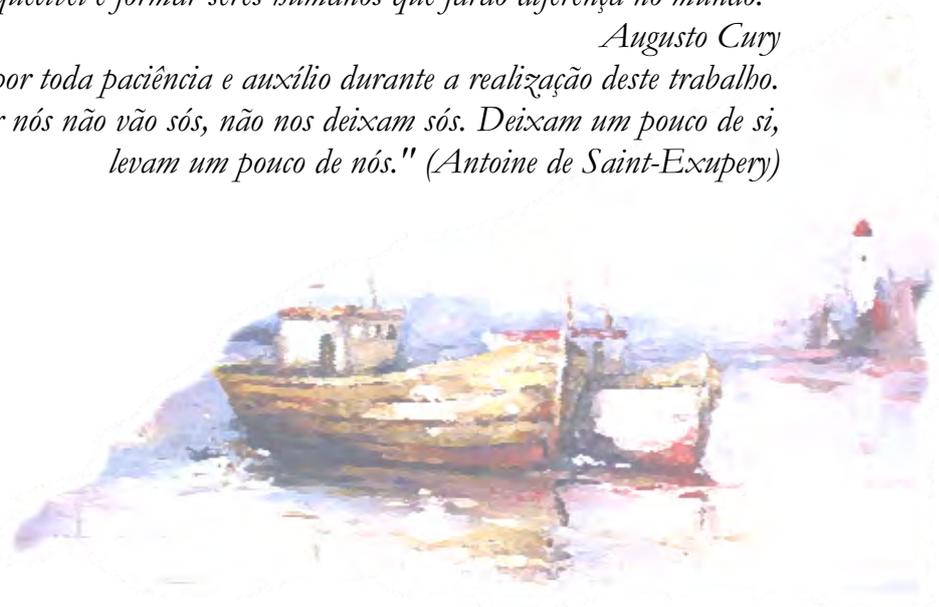
*“Um bom professor é lembrado nos tempos de escola.
um professor fascinante é um mestre inesquecível...*

Ser um mestre inesquecível é formar seres humanos que farão diferença no mundo.”

Augusto Cury

Muito obrigada por toda paciência e auxílio durante a realização deste trabalho.

*"Aqueles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si,
levam um pouco de nós." (Antoine de Saint-Exupéry)*



Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, nas pessoas do **Diretor Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé e Vice-Diretora Prof Dra. Ana Maria Pires Soubhia.**

Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, **Prof. Dr. Célio Percinoto, Profa. Dra. Rosângela dos Santos Nery, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem e Profa. Dra. Sandra Maria Herondina Coelho Ávila de Aguiar,** por todo este longo período de convivência, pelas orientações valiosas e ensinamentos transmitidos.

Aos professores da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, **Prof Dr Roberto Holland, Prof. Dr. Valdir de Souza, Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, Prof. Dr. Dr. Mauro Nery, Prof. Dr. José Arlindo Otoboni Filho e Prof. Dr. Eloi Dezan Junior,** por me receberem da maneira tão especial como fui recebida, pelo carinho e amizade durante o curso.

Ao professor **Tetuo Okamoto,** a minha gratidão pela ajuda durante a realização dos procedimentos cirúrgicos. Muito obrigada pela valiosa ajuda e paciência.

Às funcionárias da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, **Hermelinda de Jesus Pereira Before, Neuza Angélica dos Santos e Neuci Vieira.** Muito obrigada por todo apoio durante a realização deste trabalho e pela convivência agradável e amizade.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP, **Maria dos Santos Ferreira Fernandes e Mário Luis da Silva**, pela ajuda constante, pela dedicação e por apoio neste nosso longo tempo de convívio.

Aos “amigos de longa data” da pós-graduação da Odontopediatria, **Rebeca, Fernanda, Kélio, Karine, Karina Bianco**. Pessoas especiais que tive o prazer de conhecer, por todos os momentos que passamos juntos.

Aos amigos **Karina Mirela, Graciele, Márcio, Carol (Tuca), Janaína, Isabele, Eliana Takeshita, Eliana Rodrigues, Adriana, Carol Lodi, Vanessa e Tatyana**.

Aos que se tornaram meus grandes “amigos de laboratório”, **Alessandra Gomes, Simone, Max, Sueli, Denise, Renata e Alessandra Cury** pela amizade, pelo apoio e pelo excelente convívio durante este período. Grande sucesso a vocês!

A todos os meus colegas de **Pós-graduação da Odontopediatria**, muito obrigada pelos momentos de convivência.

A minha grande amiga **Rosana**, por me ajudar com a formatação da tese. Muito obrigada pelo apoio e amizade!

Aos funcionários da Seção de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, **Marina Midori Sakamoto Hawagoe, Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto e Diogo Reatto** pelo excelente profissionalismo, atenção dispensada e primoroso relacionamento.

Aos funcionários da Biblioteca: **Ana Cláudia Grieger Manzatti, Cláudia de Souza Frare, Cláudio Hideo Matsumoto, Isabel Pereira de Matos, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da Silva Freitas, Jéssica Durbergr, Luzia Anderlini, Maria Cláudia de Castro Benez, Fernando Sukunishi e Cláudio Maciel Júnior**, pela atenção e eficiência que sempre dispensaram.

Aos funcionários do **Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, pelo apoio e auxílio e pela dedicação no tratamento dos animais.

Ao **Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada** por ter me permitido utilizar o biotério e o laboratório, possibilitando a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do **Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo**.

A **CAPES** e ao **CNPq**, pelo apoio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho de pesquisa.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

‘Escute aquela pequena voz que vem de dentro de você.

Se você não vive a sua vida completamente, realizando as metas que julgou importantes, dando sua contribuição única para o mundo, ninguém mais irá fazê-lo. Sua canção morrerá com você.

Muitos de nós já descobriram o que fazer com suas vidas. Nós temos um propósito que ecoa do centro do nosso ser. De algum modo, nossas vidas nunca estarão completas a menos que respondamos a este chamado. Mas nos recusamos...’Aquela vozinha’ sussurra um sonho...Mas, mais tarde, mais dia menos dia, nossa visão começará a desaparecer...imersa na praticidade...

Nós nos arrastamos pelos mais altos caminhos do conformismo, seguindo os outros. Buscamos o que os outros buscam – conforto, segurança, dinheiro, poder, prazer. Não estamos sozinhos, mas somos estranhos para o melhor de nós mesmos. Os anos deixam rugas na pele, mas a perda de entusiasmos deixa rugas na alma. É impossível dizer a alguém que caminho seguir. Somente você, com tranqüilidade e humildade, pode ouvir a pequena voz dentro de você. Sucesso e felicidade não são metas distantes de serem capturadas e mantidas.

Acontecem acidentalmente enquanto você está se realizando.”

Michel Lynberg, The Gift of Giving



Sumário

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Lista de Figuras | 15 |
| Lista de Tabelas | 19 |
| Introdução Geral | 20 |
| Capítulo 1 - Avaliação da resposta tecidual frente aos cimentos MTA Ângelus [®] cinza e um MTA fotopolimerizável experimental. Análise histológica de implantes realizados em alvéolos de ratos. | |
| <i>Resumo</i> | 27 |
| <i>Abstract</i> | 28 |
| Introdução | 29 |
| Proposição | 32 |
| Material e Método | 33 |
| Resultados..... | 38 |
| Discussão | 46 |
| Referências | 51 |
| | |
| Capítulo 2 - Avaliação do processo de reparo frente aos cimentos MTA Ângelus [®] cinza e um MTA fotopolimerizável experimental em alvéolo de ratos utilizando fluorocromos. | |
| <i>Resumo</i> | 57 |
| <i>Abstract</i> | 58 |
| Introdução | 59 |
| Proposição | 61 |
| Material e Método | 62 |
| Resultados..... | 69 |
| Discussão | 78 |
| Referências | 83 |
| | |
| Anexos | 88 |

Lista de Figuras

Capítulo 1

- Figura 1** **30 dias:** (A) Grupo controle, H. E., 10X; (B) Grupo controle, H.E., 40X; (C) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 10X; (D) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 10X; (E) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 10X; (F) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 10X; (G) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 2,5X (H) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 2,5X. 42
- Figura 2** **60 dias:** (A) Grupo controle, H. E., 10X; (B) Grupo controle, H.E., 40X; (C) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 10X; (D) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 10X; (E) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 10X; (F) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 10X; (G) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 2,5X (H) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 2,5X. 43
- Figura 3** **90 dias:** (A) Grupo controle, H. E., 10X; (B) Grupo controle, H.E., 40X; (C) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 10X; (D) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 10X; (E) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 10X; (F) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 10X; (G) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 2,5X (H) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 2,5X. 44

Capítulo 2

- Figura 1 Grupo Controle:** (A) Calceína, 7 dias, 10x; (B) Alizarina 14 dias, 10x; (C) Oxitetraciclina, 21 dias, 10x (D); Sobreposição de A,B e C, 10x (E) H.E., 10x; (F) Coloração de Stevenel's Blue e Alizarin Red, 10x. 73
- Figura 2 Grupo MTA Ângelus® Cinza:** (A) Calceína, 7 dias, 10x; (B) Alizarina 14 dias, 10x; (C) Oxitetraciclina, 21 dias, 10x (D); Sobreposição de A,B e C, 10x (E) H.E., 10x; (F) Coloração de Stevenel's Blue e Alizarin Red, 10x. 74
- Figura 3 Grupo MTA Fotopolimerizável experimental:** (A) Calceína, 7 dias, 10x; (B) Alizarina 14 dias, 10x; (C) Oxitetraciclina, 21 dias, 10x (D); Sobreposição de A,B e C, 10x (E) H.E., 10x; (F) Coloração de Stevenel's Blue e Alizarin Red, 10x. 75
- Figura 4** Avaliação dos fluorocromos nos diferentes grupos experimentais, utilizando a pontuação da Grade de Merz. (*) estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado o fluorocromo com a sobreposição, específico para cada grupo. (#) estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado o fluorocromo de cada grupo com marcador equivalente no grupo controle. 77

Anexos

| | | |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | MTA Ângelus® cinza (Ângelus, Soluções em Odontologia, Brasil)..... | 96 |
| Figura 2 | MTA Fotopolimerizável experimental – (Northwestern University Medical School - Chicago USA – e BISCO) | 96 |
| Figura 3 | Esquema Tubo de polietileno (Abbot Lab. do Brasil Ltda)..... | 96 |
| Figura 4 | Incisivos superiores e inferiores | 97 |
| Figura 5 | Luxação do alvéolo | 97 |
| Figura 6 | Exodontia do incisivo superior direito | 97 |
| Figura 7 | Implante do tubo de polietileno | 97 |
| Figura 8 | Processamento inicial das peças (desidratação, diafanização) | 98 |
| Figura 9 | Inclusão em parafina..... | 98 |
| Figura 10 | Obtenção dos cortes..... | 98 |
| Figura 11 | Coloração das lâminas | 98 |
| Figura 12 | Lâmina com os cortes corados com hematoxilina e eosina | 98 |
| Figura 13 | Microscópio, câmera e Software utilizados para obtenção e avaliação das imagens | 98 |
| Figura 14 | Peça obtida e incluída em metil metacrilato + peróxido de benzoíla a 1%..... | 99 |
| Figura 15 | Calceína (Sigma) e imagem obtida com esse marcador..... | 99 |
| Figura 16 | Alizarina (Sigma) e imagem obtida com esse marcador..... | 99 |
| Figura 17 | Oxitetraciclina (Sigma) e imagem obtida com esse marcador..... | 99 |
| Figura 18 | Esmeril empregado para o desgaste inicial das peça | 99 |
| Figura 19 | lamínulas montadas com óleo mineral Nujol e seladas com esmalte cosmético | 99 |

| | | |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 20 | Ferramenta “arquivo” e abertura das 3 imagens originais..... | 102 |
| Figura 21 | Ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da alizarina para o arquivo da calceína | 102 |
| Figura 22 | Ferramenta selecionar opção “camada”, “estilo de camada”, “opções de mesclagem”, modo de mesclagem: clarear” | 103 |
| Figura 23 | Ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da oxitetraciclina para o arquivo com as imagens da calceína e alizarina sobrepostas. Selecionar opção “camada”, “estilo de camada”, “opções de mesclagem”, “modo de mesclagem: clarear”, para obter a imagem final com as 3 imagens sobrepostas. | 103 |
| Figura 24 | Ilustração da grade de Merz | 104 |

Lista de Tabelas

Capítulo 1

- Tabela 1** Escores relativos à resposta inflamatória para cada grupo e período experimental..... 45
- Tabela 2** Características da cápsula fibrosa e ocorrência de mineralização ou de necrose para cada grupo e período experimental..... 45

Capítulo 2

- Tabela 1** Escores relativos à resposta inflamatória para cada grupo e período experimental..... 77
- Tabela 2** Características da cápsula fibrosa e ocorrência de mineralização ou de necrose para cada grupo e período experimental..... 77

Introdução Geral¹

Devido ao avanço técnico e científico ao longo dos anos, a odontologia vem buscando desenvolver recursos que aperfeiçoem cada vez mais o atendimento ao paciente. Neste sentido, a endodontia também vem sofrendo uma intensa evolução tanto no campo biológico quanto nos procedimentos técnicos, buscando aprimorar as propriedades dos materiais existentes ou o desenvolvimento de novos materiais com características mais adequadas.

Neste sentido, diversos estudos clínicos e laboratoriais vêm sendo realizados para potencializar o índice de sucesso obtido com o tratamento endodôntico, uma vez que está diretamente relacionado não só à execução correta dos procedimentos biomecânicos como também ao emprego de materiais que apresentem propriedades cada vez mais favoráveis.

Os materiais utilizados no tratamento endodôntico, por permanecerem em contato direto com estruturas vitais, precisam ser biocompatíveis para favorecer o processo de reparo apropriado. Desta forma, não devem promover necrose tecidual extensa nem influenciar negativamente as células envolvidas na reparação tecidual, de modo que não atuem como um corpo estranho, induzindo ou perpetuando a injúria tecidual.

Torna-se ainda necessário, que o material de escolha para o tratamento endodôntico, apresente algumas propriedades físico-químicas que o viabilizem

¹ As referências citadas na Introdução Geral estão expostas no ANEXO J

para esse fim, promovendo um selamento marginal efetivo e se mantendo estável na presença de umidade.

Buscando abranger estas características, foi desenvolvido no início dos anos 90, pela equipe de pesquisadores da Universidade de Loma Linda, Califórnia (EUA), o Agregado de Trióxido Mineral (MTA)¹. Atualmente, o MTA encontra-se disponível no mercado odontológico sob os nomes comerciais de MTA ProRoot® (Dentsply), o MTA Angelus® cinza (Ângelus Soluções em Odontologia, Londrina-Pr, Brasil), os quais apresentam características físico-químicas e biológicas semelhantes, além das formulações com modificações como é o caso do CPM (Argentina).

Desde seu desenvolvimento inicial e em função de estar disponível no mercado há um tempo não muito longo, o MTA tem sido alvo de diversos estudos, que utilizam ou empregam metodologias variadas para avaliar melhor suas propriedades, indicações e contra indicações¹⁻²⁸. Estes estudos têm confirmado as características adequadas deste material bem como sua indicação de uso em diversas situações clínicas.

De forma geral, tem-se observado que o MTA apresenta propriedades físico-químicas e biológicas favoráveis, sendo amplamente empregado no tratamento endodôntico. Por outro lado, apesar de suas inúmeras características positivas, este material apresenta algumas dificuldades durante sua manipulação, um tempo de presa demorado e um tempo de trabalho relativamente curto¹⁶, fatores estes que poderiam, por sua vez, desestimular seu uso em algumas situações clínicas.

Neste sentido, com o objetivo de aprimorar algumas características do MTA, um material de composição semelhante, porém fotopolimerizável vem

sendo desenvolvido pela Northwestern University Medical School, de Chicago-USA, em parceria com a empresa de materiais odontológicos Bisco. Sendo assim, o desenvolvimento de um material com características semelhantes ao MTA, mas que apresente uma manipulação mais facilitada permitiria o uso mais freqüente deste cimento no atendimento clínico infantil, bem como no atendimento de adultos.

Por estar em fase experimental e ter sido recentemente desenvolvido, observam-se poucas pesquisas avaliando suas propriedades biológicas^{19, 28}. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a reação tecidual frente ao uso deste novo cimento, empregando-se como modelo experimental o implante, em alvéolo dentários de ratos, de tubos de contendo o MTA fotopolimerizável experimental comparativamente ao MTA Ângelus Cinza. O estudo foi dividido em duas partes, sendo cada uma delas escrita em formato de artigo, como objetivo de tornar o trabalho mais didático e facilitar sua divulgação nos meios de pesquisa.

Em um primeiro momento, os materiais testados foram avaliados histopatologicamente. Num segundo momento, para facilitar a observação da dinâmica do processo de reparação tecidual e da deposição de tecido mineralizado, foi utilizada a injeção de fluorocromos em diferentes períodos de tempo. Assim, este trabalho foi desenvolvido em dois capítulos, cada um ressaltando um dos parâmetros acima mencionados.

O primeiro capítulo, "**Avaliação da resposta tecidual frente aos cimentos MTA Ângelus® cinza e MTA fotopolimerizável experimental: Análise histológica de implantes realizados em alvéolos de ratos**",

apresenta a resposta tecidual avaliada qualitativa e quantitativamente, por meio de análise histológica.

O segundo capítulo, “**Avaliação do processo de reparo frente aos cimentos MTA Ângelus[®] cinza e MTA fotopolimerizável experimental em alvéolo de ratos utilizando fluorocromos**”, apresenta uma metodologia que possibilita a utilização dos fluorocromos como forma de análise da reação tecidual, bem como da deposição de tecido mineralizado, em diferentes períodos pós-operatórios.

Capítulo 1

Avaliação da resposta tecidual frente aos cimentos MTA Ângelus® cinza e MTA fotopolimerizável experimental: Análise histológica de implantes realizados em alvéolos de ratos

Resumo

COSTA, MMTM. **Avaliação da resposta tecidual frente aos cimentos MTA Ângelus[®] cinza e MTA fotopolimerizável experimental: Análise histológica de implantes realizados em alvéolos de ratos.** 2008. 107f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

Para contornar algumas dificuldades de manipulação do agregado de trióxido mineral (MTA) convencional, um MTA fotopolimerizável vem sendo desenvolvido. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta tecidual frente ao uso deste material. Para isso, 57 tubos de polietileno preenchidos com o MTA experimental e o MTA cinza foram implantados em alvéolos de ratos. Como grupo controle, foram implantados tubos vazios. Os animais foram sacrificados após 30, 60 e 90 dias, sendo realizada a análise microscópica dos cortes obtidos e corados com Hematoxilina e Eosina. Foi possível concluir que o MTA fotopolimerizável apresentou uma resposta semelhante ao MTA cinza, caracterizada pela ausência de uma inflamação severa e pela deposição de tecido mineralizado em contato com o material.

Descritores: Agregado de trióxido mineral, inflamação, biocompatibilidade, fotopolimerizável.

Abstract

COSTA, MMTM. **Evaluation of tissue response to MTA Ângelus® Gray and Experimental Light Cured MTA. Microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats.** Araçatuba, 2008. 107p. Thesis (Doctor Degree in Pediatric Dentistry) – Sao Paulo State University.

The aim of this study was to evaluate the tissue reaction to a Light Cured MTA or MTA Ângelus® gray. It was used 57 animals, which were divided in three groups. In the Control Group, empty tubes were inserted into the rat's sockets immediately after extraction. In the other groups, the tubes were filled with Light Cured MTA or MTA Ângelus®. After 30, 60 and 90 days after the implantation, the animals were sacrificed and the right hemi-maxilas were removed and processed in laboratory to analyses on light microscopy, with embedding in paraffin, cut with 6µm thickness and stained with HE. It was possible to conclude that Light Cured MTA presented a similar response when compared to MTA Ângelus®, being characterized by a mild inflammatory response and dystrophic calcifications areas. Despite of a favorable healing process obtained with this new experimental MTA, further studies should be conducted to elucidate these material properties and confirm the present results.

Key-words: Mineral trioxide aggregate, inflammation, biocompatibility, light-cured.

Capítulo 1*

1.1 - Introdução

O tecido pulpar possui uma estreita comunicação com os tecidos periodontais através do forame apical e de ramificações laterais. Desta maneira, possíveis complicações ou acidentes no tratamento endodôntico podem ocasionar perfurações iatrogênicas ou patológicas (devido a um processo de cárie ou reabsorção), as quais devem ser tratadas visando prevenir a infiltração bacteriana, obtendo assim, uma resposta adequada dos tecidos adjacentes. Por ficarem em contato direto com estruturas vitais, os materiais empregados para promover esse selamento devem ser biocompatíveis, não induzindo um processo inflamatório extenso e favorecendo a regeneração dos tecidos envolvidos. No entanto, alguns materiais empregados com este fim têm apresentado desvantagens relacionadas à microinfiltrações, graus variados de toxicidade e à ocorrência de alterações dimensionais quando na presença de umidade (1).

Com o objetivo de proporcionar o selamento dessas comunicações patológicas ou iatrogênicas entre o sistema de canais radiculares e a superfície externa do dente, foi desenvolvido no início dos anos 90, pela equipe de pesquisadores da Universidade de Loma Linda, Califórnia (EUA), o Agregado de Trióxido Mineral (MTA). O MTA apresenta-se como um pó cinza ou branco, composto basicamente por óxido de cálcio, dióxido de silício, óxido férrico, óxido de alumínio, sulfato de cálcio, óxido de magnésio, óxidos de sódio e

*Este texto foi formatado de acordo com as normas do periódico Journal of Endodontics (Anexo B)

potássio, além de outros óxidos minerais e do óxido de bismuto, utilizado para dar radiopacidade ao material (2).

Em relação às suas propriedades físico-químicas, O MTA possui um pH de 10,2, logo após a hidratação com água destilada, o qual aumenta para 12,5 aproximadamente 3 horas após a manipulação. Apresenta tempo de presa em torno de 2 horas e 45 minutos, sendo sua resistência à compressão de 40 MPa, aumentando para 67 Mpa, após 21 dias (3). Por ser um material hidrofílico, suas propriedades não são afetadas quando empregado em manobras cirúrgicas, já que na presença de umidade converte-se em um gel coloidal o qual se cristaliza e sofre ligeira expansão, contribuindo para o selamento biológico de cavidades, de perfurações radiculares e de furca (3).

Em relação à sua resposta biológica, diversos estudos têm demonstrado que o MTA promove uma reação tecidual adequada, caracterizada pela ausência de um processo inflamatório severo (4-8) e ausência de potencial mutagênico (9). Outra característica biológica favorável é sua capacidade osteoindutora (10), através da deposição de granulações de calcita, ao redor das quais há grande condensação de fibronectina, proporcionando adesão e diferenciação celular (11).

Apesar de suas inúmeras características favoráveis, o MTA apresenta algumas dificuldades de manipulação, as quais podem limitar seu uso em diferentes situações clínicas (12). Neste sentido, o desenvolvimento de um material com características semelhantes, mas que viesse a apresentar uma forma de trabalho mais facilitada poderia favorecer o uso mais freqüente do MTA. Buscando suprir estas necessidades, um novo material vem sendo desenvolvido, com o objetivo de manter as propriedades originais do MTA,

porém apresentando uma manipulação mais facilitada. Este cimento é fotopolimerizável, sendo constituído por partículas de resina hidrofílica biocompatível e ingredientes ativos do MTA.

Apesar deste material experimental aparentemente apresentar características positivas, não existem muitos estudos avaliando suas propriedades biológicas, uma vez que foi recentemente idealizado (13). Desta forma, torna-se necessário a realização de algumas pesquisas, empregando diferentes metodologias, com o intuito de elucidar a reação tecidual frente ao emprego deste MTA fotopolimerizável.

1.2 - Proposição

O objetivo do presente estudo foi avaliar a reação tecidual frente ao uso do MTA fotopolimerizável experimental, em alvéolo de ratos, comparando-o com o MTA Ângelus[®] cinza.

1.3 – Material e Método

Animais

Para realização deste trabalho foram utilizados 57 ratos machos (*Rattus, norvegicus, albinus, Wistar*), com idades aproximadas de 90 dias, pesando aproximadamente 350g. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), ração sólida e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 12 horas pré e pós-operatórias. Previamente ao início do experimento, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal, o qual foi aprovado (CEEA – FOA/UNESP - protocolo nº 49/05 – ANEXO A).

Materiais

Foram empregados os cimentos MTA Ângelus® cinza (Ângelus Soluções em Odontologia, Londrina-Pr, Brasil) e um cimento MTA fotopolimerizável em fase experimental (Bisco) – (Figura 1 e 2 - ANEXO C).

Segundo informações dos idealizadores, este cimento experimental é composto de AeroSil (8.0%), uma resina hidrofílica biocompatível (42.5%), componentes ativos do MTA (44.5%), Sulfato de Bário (5%). A composição desta resina é, basicamente, BisGMA (20%), resina biocompatível – FDA (77,25%), um agente modificador (2,4%), um agente iniciador (0,32%) e uma gente para estabilizar o iniciador (0.032%).

Tubos de Polietileno

Foram empregados 57 tubos de polietileno (Abbot Lab. Do Brasil Ltda, São Paulo). com 1,0 mm de diâmetro interno, 1,6 mm de diâmetro externo e 3,0 mm de comprimento, os quais foram esterilizados em óxido de etileno (Figura 3 - ANEXO C). Uma extremidade do tubo foi selada com guta-percha aquecida (Hygenic – DFL, Akron, OH – USA), em uma extensão de 1mm. Os materiais foram introduzidos na outra extremidade do tubo, preenchendo os 2mm restantes e ficando rentes à superfície externa. Para o Grupo Controle foi empregado o tubo vazio, com uma das extremidades seladas com guta-pecha.

Procedimento Cirúrgico (ANEXO D)

Em cada animal foi realizada a injeção intramuscular de sedativo à base de xilazina (Dopaser, Calier S.A. - Barcelona, Espanha – 10mg/Kg) e de anestésico à base de Cloridrato de Ketamina a 5% (Vetanarcol, König S. A. – Avellaneda, Argentina – 25mg/Kg). Posteriormente foi realizada a anti-sepsia com gaze embebida em PVPI (Povidini tópico- Johnson & Johnson Ind. Com. Ltda.) na porção anterior da maxila e, internamente, em toda a região próxima ao alvéolo dentário direito da maxila.

Com auxílio de um esculpador tipo Hollembach (#3), foi realizada a sindesmotomia ao redor de todo o dente de forma a preservar a margem gengival. Utilizando-se um instrumental especial (14), o qual foi introduzido entre o dente e a cortical óssea alveolar, luxando-se o alvéolo e, posteriormente, utilizando outro instrumento adaptado para este fim, extraindo-se o dente (14). A contenção da hemorragia foi contida com auxílio de gaze.

Os tubos apresentavam uma extremidade selada com guta-percha e a outra extremidade preenchida com o material avaliado, ficando rente à superfície externa do tubo. O uso da guta-percha teve o objetivo de impedir que o material obturador se deslocasse no momento da introdução do tubo, servindo também como anteparo para posicionar o tubo no alvéolo. O MTA Ângelus® cinza foi manipulado de acordo com as orientações dos fabricantes e imediatamente antes do implante, evitando-se assim que ocorresse a presa antes de sua implantação. O MTA fotopolimerizável experimental foi inserido no tubo diretamente, através do auxílio das pontas descartáveis de alumínio e, posteriormente, fotopolimerizado por 60 segundos (Ultra Lux Eletronic Dabi Atlante, Ribeirão Preto – Brasil). Para implantação dos tubos no alvéolo, foi utilizada uma pinça reta, buscando inseri-los no primeiro terço alveolar. O material obturador permaneceu voltado para o fundo do alvéolo.

Após a implantação dos tubos foi realizada a aproximação as margens gengivais e a sutura com pontos simples utilizando fios de seda 4.0 montados em agulha atraumática (Ethicon Johnson & Johnson Ind. Com. Ltda.).

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 3 grupos, de acordo com os materiais a serem testados, sendo utilizado como controle o implante dos tubos vazios. Cada grupo experimental foi composto por 21 animais e o Grupo Controle por 15 animais, sendo cada um deles dividido nos períodos pós-operatórios de 30, 60 e 90 dias.

Obtenção das peças

Passado os períodos experimentais, os animais foram sacrificados através de uma sobredose anestésica (Cloridrato de Ketamina). Posteriormente, foi removida toda a pele correspondente à face direita do animal, sendo realizados dois cortes com tesoura na região do ângulo da boca, para promover a separação da maxila e da mandíbula.

Com auxílio de uma lâmina intercambiável nº 15 (B-D-Becon Dickinson Ind. Cirúrgica Ltda.) montada em cabo de bisturi, foi realizada uma incisão no palato do animal, ao longo do plano sagital mediano, acompanhando a sutura intermaxilar. Desta maneira foram separadas maxila direita e esquerda. Foi obtido um outro corte, tangenciando a face distal dos molares superiores direitos, para obtenção da hemimaxila direita contendo o alvéolo dentário com o tubo implantado. Foi realizada a remoção de todo excesso de tecido muscular da parte externa da peça e, internamente, a limpeza preservando o septo nasal. Posteriormente, as peças foram radiografadas, para identificação de alvéolos onde os tubos pudessem ter sido expulsos.

Processamento Laboratorial (ANEXO E)

As hemimaxilas foram colocadas em tubos individuais contendo solução de formalina a 10%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 48 horas e, posteriormente, lavadas por um período de 5 horas para remoção da solução fixadora. As peças foram desmineralizadas com solução de EDTA a 18%, até que uma agulha fina pudesse ser introduzida no espécime sem encontrar nenhuma resistência. Após serem lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina, as peças foram

seccionadas longitudinalmente, em cortes com espessura de 6 μ m. Para cada espécime foram obtidas 10 lâminas com 5 cortes teciduais em cada, sendo coradas com Hematoxilina e Eosina (15). Os cortes teciduais foram analisados microscopicamente, tabulados e submetidos a análise estatística.

Análise dos resultados

A análise foi realizada com auxílio de um microscópio binocular (Leica, Alemanha), sendo os resultados expostos por meio de uma análise descritiva e outra quantitativa.

A análise quantitativa da resposta inflamatória foi realizada graduando a importância dos fenômenos microscópicos observados separadamente, sendo atribuídos escores de 0 a 3 (13,16-18). O escore zero significa ausência de resposta inflamatória, 1 significa uma resposta inflamatória leve (< 25 células e de 1 a 5 vasos sanguíneos na embocadura), 2 significa uma resposta moderada (25 até 125 células e de 6 a 10 vasos sanguíneos na embocadura) e 3 significa uma resposta severa (> 125 células e desorganização do tecido e mais que 10 vasos sanguíneos na embocadura). A cápsula fibrosa foi considerada fina quando < 150 μ m e espessa quando > 150 μ m. A presença de necrose bem como a formação de calcificação em contato com o material testado foi registrada como presente ou ausente. Os dados foram tabulados e submetidos a análise estatística, através do Teste de Kruskal Wallis (Graph Prism 3.0), sendo considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

1.4 - Resultados

Foi possível observar através das análises qualitativa e quantitativa a dinâmica da reação tecidual e a deposição de tecido mineralizado frente aos materiais testados, durante os períodos de 30, 60 e 90 dias.

Análise Qualitativa

Grupo Controle (tubos vazios)

Aos 30 dias, foi possível observar junto à embocadura do tubo um tecido conjuntivo com alguns macrófagos e linfócitos e a presença de fibroblastos jovens. Observou-se também a organização do fibrosamento de características capsulares em todos os espécimes. Não foram observadas áreas de deposição de tecido mineralizado próximas à embocadura do tubo (Figura 1 A/B).

Aos 60 dias foi possível observar, junto à embocadura do tubo, um tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório e presença de fibroblastos, sendo a resposta tecidual relacionada a um processo de reparo mais avançado do que aquela observada aos 30 dias. Também não foram observadas áreas de deposição de tecido mineralizado próximas à embocadura do tubo (Figura 2 A/B).

Aos 90 dias, foi observada, junto à embocadura do tubo, ausência de infiltrado inflamatório e a presença de um tecido conjuntivo bem organizado. Também não foram observadas áreas de deposição de tecido mineralizado próximas à embocadura do tubo (Figura 3 A/B).

Nos períodos de 60 e 90 dias, foi observado um tecido conjuntivo densamente organizado e de um trabeculado ósseo neo formado, nos terços médio e apical, característicos do processo de reparo próprio do alvéolo.

Grupo MTA Ângelus® cinza

Aos 30 dias observou-se uma leve resposta inflamatória crônica, caracterizada pela presença de um infiltrado inflamatório mononucleado e por fibroblastos intercalados à matriz extracelular. Foi possível observar a organização do fibrosamento de características capsulares em todos os espécimes. Na maioria dos espécimes, foi possível observar a presença de um tecido mineralizado neoformado em contato com o material (Figura 1C/D).

Aos 60 dias foi observada uma diminuição na resposta inflamatória, sendo o infiltrado inflamatório praticamente ausente na maioria dos espécimes. O tecido conjuntivo subjacente ao material apresentou um processo de reorganização tecidual mais avançado do que o observado aos 30 dias, sendo também possível observar a presença de um tecido mineralizado neoformado em algumas regiões em contato com o material, em todos os espécimes avaliados (Figura 2C/D).

Aos 90 dias foi observada ausência de infiltrado inflamatório e presença de tecido ósseo neoformado em contato com o material em quase todos os espécimes avaliados (Figura 3C/D).

De maneira semelhante ao observado no grupo controle, foi possível observar no período de 30 dias, na região localizada entre o tubo e o fundo do alvéolo, um tecido conjuntivo densamente organizado e colagenizado. Em alguns espécimes foi observado um tecido ósseo neoformado caracterizado

pela presença de trabéculas mais finas (Figura 1G). Aos 60 e 90 dias, este trabeculado se mostrava mais espesso quando comparado ao período inicial, caracterizando a formação de um tecido mais maduro (Figura 2G e 3G). Junto ao fundo do alvéolo, foi possível observar um tecido ósseo neoformado caracterizado pela presença de um trabeculado ósseo mais espesso do que na região intermediária, sendo que este tecido apresentou um maior grau de organização nos períodos finais, caracterizando o processo de reparo próprio do alvéolo (Figuras 1G, 2G e 3G).

Grupo MTA Fotopolimerizável

Aos 30 dias observou-se, subjacente ao material, um processo de reorganização tecidual, caracterizado pela presença de um tecido conjuntivo bem estruturado, demonstrando sua celularidade e matriz extracelular bem distribuídos (Figura 1E/F). A maioria dos espécimes apresentou resposta inflamatória leve ou ausência de infiltrado inflamatório. Foi possível observar a organização do fibrosamento de características capsulares em todos os espécimes. Apenas dois espécimes não demonstraram a presença de tecido mineralizado neoformado em contato com o material.

Aos 60 dias, o tecido conjuntivo subjacente ao material apresentou um processo de reorganização tecidual mais avançado do que o observado aos 30 dias (Figura 2E/F). Foi possível observar, na maioria dos espécimes, uma ausência de infiltrado inflamatório e somente em um caso não foi possível observar a presença de um tecido mineralizado neoformado em contato com o material.

Aos 90 dias no tecido próximo à embocadura do tubo não foi observado infiltrado inflamatório, estando presente um tecido ósseo neoformado mais maduro, em todos os espécimes (Figura 3E/F).

Semelhante ao observado nos Grupos Controle e MTA Ângelus® cinza foi possível observar, aos 30 dias e na região localizada entre o tubo e o fundo do alvéolo um tecido conjuntivo densamente organizado e colagenizado e presença de um trabeculado ósseo neoformado (Figura 1H). Aos 60 e 90 dias, este trabeculado se mostrava mais espesso quando comparado ao período inicial (Figura 2H e 3H). Junto ao fundo do alvéolo, foi possível observar um tecido ósseo neoformado mais espesso e com maior grau de organização do que na região intermediária, caracterizando o processo de reparo próprio do alvéolo (Figuras 1H, 2H e 3H).

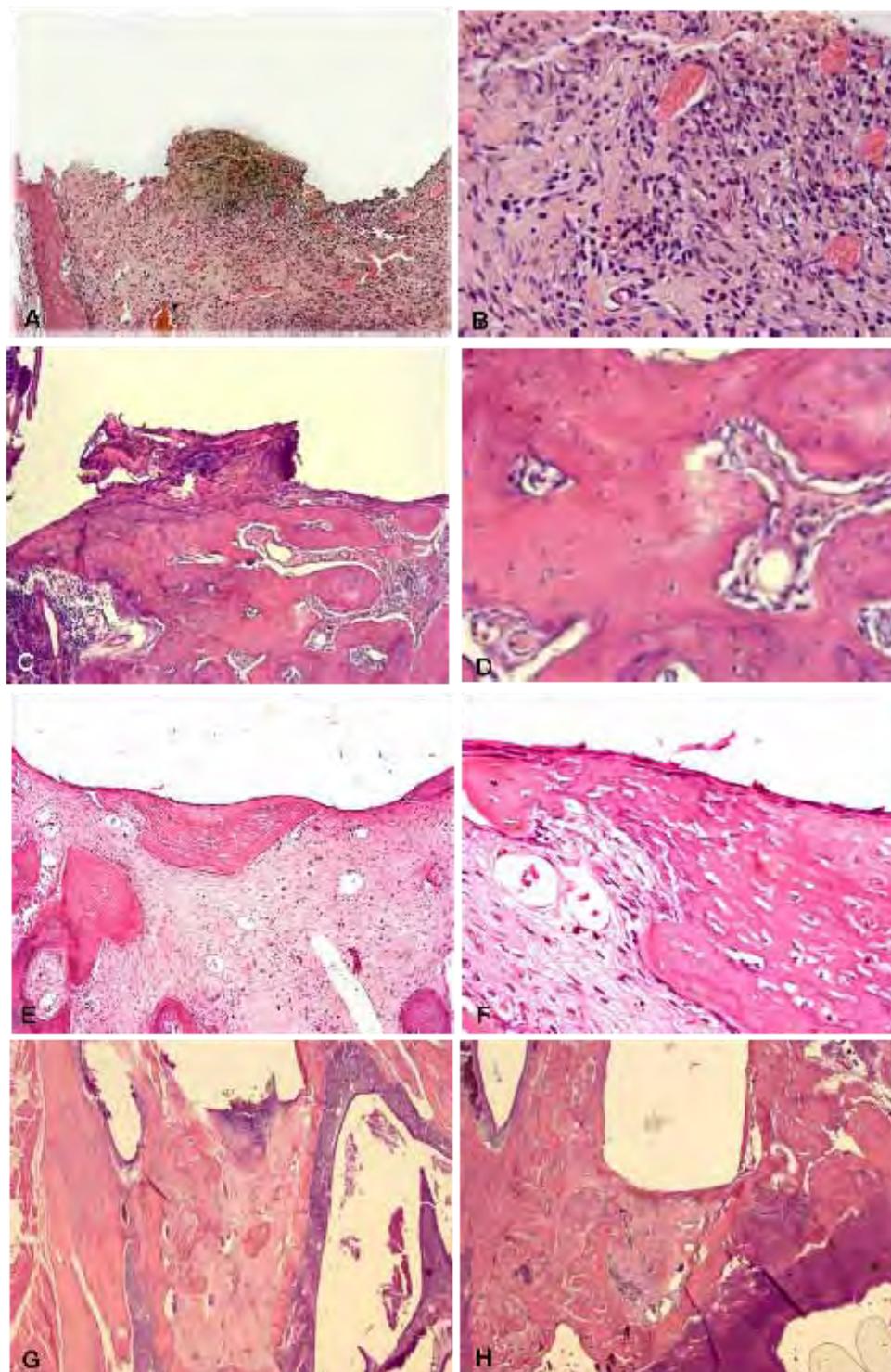


Figura 1 – 30 dias: (A) Grupo controle, H.E., 10X; (B) Grupo controle, H.E., 40X; (C) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 10X; (D) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 10X; (E) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 10X; (F) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 10X; (G) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 2,5X (H) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 2,5X.

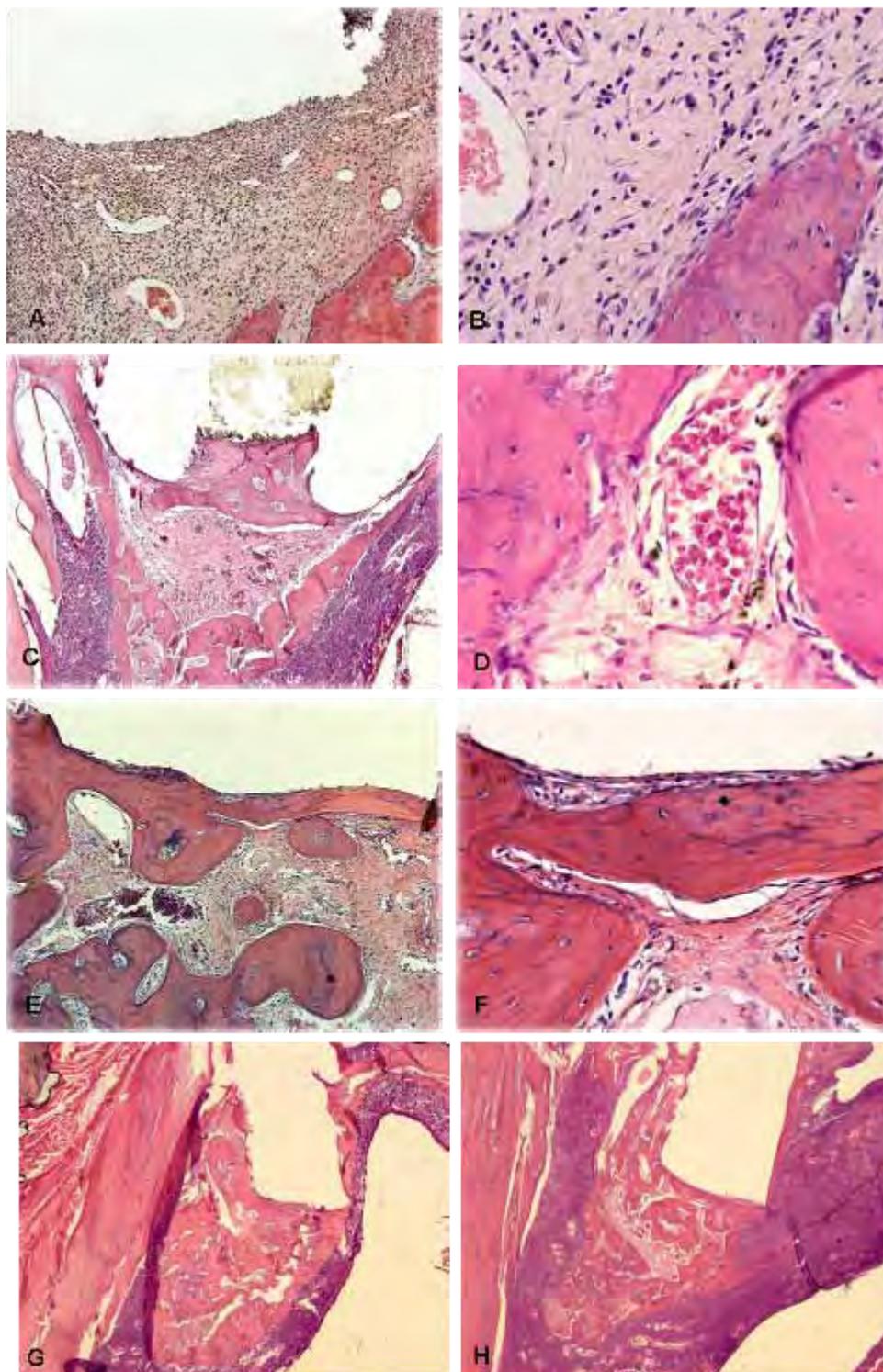


Figura 2 – 60 dias: (A) Grupo controle, H.E., 10X; (B) Grupo controle, H.E., 40X; (C) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 10X; (D) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 10X; (E) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 10X; (F) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 10X; (G) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 2,5X (H) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 2,5X.

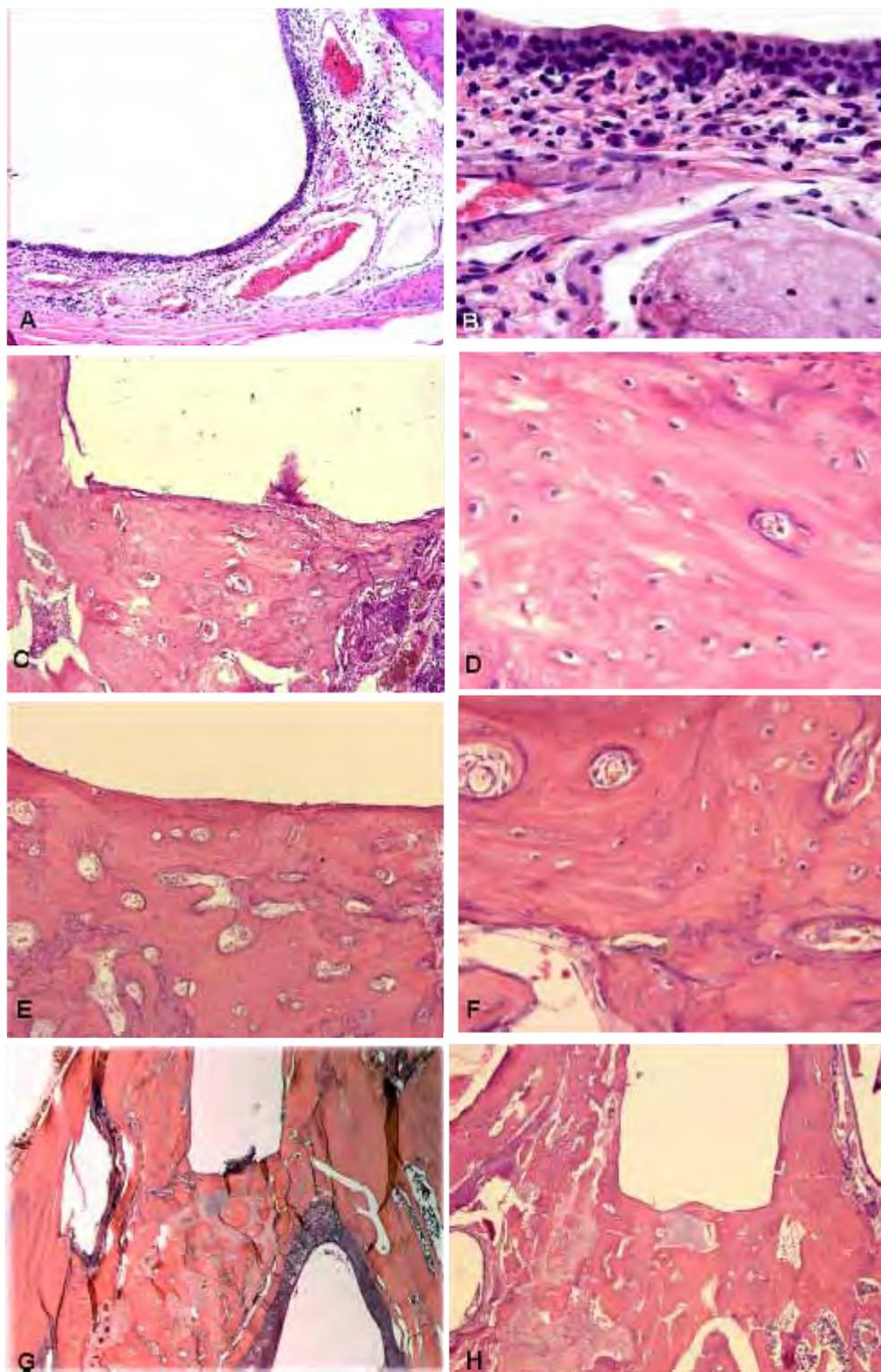


Figura 3 – 90 dias: (A) Grupo controle, H.E., 10X; (B) Grupo controle, H.E., 40X; (C) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 10X; (D) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 40X; (E) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 10X; (F) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 10X; (G) Grupo MTA Ângelus® Cinza, H.E., 2,5X (H) Grupo MTA Fotopolimerizável, H.E., 2,5X.

Análise Quantitativa

O MTA Fotopolimerizável apresentou uma resposta tecidual semelhante àquela observada para o MTA Ângelus® cinza, não sendo observada nenhuma diferença estatística entre os 3 grupos, nos diferentes períodos experimentais ($p= 0,3679$). Estes dados podem ser observados na tabela 1. Quanto às características da cápsula fibrosa, presença de mineralização ou de necrose, os resultados observados no presente estudo estão expressos na tabela 2.

Tabela 1 – Escores relativos à resposta inflamatória para cada grupo e período experimental.

| Escore | Controle | | | MTA Ângelus® cinza | | | MTA Fotopolimerizável | | |
|--------|----------|---------|---------|--------------------|---------|---------|-----------------------|---------|---------|
| | 30 dias | 60 dias | 90 dias | 30 dias | 60 dias | 90 dias | 30 dias | 60 dias | 90 dias |
| 0 | 0/5 | 3/5 | 4/5 | 0/7 | 3/7 | 6/7 | 2/7 | 4/7 | 6/7 |
| 1 | 4/5 | 2/5 | 1/5 | 5/7 | 4/7 | 1/7 | 3/7 | 3/0 | 1/7 |
| 2 | 1/5 | 0/5 | 0/5 | 2/7 | 0/7 | 0/7 | 2/7 | 0/7 | 0/7 |
| 3 | 0/5 | 0/5 | 0/5 | 0/7 | 0/7 | 0/7 | 0/7 | 0/7 | 0/7 |

Tabela 2 – Características da cápsula fibrosa e ocorrência de mineralização ou de necrose para cada grupo e período experimental.

| Período (dias) | | Controle | | | | | | MTA Ângelus® cinza | | | | | | MTA Fotopolimerizável | | | | | |
|-----------------|----------|----------|-----|----|-----|----|-----|--------------------|-------|----|-----|----|-----|-----------------------|-------|----|-----|----|-----|
| | | 30 | | 60 | | 90 | | 30 | | 60 | | 90 | | 30 | | 60 | | 90 | |
| | | f | % | f | % | f | % | f | % | f | % | f | % | f | % | f | % | f | % |
| Cápsula Fibrosa | <150µm | 2 | 40 | 2 | 40 | 5 | 100 | 3 | 42,86 | 7 | 100 | 7 | 100 | 5 | 71,43 | 7 | 100 | 7 | 100 |
| | >150 µm | 3 | 60 | 3 | 60 | 0 | 0 | 4 | 57,14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 28,57 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Mineralização | ausente | 5 | 100 | 4 | 80 | 5 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 28,57 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | presente | 0 | 0 | 1 | 20 | 0 | 0 | 7 | 100 | 7 | 100 | 7 | 100 | 5 | 71,43 | 7 | 100 | 7 | 100 |
| Necrose | ausente | 5 | 100 | 5 | 100 | 5 | 100 | 6 | 85,71 | 7 | 100 | 7 | 100 | 6 | 85,71 | 7 | 100 | 7 | 100 |
| | presente | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 14,29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 14,29 | 0 | 0 | 0 | 0 |

1.5 - Discussão

Diversos métodos de avaliação da biocompatibilidade de materiais odontológicos vêm sendo empregados em dentes de animais (11), em tecido subcutâneo de ratos (4, 5, 7, 13, 17-21), alvéolo dentário de ratos (6, 14, 22) e em cultura de células (23, 24).

O uso do alvéolo dentário de ratos como modelo experimental vem sendo empregado (6, 14, 22), mostrando-se um local adequado para a realização de estudos comparativos. Neste sentido, desperta particular interesse uma vez que a organização do coágulo e a presença de restos do ligamento periodontal são fundamentais para o processo de reparo em feridas de extração dentária (6, 14, 22). Outro ponto positivo desta metodologia é a possibilidade de se observar neoformação conjuntiva ou mineralizada, em contato direto com o material (6, 14, 22). Desta forma, a despeito de uma cronologia de reparo alveolar e de uma resistência diferente por parte do animal, este modelo experimental pode ser considerado para simular situações que poderiam ocorrer em seres humanos.

O modelo experimental proposto inicialmente consiste do implante dos materiais teste diretamente no interior do alvéolo dentário após a exodontia. No entanto, com o objetivo de diminuir possíveis variações nos resultados, os materiais avaliados foram contidos em tubos de polietileno, modelo este amplamente aceito para testes de biocompatibilidade (5-7, 13, 16-21, 25, 26). Dados da literatura demonstram que estes tubos induzem uma resposta do tecido conjuntivo caracterizada pela presença de uma cápsula fibrosa não infiltrada, de pequena espessura, apresentando fibras colágenas e células

dispostas paralelamente à superfície, demonstrando a biocompatibilidade deste material (5-7, 13, 16-21). Em alguns casos também é possível observar o crescimento de tecido conjuntivo para o interior do tubo (19). Ainda é válido ressaltar que com o emprego destes tubos tornou-se possível a padronização da quantidade do material a ser avaliado, da superfície de contato deste material com os tecidos vitais, bem como evitar a ocorrência de um trauma mecânico, o qual geralmente ocorre quando o material é inserido sob pressão.

Em relação aos resultados observados no presente estudo, foi possível observar que no Grupo Controle, representado pela implantação dos tubos vazios, ocorreu uma resposta inflamatória leve no período inicial, a qual diminuiu nos períodos de 60 e 90 dias. Este quadro, associado à deposição de tecido ósseo na região intermediária e junto ao fundo do alvéolo, caracterizaram um processo de reparo adequado na região alveolar, semelhante ao observado na literatura (5-7, 13, 17-21). Na maioria dos espécimes foi observada ausência de tecido ósseo em contato com o tubo e a ocorrência de um crescimento de tecido conjuntivo em seu interior, ao observado em outros estudos (5-7, 13, 17-21).

Em relação ao Grupo MTA Ângelus® cinza, foi possível observar uma resposta tecidual favorável aos 30 dias, caracterizada pela presença de uma inflamação tecidual leve, sendo este quadro inflamatório praticamente ausente aos 60 e 90 dias. A presença de tecido mineralizado em contato direto com o material foi observada no período de 30 dias, sendo observada uma maior organização deste tecido ósseo neoformado aos 60 e 90 dias. Estes resultados são semelhantes ao observados na literatura (5-7, 13, 18), onde é possível observar que o MTA é um material que não promove uma resposta inflamatória

severa e favorece a formação de calcificações distróficas, em contato direto com o material.

Este processo de calcificação é estimulado, uma vez que o óxido de cálcio presente no MTA, quando em contato com a água, seria convertido em hidróxido de cálcio o qual, em contato com os fluidos teciduais, se dissociaria em íons cálcio e hidroxila (4). Os íons cálcio, reagindo com o dióxido de carbono dos tecidos, dariam origem às granulações de calcita, gerando o acúmulo de fibronectina, que por sua vez propiciaria a migração, adesão e diferenciação celular, com conseqüente formação de tecido duro. Essa proteína, a fibronectina, é produzida por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais e pertence a um grupo de moléculas responsáveis pela migração, adesão e diferenciação de células pulpares e periodontais, as quais sintetizam e depositam colágeno tipo I, dando origem à matriz extracelular. Ela também pode influenciar na diferenciação de células pulpares em odontoblastos, ou células do periodonto, em cementoblastos, responsáveis principais pela deposição de minerais (4, 10, 23, 24, 27).

O MTA Fotopolimerizável induziu reações bastante semelhantes ao MTA Ângelus® cinza durante o processo de reparo. A resposta tecidual foi bastante favorável, sendo caracterizada por uma inflamação suave, pela organização do tecido conjuntivo subjacente ao material e pela deposição de tecido mineralizado próximo ao material experimental. Empregando-se este mesmo material experimental em tecido subcutâneo de ratos, foi observada uma resposta biológica semelhante àquela obtida no presente estudo, contudo, sem estimular a formação de tecido mineralizado (13). Esta diferença nos resultados provavelmente está relacionada ao emprego de

modelos experimentais diferentes, com peculiaridades anatômicas, funcionais e processos de reparo distintos.

Em oposição ao observado no presente estudo, o que tem sido relatado na literatura é que as resinas compostas têm se mostrado moderadamente tóxicas quando estudadas *in vivo* e *in vitro* (28-30). A molécula de Bis-GMA, principal componente destes compostos resinosos é facilmente solubilizada (29, 30) e pode promover uma interação do componente adesivo com os tecidos vitais (29). Outros fatores, descritos na literatura que podem aumentar a ação irritante das resinas compostas é a presença de monômeros superficiais não polimerizados sobre o material resinoso, causado pela inibição da reação local exercida pelo oxigênio ou pela deficiência na completa polimerização da resina por reduzida intensidade de luz do fotopolimerizador ou curto tempo de aplicação de luz visível sobre o material (28-31). Neste sentido, estabeleceu-se no presente estudo um padrão de inserção e de polimerização do MTA fotopolimerizável com o objetivo de evitar possíveis alterações nos resultados. Sendo assim, o material foi implantado no tubo com incrementos de 2 mm, sendo polimerizado pelo tempo de 60 segundos com uma intensidade mínima de luz de 400mw/cm², para que ocorresse uma polimerização uniforme (31).

Neste sentido, o que pode explicar a resposta deste MTA experimental, no presente estudo, é o fato deste material ser constituído por uma resina hidrofílica considerada biocompatível a qual não induziria um quadro inflamatório severo e a presença de tecido ósseo neoformado em contato com o material. Ainda neste sentido, pelo fato de ser polimerizável e tomar presa imediatamente, este material pode ter favorecido uma melhor estabilidade do tubo no interior do alvéolo e, conseqüentemente, o processo de reparo.

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que o MTA fotopolimerizável apresentou características favoráveis, tanto em relação à sua resposta biológica, como à sua manipulação mais facilitada. No entanto, apesar dos excelentes resultados observados com este cimento experimental, torna-se necessário a realização de outros estudos, empregando metodologias variadas, como objetivo de esclarecer ainda mais as propriedades biológicas deste material, confirmando assim, a sua fácil aplicação clínica.

1.6 - Referências

- 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 Torabinejad M, Hong CU, Mc Donald F, Pitt Ford TF. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. J. Endod.1995; 21:349-53.
- 5 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.
- 6 Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. J Endod. 2004;30:95-9.
- 7 Cintra LT, Moraes IG, Estrada BP, 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. Epub 2006 Apr 4
- 8 Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine. J Endod 2006;32:1094-6.
- 9 Bernabé PFE, Gomes-filho JE, Rocha WC, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan-Junior E. Histological evaluation of MTA as a root-end filling material. Int Endod J 2007; 40:758-765.
- 10 Kettering JD, Torabinejad M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. J Endod 1995; 21:537-42.

- 11 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.
- 12 Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of dog's teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. *J Endod* 1999; 25:728-30.
- 13 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.
- 14 Gomes-Filho JE, Faria MD, Bernabé PFE, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E, Costa MMTM, Cannon M. Mineral Trioxide Aggregate but not Light-Cure Mineral Trioxide Aggregate Stimulated Mineralization. *J Endod* 2008; 34(1): 62-5.
- 15 Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odont Araçatuba* 1973; 2:153-69.
- 16 Lillie RD. *Histopathologic technique and practical histochemistry.* New york, Blakinston, 2a ed. 501p, 1954.
- 17 Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Fédération Dentaire International, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. *Int Dent J.* 1980;30:140-88.
- 18 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.
- 19 Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod* 2004;30:95-9.
- 20 Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1996; 21:379-87.

- 21 Gomes-Filho JE, Gomes BPFA, Zaia AA, Ferraz CR, Spuza-Filho FJ. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers using subcutaneous implants. *J Appl Oral Sci.* 2007;15(3):186-94.
- 22 Olsson B. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod* 1981; 7:355-69.
- 23 Padovan LE, Okamoto T, Rezende MC, Curvêllo VP, Nicolielo D, Matsumoto MA. Fibrin adhesive implant in wound healing repair of dental sockets with topical application of epsilon aminocaproic acid: histological analysis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;73:209-13.
- 24 Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, Ito K. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J* 2006; 39:415-22.
- 25 Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *J Endod* 2007;33:836-9.
- 26 Council on dental material and devices. American dental association. Recommended standard practices for biological evaluation. *JADA* 1972;84:382-90.
- 27 Council on Dental Materials and Devices. American National Standards Institute/American Dental Association Document no. 41 for Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials. *J Am Dent Assoc* 1979; 99: 697-698.
- 28 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.
- 29 Hanks. Cytotoxic effects of resin components on cultured mammalian fibroblasts 1991. *Dent Res*; 70:1450-5.n.
- 30 Rrathbun MA. Cytotoxicity of a bis-gma dental composite before and after leaching in organic solvents 1991. *J Biomed Mater Res*; 25:443-57.

- 31 Hensten PA, Helgeland k. Evaluation of biological effects of dental materials using 4 different cell culture techniques 1997.Scand J Res; 8:291-96.
- 32 Ruenggeberg FA, Caughman WF, Curtisjr. Effect of light intensity and exposure duration on cure of resin composite 1994.Oper Dent ; 19:26-32.

Capítulo 2

Avaliação do processo de reparo frente aos cimentos MTA Ângelus® cinza e MTA fotopolimerizável experimental em alvéolo de ratos utilizando fluorocromos

Resumo

COSTA, MMTM. **Avaliação do processo de reparo frente aos cimentos MTA Ângelus® cinza e MTA fotopolimerizável experimental em alvéolo de ratos utilizando fluorocromos.** 2008. 107f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta tecidual e o processo de reparo frente ao uso de um MTA fotopolimerizável experimental. Para isso, 30 tubos de polietileno contendo os materiais testados foram implantados em alvéolos dentários de ratos, sendo empregado no Grupo Controle os tubos vazios. Aos 7, 14 e 21 foram realizadas, respectivamente, injeções dos fluorocromos calceína, alizarina e oxitetraciclina em 5 animais de cada grupo, sendo todos os animais sacrificados após 30 dias. Este protocolo permite observar de maneira integrada a dinâmica do processo de reparo e a neoformação de tecido ósseo. Foi realizada análise microscópica de peças coradas com Hematoxilina e Eosina, análise dos fluorocromos e análise de algumas peças não desmineralizadas e coradas com Stevenel's Blue e Alizarin red. A resposta tecidual frente ao MTA fotopolimerizável foi caracterizada por uma inflamação leve ou ausente e pela presença de tecido mineralizado em contato com o material, principalmente aos 21 dias. Foi possível concluir que o material experimental demonstrou propriedades biológicas favoráveis, semelhante ao observado com o MTA cinza.

Descritores: Agregado de trióxido mineral, inflamação, biocompatibilidade, fotopolimerizável.

Abstract

COSTA, MMTM. **Evaluation of rats alveolar repair to MTA Ângelus® Gray and Experimental Light Cured MTA, using fluorochromes.** Araçatuba, 2008. 107p. Thesis (Doctor Degree in Pediatric Dentistry) – Sao Paulo State University.

The aim of this study was to evaluate the tissue reaction to a Light Cured MTA or MTA Ângelus® gray. It was used 30 animals, which were divided in three groups. In the Control Group, empty tubes were inserted into the rat's sockets immediately after extraction. In the other groups, the tubes were filled with Light Cured MTA or MTA Ângelus®. Five animals of each group were injected via intramuscular with calceína on day 7, with alizarin on day 14 and with oxytetracycline on day 21. On day 30 these animals were sacrificed the right hemi-maxilas were removed. Fifteen maxilas were processed in laboratory and stained with HE. The maxilas from animals in which fluorochromes were injected were analyzed under a light microscope. After these laminas were stained with Stevenel-'s Blue e Alizarin red. It was possible to conclude that Light Cured MTA presented a similar response when compared to MTA Ângelus®, being characterized by a mild inflammatory response and calcifications areas. In Light Cured MTA Group, the fluorescence areas were more evident et 21 days, showing a higher bone formation at this moment.

Key-words: Mineral trioxide aggregate, inflammation, biocompatibility, light-cured, fluorochromes.

Capítulo 2*

1.1 - Introdução

O Agregado de Trióxido Mineral (MTA) é um material que vem sendo amplamente empregado no tratamento endodôntico com o objetivo de proporcionar o selamento de comunicações patológicas ou iatrogênicas entre o canal radicular e a superfície externa do dente. Este material tem demonstrado, em diferentes estudos, que induz reações teciduais favoráveis caracterizadas pela ausência de resposta inflamatória severa e capacidade osteoindutora (1-7). Além de possuir boas propriedades biológicas, a composição química do MTA lhe confere propriedades hidrofílicas que permitem que o pó, uma vez hidratado, resulte em um gel coloidal o qual sofre ligeira expansão promovendo um bom selamento marginal (8, 9).

Devido às suas características favoráveis, o MTA pode ser empregado em diferentes situações clínicas, como nos casos de perfurações radiculares (10-15), capeamento pulpar (11, 16-18), tampão apical em rizogênese incompleta (11, 19), como material retrobturador (11, 20, 21), como tampão cervical em clareamentos dentários internos, material restaurador temporário e para reparar fraturas radiculares verticais (11).

No entanto, apesar de suas diversas propriedades positivas, o MTA é um material de difícil manipulação, além de possuir um tempo de presa demorado e um tempo de trabalho relativamente curto (22). Para contornar essas dificuldades, um cimento experimental fotopolimerizável com propriedades semelhantes ao MTA vem sendo desenvolvido. Este material foi

*Este texto foi formatado de acordo com as normas do periódico Journal of Endodontics (Anexo B)

inicialmente desenvolvido para ser empregado em casos de capeamento pulpar, sendo composto por uma resina hidrofílica biocompatível e por ingredientes ativos do MTA. É armazenado em tubos plásticos com pontas descartáveis de alumínio, as quais facilitam sua inserção. Por ser facilmente inserido na cavidade desejada e por apresentar uma formulação resinosa, que permite sua polimerização imediata, vem se mostrando como um material de mais fácil manipulação.

Apesar deste MTA experimental apresentar algumas características favoráveis, torna-se ainda necessário avaliar sua resposta tecidual, empregando para isso um modelo experimental adequado. Neste sentido, embora muitas pesquisas utilizem como metodologia principal a análise de cortes histológicos obtidos em parafina e corados por hematoxilina e eosina (1-7, 12, 15-18, 21), tem-se observado a utilização de novos modelos, os quais permitem a obtenção de respostas cada vez mais específicas complementando os achados histológicos. Dentre estes novos modelos, uma ferramenta metodológica que vem sendo empregada atualmente é a injeção de fluorocromos em diferentes períodos de tempo (23-26). Este protocolo permite observar de maneira integrada a dinâmica do processo de reparo e a neoformação de tecido ósseo (23-26), evidenciando de maneira mais precisa o período em que ocorreu o processo de mineralização.

1.2 - Proposição

O objetivo do presente estudo foi avaliar de maneira integrada a dinâmica do processo de reparo e a neo-formação de tecido ósseo, em alvéolos dentários de ratos, frente ao emprego do MTA fotopolimerizável em fase experimental, comparativamente ao MTA Ângelus cinza®.

1.3 – Material e Método

Animais

Foram utilizados 30 ratos machos (*Rattus, norvegicus, albinus, Wistar*), com idades aproximadas de 90 dias, pesando aproximadamente 350g. Previamente ao início do experimento, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal, sendo aprovado (CEEA – FOA/UNESP - protocolo nº 49/05 – ANEXO A).

Materiais experimentais

Foram empregados os cimentos MTA Ângelus® cinza (Ângelus Soluções em Odontologia, Londrina-Pr, Brasil) e um cimento MTA fotopolimerizável em fase experimental (Bisco). (ANEXO C – Figuras 1 e 2).

Segundo informações dos idealizadores, este cimento experimental é composto de AeroSil (8.0%), uma resina hidrofílica biocompatível (42.5%), componentes ativos do MTA (44.5%), Sulfato de Bário (5%). A composição desta resina é, basicamente, BisGMA (20%), resina biocompatível – FDA (77,25%), um agente modificador (2,4%), um agente iniciador (0,32%) e uma gente para estabilizar o iniciador (0.032%).

Tubos de Polietileno

Foram empregados 30 tubos de polietileno (Abbot Lab. Do Brasil Ltda, São Paulo). com 1,0 mm de diâmetro interno, 1,6 mm de diâmetro externo e 3,0 mm de comprimento, os quais foram esterilizados em óxido de etileno. Uma extremidade de cada tubo foi selada com guta-percha aquecida (Hygenic –

DFL, Akron, OH – USA), em uma extensão de 1mm. Os materiais experimentais foram introduzidos na outra extremidade do tubo, preenchendo os 2mm restantes e ficando rentes à superfície externa. Para o Grupo Controle foi empregado o tubo vazio, contendo apenas uma das extremidades selada com guta-percha.

Procedimento Cirúrgico (ANEXO D)

Após a injeção intramuscular de sedativo à base de xilazina (Dopaser, Calier S.A. - Barcelona, Espanha – 10mg/Kg) e de anestésico à base de Cloridrato de Ketamina a 5% (Vetanarcol, König S. A. – Avellaneda, Argentina – 25mg/Kg) os animais tiveram o incisivo superior direito extraído, empregando-se uma técnica e instrumentos adaptados para este fim (27).

O MTA Ângelus® cinza foi manipulado de acordo com as orientações dos fabricantes e imediatamente antes do implante, evitando-se assim que ocorresse a presa antes de sua implantação. O MTA experimental fotopolimerizável foi inserido no tubo e fotopolimerizado por 60 segundos. Para implantação dos tubos no alvéolo, foi utilizada uma pinça reta, buscando inserí-los no primeiro terço alveolar. Posteriormente, foi realizada a sutura com pontos simples, utilizando para isso fios de seda 4.0 (Ethicon Johnson & Johnson Ind. Com. Ltda.).

Grupos Experimentais

Quinze animais foram sacrificados após 30 dias, para que se realizasse a análise histológica convencional, sendo 5 animais do Grupo Controle, 5

animais do Grupo MTA cinza e 5 animais do Grupo MTA fotopolimerizável experimental. Nestes animais não foram realizadas as injeções com os fluorocromos.

Para a avaliação da dinâmica óssea, foram utilizados outros 15 animais, sendo 5 animais do Grupo Controle, 5 animais do Grupo MTA cinza e 5 animais do Grupo MTA fotopolimerizável experimental. Nestes animais foram realizadas as injeções dos fluorocromos (20 mg/Kg de peso corporal - por via intramuscular), sendo aos 7 dias injetada a calceína (Sigma Chemical St Louis, MO, USA), aos 15 dias a alizarina (Sigma Chemical St Louis, MO, USA) e aos 21 dias a oxitetraciclina (Sigma Chemical St Louis, MO, USA). Todos os marcadores foram preparados imediatamente antes de serem utilizados, ao abrigo da luz fluorescente, sendo diluídos em solução salina 0,9%. O sacrifício dos animais foi realizado após 30 dias por injeção excessiva de anestésico.

Processamento laboratorial e avaliação histológica

As hemimaxilas contendo os tubos com os materiais foram removidas e colocadas em tubos individuais contendo solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos – Dinâmica), durante as primeiras 48 horas e, posteriormente, lavadas por um período de 5 horas para remoção da solução fixadora. As peças foram desmineralizadas com solução de EDTA a 18%, sendo, posteriormente, lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes longitudinais com espessura de 6µm, sendo as lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (28). A análise microscópica foi realizada com auxílio de

um microscópio binocular, sendo os resultados expostos por meio de uma análise descritiva e outra quantitativa.

A análise quantitativa da resposta inflamatória foi realizada graduando a importância dos fenômenos microscópicos observados separadamente, sendo atribuídos escores de 0 a 3 (7, 29, 30). O escore zero significa ausência de resposta inflamatória, 1 significa uma resposta inflamatória leve (< 25 células e de 1 a 5 vasos sanguíneos na embocadura), 2 significa uma resposta moderada (25 até 125 células e de 6 a 10 vasos sanguíneos na embocadura) e 3 significa uma resposta severa (> 125 células e desorganização do tecido e mais que 10 vasos sanguíneos na embocadura). A cápsula fibrosa foi considerada fina quando < 150µm e espessa quando > 150µm. A presença de necrose bem como a formação de mineralização em contato com os materiais testados foi registrada como presente ou ausente. Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística, através do Teste de Kruskal Wallis (Graph Prism 3.0), sendo considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Processamento laboratorial e avaliação dos fluorocromos

As hemimaxilas obtidas foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos – Dinâmica). Após a fixação, passaram pela etapa de desidratação a partir da seqüência crescente de álcoois (70, 80, 90 e 100 %), com troca de solução a cada 3 dias. Ao término da desidratação, as peças foram imersas em acetona (Synth) por 24 horas e, na seqüência, iniciaram-se os banhos em monômero metil metacrilato (JET – Artigos Odontológicos Clássicos Ltda, Industria Brasileira), sendo que o primeiro e o segundo banhos tiveram a duração de 24 horas cada. Para a

realização do terceiro banho, foi acrescentado ao monômero um catalisador, o peróxido de benzóila (Riedel – De Haën AG, Seelze – Hannover) na concentração de 1%.

Em seguida, as peças foram colocadas individualmente em tubos de ensaio com tampa e permaneceram imersas neste terceiro banho até que o monômero polimerizasse (aproximadamente 72 horas, temperatura ambiente). Após a polimerização, os blocos com as peças foram desgastados em esmeril e, posteriormente, chegaram à espessura de 100 μm , através de desgaste manual em lixas d'água (3M). Os cortes obtidos foram colocados em lâminas de vidro, sendo as lamínulas montadas utilizando óleo mineral Nujol (Schering-Plough) como meio de montagem. Após a fixação das lamínulas, as bordas foram isoladas com esmalte cosmético para evitar o ressecamento dos cortes.

Para análise das lâminas, foi empregado um microscópio com filtros fotomultiplicadores específicos, correspondentes ao comprimento de onda excitado por cada fluorocromo, sendo um filtro no valor de 534 nm para calceína, 357 nm para alizarina e luz ultravioleta (368 nm) para a oxitetraciclina. Para aquisição das imagens utilizou-se um microscópio de fluorescência (Microscópio Leica Ansloptan, Leica Microsystems, Switzerland) acoplado à uma câmera de captação de imagem (Leica DFC 300 FX, Leica Microsystems, Switzerland) e conectado à um microcomputador com software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging IMSO Demo Software, Leica Microsystems, Switzerland).

Para ilustração da dinâmica da reação tecidual e da deposição de tecido mineralizado, foi realizada a sobreposição das imagens obtidas a partir de cada fluorocromo com auxílio do aplicativo Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems

Incorporated) – (ANEXO H). Para análise dos resultados, foram sobrepostas ao campo 6 grades de Merz, contendo 100 pontos equidistantes cada, em um total de 600 pontos (31) (ANEXO I). Os pontos sobrepostos às fluorescências foram contados, sendo os valores expressos em densidade volumétrica (número de pontos contados sobre as estruturas pesquisadas em relação ao número de pontos totais das grades sobrepostas à imagem).

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por teste paramétrico ANOVA e Newman-Keuls test, considerando significativa a diferença entre os grupos quando $p < 0,05$. Os resultados foram apresentados em gráficos de barras representando a média \pm EPM dos valores obtidos, com o auxílio do programa Graph Pad Prism 3.0.

Análise histológica do material não desmineralizado.

Após análise inicial das peças marcadas com os fluorocromos, as lâminas foram desmontadas para realização da análise histológica deste material não descalcificado. Para isto, as peças foram fixadas em novas lâminas com auxílio de resina epóxi (Araldite – Brascola, Brasil) e coradas com corante de Stevenel's Blue e Alizarin red (ANEXO G), para avaliação de tecido mole e mineralizado, respectivamente.

As lâminas foram inicialmente coradas com Stevenel's Blue em estufa à 60° C, por 15 minutos, lavadas com água destilada também a 60° C e secas. Em seguida, algumas gotas de Alizarin red foram colocadas sobre as lâminas à temperatura ambiente, por 5 minutos, sendo posteriormente lavadas com água destilada até a remoção do excesso de corante. Este último procedimento para coloração com Alizarin red foi novamente repetido, sendo que as lâminas

permaneceram, posteriormente, por 10 minutos sobre a bancada. A seqüência foi novamente repetida, sendo finalmente realizada lavagem em água corrente para remoção do excesso de corante.

Depois de coradas e secas, as lâminas foram montadas colando-se uma lamínula sobre a peça, utilizando-se como meio de montagem o Entelan. A análise das estruturas coradas permitiu observar o processo de reparo e a deposição de tecido mineralizado aos 30 dias, uma vez que esta amostra histológica é representativa do período em que se realizou o sacrifício dos animais. A análise microscópica foi realizada com auxílio de um microscópio binocular, sendo as ocorrências expostas de maneira descritiva.

1.4 - Resultados

A metodologia utilizada permitiu observar a dinâmica da reação tecidual frente aos materiais testados, durante o período de 30 dias, bem como a deposição de tecido mineralizado, observada aos 7, 14 e 21 dias.

Análise Qualitativa

Análise Histológica

No grupo controle foi possível verificar junto à embocadura do tubo um tecido conjuntivo com discreto infiltrado inflamatório e presença de fibroblastos jovens, além de alguns macrófagos e linfócitos. Verificou-se ainda, a organização do fibrosamento de características capsulares em todos os espécimes. Não foram notadas áreas de deposição de tecido mineralizado adjacentes à embocadura do tubo (Figura 1E).

No grupo MTA Ángelus[®] cinza foi possível observar leve resposta inflamatória crônica, distinguida pela presença de um infiltrado inflamatório mononucleado e fibroblastos intercalados à matriz extracelular. Constatou-se também a organização do fibrosamento de características capsulares em todos os espécimes. Na totalidade dos espécimes, observou-se a presença de um tecido mineralizado neoformado em contato com o material (Figura 2E).

No grupo MTA fotopolimerizável verificou-se, subjacente ao material, um processo de reorganização tecidual, caracterizado pela presença de um tecido conjuntivo bem estruturado, demonstrando sua celularidade e matriz extracelular bem distribuídos (Figura 1E). A maioria dos espécimes apresentou

uma resposta inflamatória leve ou uma ausência de infiltrado inflamatório. Foi possível verificar a organização do fibrosamento de características capsulares em todos os espécimes. Somente dois espécimes não apresentaram a presença de tecido mineralizado neoformado em contato com o material.

Análise dos Fluorocromos e do material não descalcificado

Grupo Controle

No Grupo controle, analisando-se as colorações exibidas por cada fluorocromo, não se detectou a presença de tecido mineralizado neoformado em todos os períodos avaliados (Figura 1/A,B,C,D), ficando caracterizadas apenas as estruturas referentes ao tubo vazio e aos tecidos constituintes do alvéolo dentário.

A coloração específica, realizada para detecção de material não desmineralizado, confirmou a ausência do mesmo (em vermelho) na área frontal à luz do tubo (Figura 1F).

Grupo MTA Ângelus[®] cinza

O tecido mineralizado presente aos 7 dias, representado pela calceína (verde), é observado em uma região mais próxima da embocadura do tubo, sendo caracterizada pela presença de uma marcação pouco densa (Figura 2A). Já aos 14 dias, o tecido mineralizado formado é representado pela alizarina (vermelho) e aparece com marcação mais acentuada do que aos 7 dias (Figura 2B). Neste período a presença do marcador é observada não somente junto à embocadura do tubo, como também se dirigindo para a porção mais

intermediária do alvéolo. Aos 21 dias, o tecido mineralizado neoformado é representado pela oxitetraciclina (azul) demonstrando a marcação predominante deste fluorocromo próximo à embocadura do tubo, bem como em áreas mais afastadas, no sentido do fundo do alvéolo (Figura 2C). Esta marcação se apresentou ainda mais densa do que aquelas observadas aos 7 e 14 dias.

A sobreposição das imagens (Figura 2 D) permitiu observar o tecido ósseo neoformado em cada período de avaliação, demonstrando a predominância da oxitetraciclina, sugerindo a ocorrência de uma maior deposição de tecido mineralizado aos 21 dias.

A coloração específica, realizada para detecção de material não desmineralizado, confirmou a presença do mesmo (em vermelho) na área frontal à luz do tubo (Figura 2F).

Grupo MTA Fotopolimerizável

Os resultados observados com o emprego deste material foram próximos àqueles observados com o MTA Ângelus[®] cinza, contudo, a presença dos marcadores foi ligeiramente menos intensa. Aos sete dias, foi possível observar que a deposição de tecido ósseo representada pela calceína (verde) ocorreu apenas em alguns pontos próximos à embocadura do tubo (Figura 3A). Aos 14 dias, o tecido mineralizado formado representado pela alizarina (vermelho) se mostrou em uma área mais extensa do que o observado aos 7 dias (Figura 3B). Aos 21 dias, o tecido mineralizado formado é representado pela oxitetraciclina (azul), estando localizado tanto próximo à embocadura do tubo como se dirigindo para a porção intermediária do alvéolo (Figura 3C). Esta

marcação se apresentou mais densa do que aquelas observadas aos 7 e 14 dias.

A sobreposição das imagens permitiu observar o tecido ósseo neoformado em cada período de avaliação, demonstrando a predominância da coloração pela alizarina (14 dias) e pela oxitetraciclina (21 dias), evidenciando uma maior deposição de tecido mineralizado nestes períodos (Figura 3D).

A coloração específica, realizada para detecção de material não desmineralizado, confirmou a presença do mesmo (em vermelho) na área frontal à luz do tubo (Figura 3F).

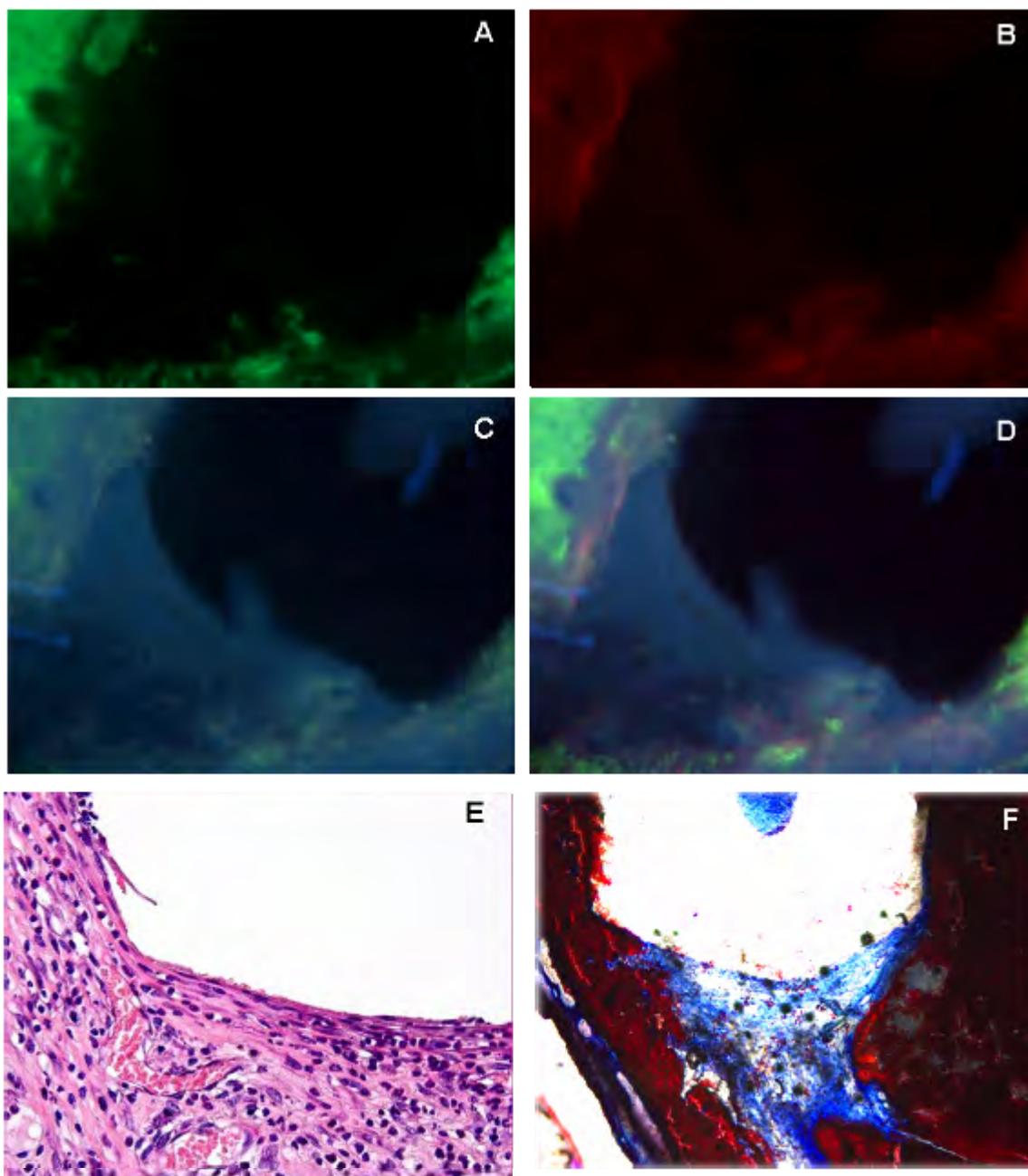


Figura 1 – Grupo Controle: (A) Calceína, 7 dias, 10x; (B) Alizarina, 14 dias, 10x; (C) Oxitetraciclina, 21 dias, 10x (D); Sobreposição de A,B e C, 10x (E) H.E., 10x; (F) Coloração de Stevenel's Blue e Alizarin Red, 10x.

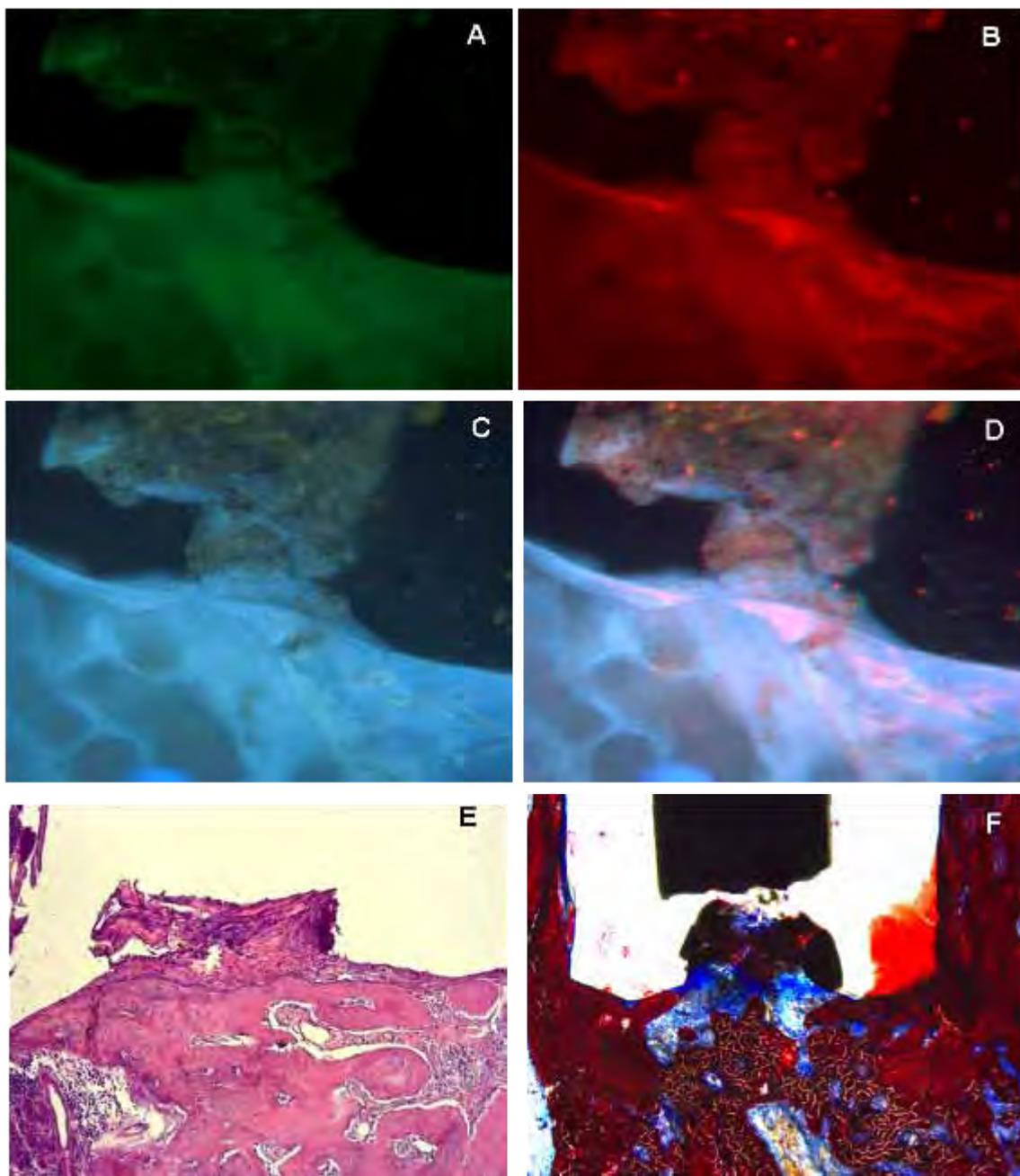


Figura 2 – Grupo MTA Ângelus® Cinza: (A) Calceína, 7 dias, 10x; (B) Alizarina, 14 dias, 10x; (C) Oxitetraciclina, 21 dias, 10x (D); Sobreposição de A,B e C, 10x (E) H.E., 10x; (F) Coloração de Stevenel's Blue e Alizarin Red, 10x.

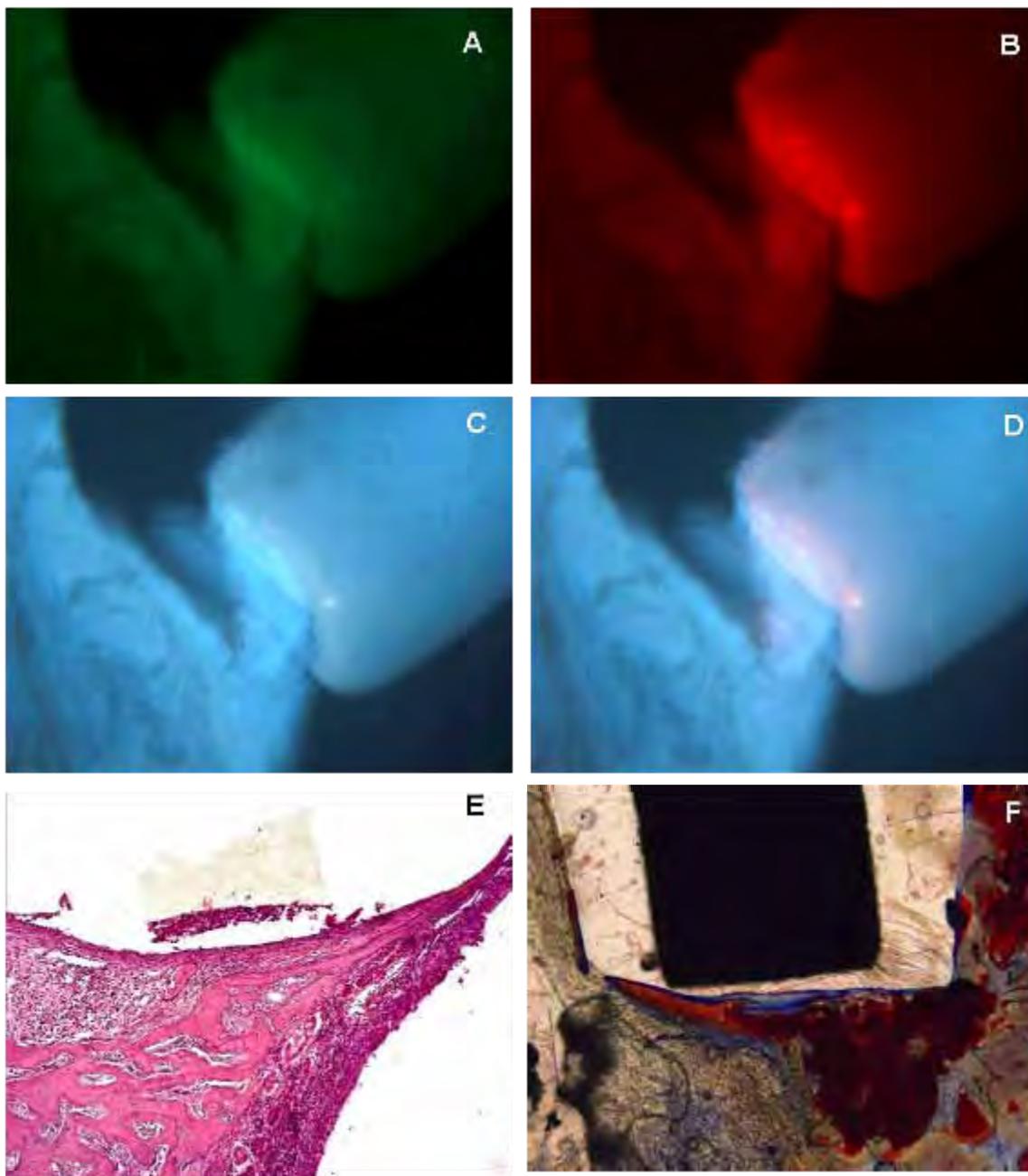


Figura 3 – Grupo MTA Fotopolimerizável experimental: (A) Calceína, 7 dias, 10x; (B) Alizarina, 14 dias, 10x; (C) Oxitetraciclina, 21 dias, 10x (D); Sobreposição de A,B e C, 10x (E) H.E., 10x; (F) Coloração de Stevenel's Blue e Alizarin Red, 10x.

Análise Quantitativa

Na análise histológica dos grupos que não receberam a injeção dos fluorocromos, foi possível observar que o MTA fotopolimerizável apresentou uma resposta tecidual semelhante àquela observada para o MTA Ângelus® cinza, não sendo observada nenhuma diferença estatística ($p=0,3679$) entre os grupos (tabela 1). Quanto às características da cápsula fibrosa, presença de mineralização ou de necrose, os resultados observados no presente estudo estão expressos na tabela 2.

De maneira semelhante, a marcação dos fluorocromos permitiu observar que, nos grupos experimentais, ocorreu um aumento gradual na deposição de tecido mineralizado ao longo dos períodos de avaliação (7, 14 e 21 dias), sendo esta deposição significativa para a alizarina e a oxitetraciclina, quando comparadas com as respectivas marcações no grupo controle. No Grupo do MTA Ângelus® cinza foi encontrada, para todos os marcadores, uma deposição de tecido mineralizado sem diferenças estatísticas quando comparadas à sobreposição final, demonstrando uma expressiva neoformação óssea em todos os períodos avaliados. No grupo do MTA fotopolimerizável foi observada diferença estatística entre a marcação com a calceína e a alizarina com a sobreposição deste mesmo grupo, demonstrando que nestes períodos a neoformação óssea foi menor quando comparada com a deposição marcada pela oxitetraciclina. Este fato não foi observado com a oxitetraciclina, uma vez que a deposição de tecido ósseo aos 21 dias foi expressiva. Estes dados estão demonstrados na figura 4.

Tabela 1 – Escores relativos à resposta inflamatória para cada grupo experimental.

| | | Controle | MTA Ângelus | MTA fotopolimerizável |
|--------|---|----------|-------------|-----------------------|
| Escore | 0 | 2/5 | 0/5 | 1/5 |
| | 1 | 3/5 | 4/5 | 3/5 |
| | 2 | 0/5 | 1/5 | 1/5 |
| | 3 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |

Tabela 2 – Características da cápsula fibrosa e ocorrência de mineralização ou de necrose para cada grupo e período experimental.

| Resposta tecidual | | Controle (tubo vazio) | | MTA Ângelus® cinza | | MTA Fotopolimerizável | |
|-------------------|----------|-----------------------|-------|--------------------|-------|-----------------------|-------|
| | | f | % | f | % | f | % |
| Cápsula Fibrosa | <150µm | 2 | 40,0 | 3 | 60,0 | 4 | 80,0 |
| | >150 µm | 3 | 60,0 | 2 | 40,0 | 1 | 20,0 |
| Mineralização | ausente | 5 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| | presente | 0 | 0,0 | 5 | 100,0 | 5 | 100,0 |
| Necrose | ausente | 5 | 100,0 | 5 | 100,0 | 5 | 100,0 |
| | presente | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |

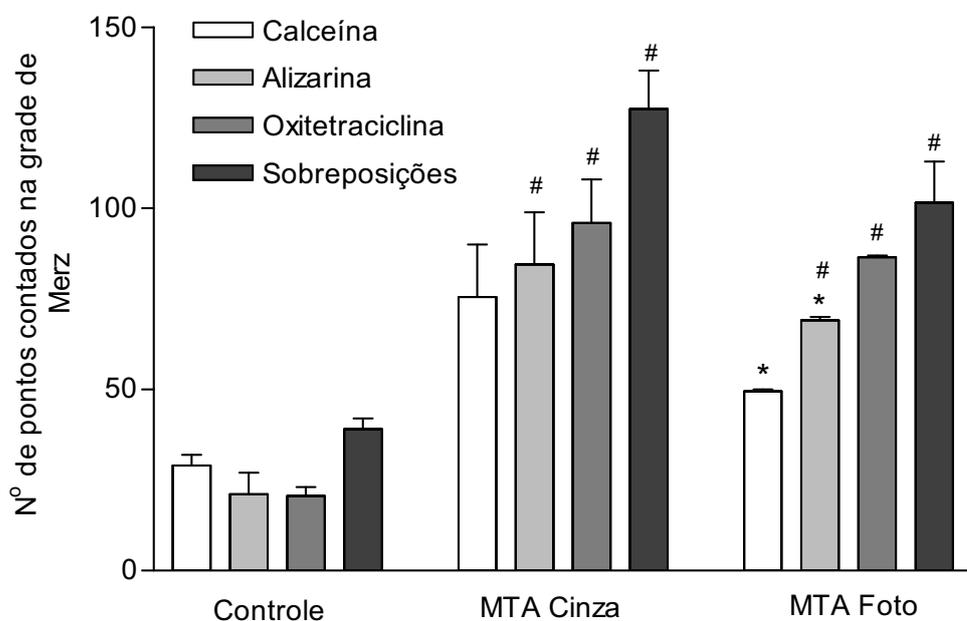


Figura 4 – Avaliação dos fluorocromos nos diferentes grupos experimentais, utilizando a pontuação da Grade de Merz. (*) estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado o fluorocromo com a sobreposição, específico para cada grupo. (#) estatisticamente significativo ($p < 0,05$), quando comparado o fluorocromo de cada grupo com marcador equivalente no grupo controle.

1.5 – Discussão

O emprego do alvéolo de ratos como ferramenta metodológica vem sendo empregado, uma vez que apresenta características próprias, como a possibilidade de se observar neoformação conjuntiva ou mineralizada, em contato direto com o material (5, 27). Sendo assim, apesar de algumas pequenas variações na cronologia do reparo alveolar e na resistência do animal, este modelo experimental é bastante utilizado para simular situações que ocorreriam em seres humanos (5, 27).

Dentro desta metodologia, a utilização de tubos de polietileno serviu para facilitar a padronização da quantidade de material a ser inserido no alvéolo, bem como da área de contato deste material com os tecidos vitais. O implante destes tubos permitiu diminuir possíveis traumas mecânicos que frequentemente ocorrem quando o material testado é inserido diretamente, promovendo pressão sobre a parede alveolar. Estes tubos são amplamente aceitos para testes de biocompatibilidade, promovendo uma resposta do tecido conjuntivo caracterizada pela presença de uma cápsula fibrosa não infiltrada, de pequena espessura, apresentando fibras colágenas e células dispostas paralelamente à superfície, demonstrando a biocompatibilidade deste material (4, 7, 29, 30, 32).

Para complementação da análise histológica, foi empregada no presente estudo a injeção de fluorocromos, os quais possibilitam observar a biodinâmica da reação tecidual, bem como a visualização conjunta ou individualizada do tecido mineralizado formado em cada período analisado. Neste sentido, todos os fluorocromos empregados no presente estudo podem ser comparados porque se ligam aos íons cálcio através de um processo de quelação (33),

fornecendo informações seqüenciais quando aplicados intercaladamente. O emprego dos fluorocromos apresenta ainda características favoráveis, como a possível diminuição da amostra e a eliminação de variações, uma vez que as injeções dos marcadores são todas realizadas no mesmo animal.

Em relação aos resultados observados no presente estudo e semelhante ao observado na literatura (5, 7, 32), foi possível observar, no Grupo Controle, resposta inflamatória leve, caracterizada pela presença de fibroblastos jovens, alguns macrófagos e linfócitos. Em alguns casos ocorreu um crescimento de tecido conjuntivo para o seu interior, semelhante ao relatado na literatura (5, 7, 32). A análise histológica das lâminas coradas com HE, bem como a coloração com Stevenel-'s Blue e Alizarin red permitiram observar ausência de tecido mineralizado na embocadura do tubo demonstrando que não ocorreu uma indução de neoformação óssea. A avaliação dos fluorocromos demonstrou resultados semelhantes, uma vez que não foram encontradas áreas de fluorescência próximas à luz do tubo, em todos os períodos avaliados.

O grupo do MTA Ângelus[®] cinza demonstrou leve resposta inflamatória crônica, organização do fibrosamento de características capsulares e a presença de um tecido mineralizado neoformado em contato com o material, sendo estes achados histológicos observados tanto com a coloração H.E. como com a de Stevenel-'s Blue e Alizarin red. Esta resposta tecidual está de acordo com os dados relatados na literatura (5, 7). Com os fluorocromos, aos 7 dias, foram observadas pequenas áreas de fluorescência as quais se mostraram mais densas e acentuadas aos 14 e 21 dias, demonstrando que embora não tenham ocorrido diferenças estatisticamente significativas entre os períodos avaliados, este processo de mineralização ocorreu de maneira

crescente, sendo que os períodos de maior deposição óssea ocorreram na 2ª e 3ª semanas. Estes dados completam os achados histológicos e os dados observados na literatura demonstrando a capacidade do MTA em favorecer a neoformação óssea (1-7, 10, 12, 13, 15, 21) uma vez que induz a diferenciação de células pulpares ou periodontais em odontoblastos, cementoblastos ou osteoblastos, principais responsáveis pela deposição de minerais no alvéolo (34-36).

O grupo do MTA fotopolimerizável experimental demonstrou resultados semelhantes aos observados para o MTA Ângelus® cinza, promovendo uma resposta inflamatória leve e deposição de tecido mineralizado junto ao material, tanto com a coloração H.E. como com a de Stevenel-'s Blue e Alizarin red, demonstrando um processo adequado na reparação do alvéolo. Estes resultados podem ser explicados, especulativamente, devido ao fato deste material apresentar em sua constituição ingredientes ativos do MTA (44,5%), os quais atuariam de forma semelhante ao observado no grupo do MTA Ângelus® cinza, induzindo a deposição de tecido próximo ao material. Empregando-se este mesmo material experimental em tecido subcutâneo de ratos, foi observada uma resposta biológica semelhante àquela obtida no presente estudo, contudo, sem estimular a formação de tecido mineralizado (7). Esta diferença nos resultados pode estar relacionada ao emprego de modelos experimentais diferentes, com peculiaridades anatômicas, funcionais e processos de reparo distintos. A marcação com os fluorocromos demonstrou uma dinâmica de neoformação óssea com padrão crescente, ocorrendo uma deposição mais intensa aos 21 dias. Este dado sugere que este cimento poderia favorecer a mineralização de

maneira mais lenta devido à sua composição resinosa e ao possível fato de liberar seus componentes ativos em períodos mais tardios.

Em oposição aos resultados observados no presente estudo, a literatura relata que alguns materiais resinosos têm se mostrado moderadamente tóxicos quando estudados *in vivo* e *in vitro* (37, 38). Neste sentido, uma resposta tecidual favorável frente ao MTA fotopolimerizável pode estar relacionada com o fato de este material ser constituído por uma resina hidrofílica biocompatível (42,5%), bem como pela presença de ingredientes ativos do MTA. Ainda é válido ressaltar que devido ao fato de ser polimerizável e tomar presa imediatamente, este material pode ter favorecido uma melhor estabilidade do tubo no interior do alvéolo e conseqüentemente o processo de reparo.

A presença de monômeros superficiais não polimerizados podem também estar relacionados com a ação irritante dos materiais resinosos, devido à inibição da reação local exercida pelo oxigênio ou pela deficiência na polimerização da resina ocasionada por uma reduzida intensidade de luz do fotopolimerizador ou curto tempo de aplicação de luz visível sobre o material (39). Neste sentido, estabeleceu-se no presente estudo um padrão de inserção e de polimerização do MTA fotopolimerizável com o objetivo de evitar possíveis alterações nos resultados. Sendo assim, o material foi implantado no tubo com 2 mm, sendo polimerizado pelo tempo de 60 segundos com uma intensidade mínima de luz de 400mw/cm², para que ocorresse uma polimerização uniforme, segundo dados relatados na literatura (39).

Com os resultados observados no presente estudo, foi possível concluir que além de sua resposta biológica favorável, caracterizada pela ausência de uma inflamação severa e pela deposição de tecido mineralizado, o MTA

fotopolimerizável experimental apresentou características muito favoráveis de manipulação. No entanto, apesar dos resultados favoráveis obtidos com este material experimental, ainda se torna necessária a realização de outros estudos, empregando outros modelos experimentais, para que se possa esclarecer suas propriedades e características.

1.6 - Referências

1. Torabinejad M. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endod* 1997; 23:225-28.
2. Torabinejad M. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs 1998. *J Endod*; 24:468-71.
3. 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.
4. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod.* 2004; 30:95-9.
5. Cintra LT, Moraes IG, Estrada BP, 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. Epub 2006 Apr 4
6. Bernabé PFE, Gomes-Filho JE, Rocha WC, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan-Junior E. Histological evaluation of MTA as a root-end filling material. *Int Endod J* 2007; 40:758-765.
7. Gomes-Filho JE, Faria MD, Bernabé PFE, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan-Junior E, Costa MMTM, Cannon M. Mineral Trioxide Aggregate but not Light-Cure Mineral Trioxide Aggregate Stimulated Mineralization. *J Endod* 2008; 34(1): 62-5.
8. Torabinejad M. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995; 21:349-3.

9. Torabinejad M, Higa RK, McKendry DJ, Pitt Ford TR. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. *J Endod* 1994; 20:159-63.
10. Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of Mineral Trioxide Aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surgery, Oral Med., Oral Pathol* 1995; 79: 756-63.
11. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999; 25:197-05.
12. Holland R, Bernabé PFE, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 2001; 27:281-4.
13. Ferris DM, Baumgartner JC. Perforation repair comparing two types of mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2004 Jun; 30:422-4.
14. De-Deus G, Reis C, Brandão C, Fidel S, Fidel RA. The ability of Portland cement, MTA, and MTA bio to prevent through-and-through fluid movement in repaired furcal perforations. *J Endod* 2007; 33:1374-7.
15. Holland R, Bisco Ferreira L, de Souza V, Otoboni Filho JA, Murata SS, Dezan E Jr. Reaction of the lateral periodontium of dogs' teeth to contaminated and noncontaminated perforations filled with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2007; 33:1192-7.
16. Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using Mineral Trioxide Aggregate as a pulp-capping material. *J Amer Dent Assoc* 1996; 127:1491-94.
17. 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.
18. Iwamoto CE, Adachi E, Pameijer CH, Barnes D, Romberg EE, Jefferies S. Clinical and histological evaluation of white ProRoot MTA in direct pulp capping. *Am J Dent* 2006; 19:85-90.
19. Pace R, Giuliani V, Pini Prato L, Baccetti T, Pagavino G. Apical plug technique using mineral trioxide aggregate: results from a case series. *Int Endod J* 2007; 40:478-84.
20. Economides N, Pantelidou O, Kokkas A, Tziafas D. Short-term periradicular tissue responses to mineral trioxide aggregate (MTA) as root end filling material. *Int Endod* 2003; 36:44-8.
21. Bernabé PFE, Holland R, Morandi R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JÁ, Dezan-Junior E, Gomes-Filho JE. Comparative study of MTA with other materials in retrofilling of pulpless dog's teeth. *Braz Dent J* 2005;16:149-155.
22. Matt GD, Thorpe Junior, Strother JM, Mcclanahan SH. 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.
23. Lee TC, Mohsin S, Taylor D, Parkesh R, Gunnlaugsson T, O'Brien FJ, Giehl M, Gowin W. Detecting microdamage in bone. *J Anat.* 2003 Aug;203(2):161-72
24. Papalexidou V, Novaes AB Jr, Grisi MF, Souza SS, Taba M Jr, Kajiwarra JK. Influence of implant microstructure on the dynamics of bone healing around immediate implants placed into periodontally infected sites. A confocal laser scanning microscopic study. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15:44-53.

25. Nishikawa T, Masuno K, Tominaga K, Koyama Y, Yamada T, Takakuda K, Kikuchi M, Tanaka J, Tanaka A. Bone repair analysis in a novel biodegradable hydroxyapatite/collagen composite implanted in bone. *Implant Dent* 2005;14:252-60.
26. Xiropaidis AV, Qahash M, Lim WH, Shanaman RH, Rohrer MD, Wikesjö UM, Hall J. Bone-implant contact at calcium phosphate-coated and porous titanium oxide (TiUnite)-modified oral implants. *Clin Oral Implants Res* 2005;16:532-9.
27. Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odont Araçatuba* 1973; 2:153-69.
28. Lillie RD. *Histopathologic technique and practical histochemistry*. New York, Blakinston, 2a ed. 501p, 1954.
29. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Fédération Dentaire Internationale, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. *Int Dent J*. 1980;30:140-88
30. 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.
31. Merz WA. Distance measurement of directed structures in the microscope and its use in the determination of surface and volume relationship in bone tissue. *Mikroskopie* 1968;22:132-42.
32. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1996; 21:379-87.

33. Sun TC, Mori S, Roper J, Brown C, Hooser T, Burr DB. Do different fluorochrome labels give equivalent histomorphometric information: Bone 1992; 13:443-6.
34. 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.
35. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, Ito K. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. Int Endod J 2006; 39:415-22.
36. Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. J Endod 2007;33:836-9.
37. Wennberg MIA, Hensten PA. Biological evaluation of dental restorative materials –a comparison of different test methods 1983. J Biomed Mater Res; 17:23-36.
38. Hensten PA, Helgeland K. Evaluation of biological effects of dental materials using 4 different cell culture techniques 1997. Scand J Res; 8:291-96.
39. Ruenggeberg FA, Caughman WF, Curtis Jr. Effect of light intensity and exposure duration on cure of resin composite 1994. Oper Dent ; 19:26-32.

Amexos

Anexo A – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL FRENTE AOS CIMENTOS MTA CINZA E BRANCO. ANÁLISEMICROSCÓPICA DE IMPLANTES REALIZADOS EM ALVÉOLOS DENTÁRIOS DE RATOS" sob responsabilidade de JOÃO EDUARDO GOMES FILHO E MARIANA MACHADO TEIXEIRA DE MORAES COSTA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião de 26 de abril de 2005, de acordo com o protocolo nº 49/05.

Araçatuba, 26 de abril de 2005.


Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

Anexo B – Normas do Periódico 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.

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).

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.

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 columns-width figure (i.e., about 175 mm wide X 125 mm high when published in

the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing 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:

| % NaOCl | N/Group | % Inhibition of Growth |
|---------|---------|------------------------|
| 0.001 | 5 | 0 |
| 0.003 | 5 | 0 |
| 0.01 | 5 | 0 |
| 0.03 | 5 | 0 |
| 0.1 | 5 | 100 |
| 0.3 | 5 | 100 |
| 1 | 5 | 100 |
| 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 the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).

- f. **Discussion:** The conclusion section should describe the major findings of the study. Both the strength and weaknesses of the

observations should be discussed. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions? How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical readership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion.

- g. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be efficiently learned from reading past issues of the *JOE*. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

4. Page Limitations for Manuscripts in the Category of Basic Science/Endodontic Techniques

- a. **What is the limitation?** Original research reports in the category of basic science/endodontic techniques are limited to no more than 2,000 words (total for the abstract, introduction, methods, results and conclusions), and a total of three Figs./Charts/Tables. If a composite figure is used (as described above), then this will count as two of the three permitted Figs./Charts/Tables.
- b. **Does this apply to me?** Manuscripts submitted to the *JOE* can be broadly divided into several categories including review articles, clinical trials (e.g., prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies excluding the use of human teeth for technique studies), basic science/biology (animal or culture studies on biological research related to endodontics, or relevant pathology or physiology), and basic science/techniques (e.g., stress/strain/compression/strength/failure/composition studies on endodontic instruments or materials). Manuscripts submitted in this last category are the only category subject to these limitations. If you are not sure whether your manuscript falls within this category please contact the Editor by e-mail at jendodontics@uthscsa.edu.
- c. **Why page limitations?** Most surveyed stakeholders of the *JOE* desire timely publication of submitted manuscripts and an extension of papers to include review articles and other features. To accomplish these goals, we must reduce the average length of manuscripts since increasing the *JOE*'s number of published pages is prohibitively expensive. Although a difficult decision, restricting this one category of manuscripts accomplishes nearly all of these goals since ~40-50% of published papers are in this category.
- d. **How do I make my manuscript fit these limitations?** Adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the

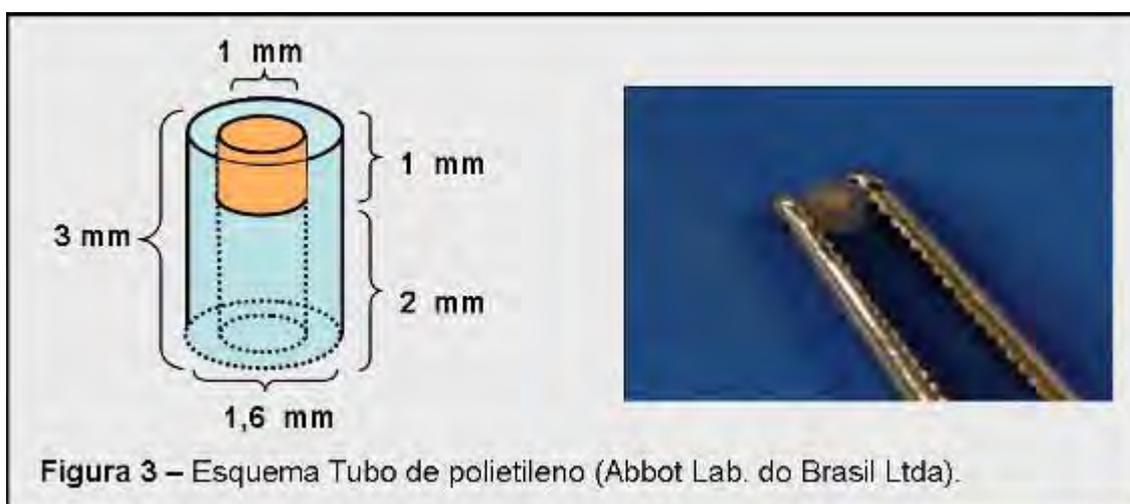
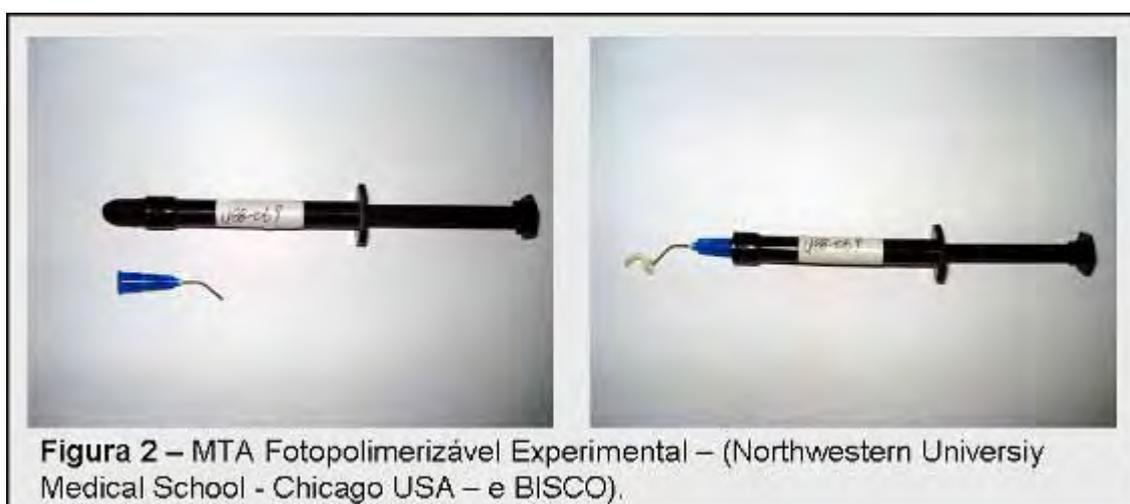
study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor will reject manuscripts that exceed these limitations.

5. Available Resources:

Strunk W, White EB. The Elements of Style. Allyn & Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X

- . Day R.. How to Write and Publish a Scientific Paper. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN 1-57356-164-9
- a. Woods G. English Grammar for Dummies. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review of grammar)
- b. Alley M. The Craft of Scientific Writing. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3.
- c. Alley M. The Craft of Editing. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1.

Anexo C - Ilustrações: materiais empregados



Anexo D - Ilustrações: procedimentos cirúrgicos



Figura 4 – Incisivos superiores e inferiores.



Figura 5 – Luxação do alvéolo.



Figura 6 – Exodontia do incisivo superior direito

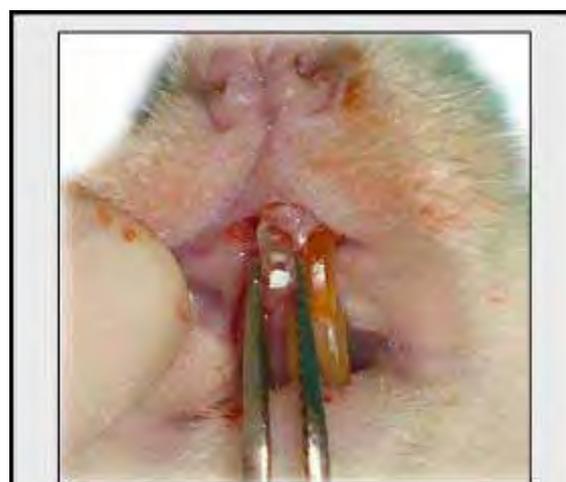


Figura 7 – Implante do tubo de polietileno

*Anexo E – Processamento laboratorial para
análise histológica*



Figura 8 – Processamento inicial das peças (desidratação, diafanização)



Figura 9 – Inclusão em parafina.



Figura 10 – Obtenção dos cortes



Figura 11 – Coloração das lâminas



Figura 12 – Lâmina com os cortes corados com hematoxilina e eosina



Figura 13 – Microscópio, câmera e software utilizados para obtenção e avaliação das imagens.

Anexo F – Processamento laboratorial para análise dos Fluorocromos

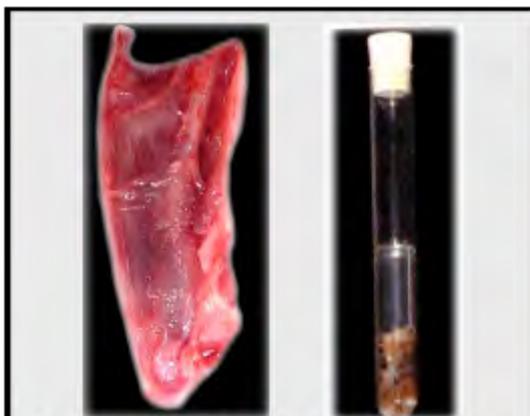


Figura 14 – Peça obtida e incluída em metil metacrilato + peróxido de benzoíla a 1%



Figura 15 – Calceína (Sigma) e imagem obtida com esse marcador



Figura 16 – Alizarina (Sigma) e imagem obtida com esse marcador



Figura 17 – Oxitetraclina (Sigma) e imagem obtida com esse marcador



Figura 18 – Esmeril empregado para o desgaste inicial das peças



Figura 19 – Lâminulas montadas com óleo mineral Nujol e seladas com esmalte cosmético

Anexo G – Coloração de Stevenel-'s Blue e Alizarin Red

Stevenel's Blue

Solução A

Água destilada 75 ml

Azul de metileno.....1 g

Solução B

Permanganato de potássio.....1,5 g

Água destilada 75 ml

Obs: preparar as duas soluções separadas e a frio.

Misturar as duas soluções em banho Maria em ebulição até que todo o precipitado tenha se dissolvido. Esse passo é crítico, pois se não houver uma total dissolução, pode ocorrer a precipitação durante a coloração.

Depois de estar totalmente dissolvido, deixar esfriar em temperatura ambiente e filtrar de 2 a 3 vezes.

Alizarin Red

Alizarina vermelha S..... 2 g

Água destilada100 ml

Diluir o corante em água destilada aquecida (aproximadamente 45° C) mexendo completamente.

Esfriar em temperatura ambiente, filtrar de 2 a 3 vezes e ajustar o pH entre 4,1 a 4,3 com NaOH.

A solução deve apresentar cor de iodo intenso.

Anexo H

Ilustrações da seqüência utilizada para a sobreposição das imagens obtidas - Capítulo 2.

Para ilustração da dinâmica da reação tecidual e da deposição de tecido mineralizado, foi realizada a sobreposição das imagens obtidas a partir de cada fluorocromo utilizado. Para a sobreposição das imagens foi utilizado o aplicativo Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems Incorporated). Os passos foram os seguintes: (1) ferramenta “arquivo” e abertura das 3 imagens originais (Figura 20); (2) ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da alizarina para o arquivo da calceína (Figura 21); (3) selecionar opção “camada”, “estilo de camada”, “opções de mesclagem”, “modo de mesclagem: clarear” (Figura 22); (4) ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da oxitetraciclina para o arquivo com as imagens da calceína e alizarina sobrepostas; (5) selecionar opção “camada”, “estilo de camada”, “opções de mesclagem”, “modo de mesclagem: clarear” (Figura 23).

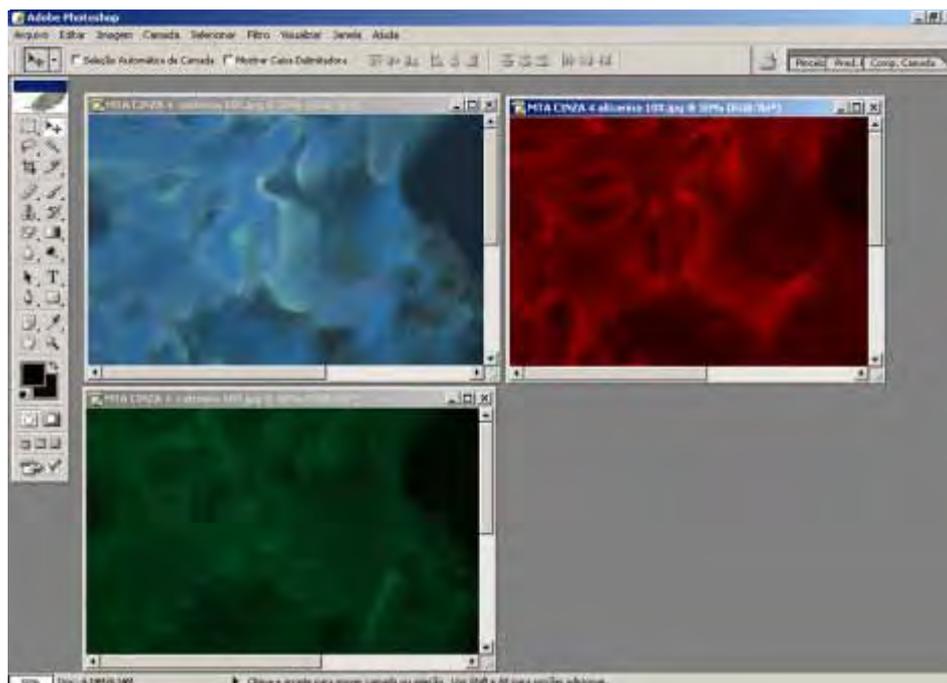


Figura 20 - Ferramenta “arquivo” e abertura das 3 imagens originais.

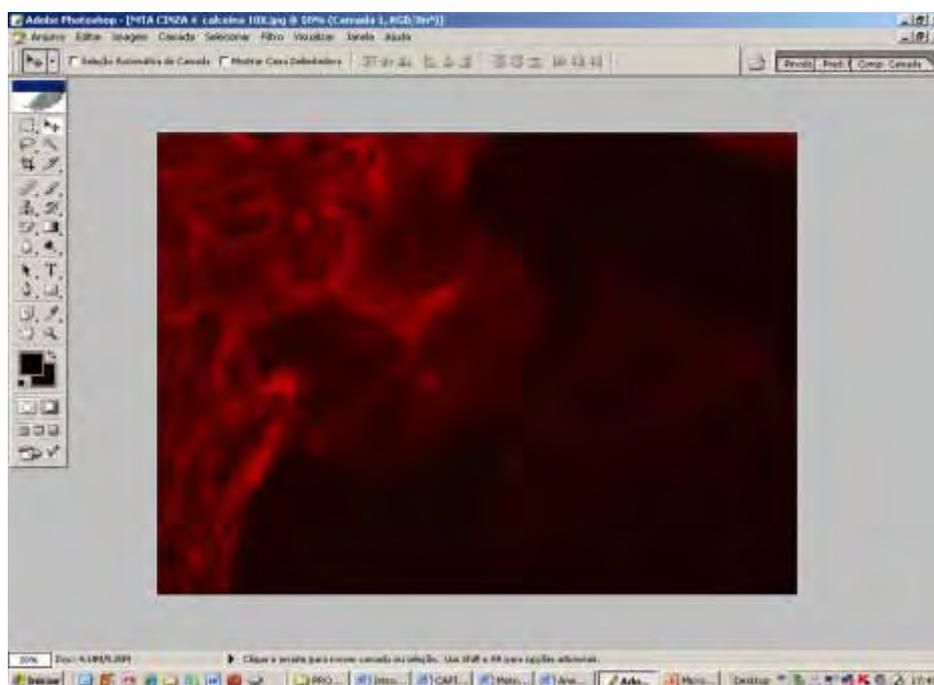


Figura 21 - Ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da alizarina para o arquivo da calcéina.

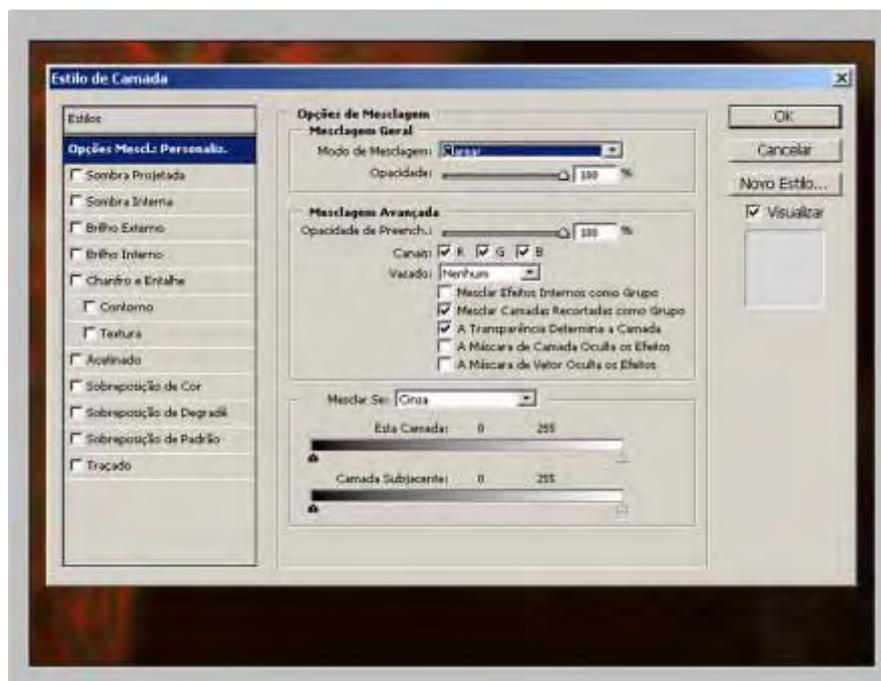


Figura 22 - Ferramenta selecionar opção “camada”, “estilo de camada”, “opções de mesclagem”, “modo de mesclagem: clarear”.

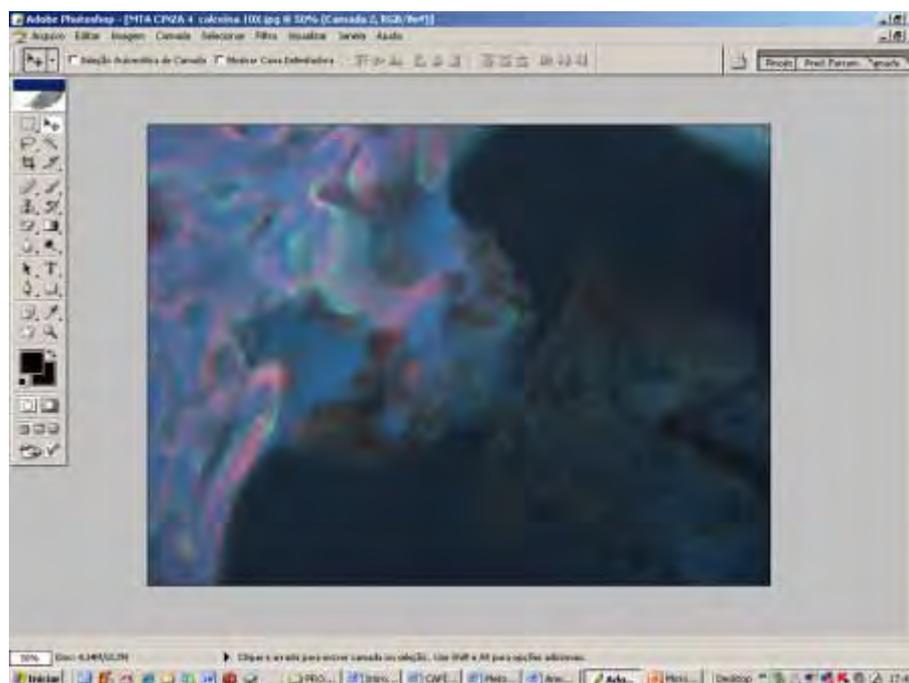


Figura 23 - Ferramenta “mover” para selecionar e arrastar a imagem da oxitetraciclina para o arquivo com as imagens da calceína e alizarina sobrepostas. Selecionar opção “camada”, “estilo de camada”, “opções de mesclagem”, “modo de mesclagem: clarear”, para obter a imagem final com as 3 imagens sobrepostas.

Anexo I – Grade de Merz

Para realização do presente estudo, foram sobrepostos 6 grades de Merz em cada imagem, perfazendo um total de 600 pontos. Os pontos sobrepostos às fluorescências foram contados, sendo os valores expressos em densidade volumétrica (V_{vi}). A densidade volumétrica (V_{vi}) expressa em porcentagem, representa o número de pontos contados sobre as estruturas pesquisadas (p_i) em relação ao número de pontos totais (p) contados sobre o terço médio do alvéolo. Os valores de densidade volumétrica foram obtidos pela aplicação da seguinte fórmula:

$$V_{vi} = \frac{\sum \text{pontos sobre a estrutura no alvéolo } (p_i) \times 100}{\sum \text{pontos contados no alvéolo } (p)}$$

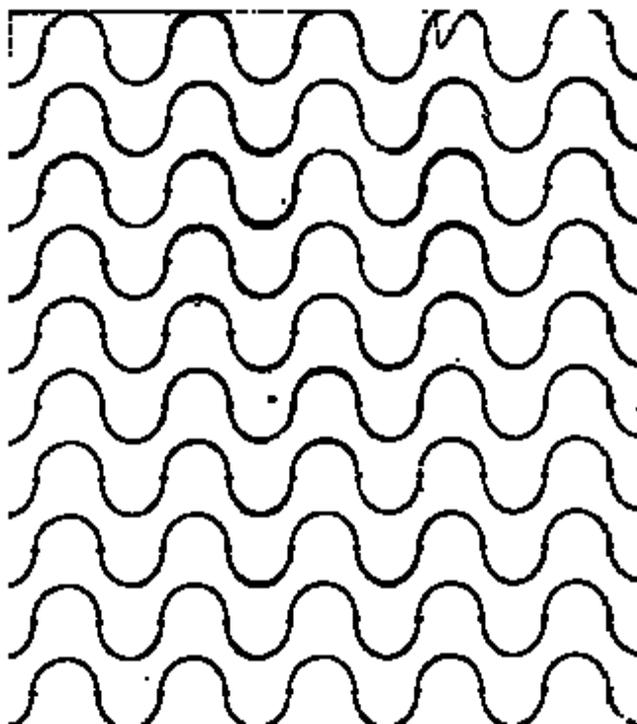


Figura 24 – Ilustração da grade de Merz.

Anexo J – Referências – Introdução Geral

1. 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.
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. Torabinejad M, Higa RK, McKendry DJ, Pitt Ford TR. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. *J Endod* 1994; 20:159-63.
4. Torabinejad M. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995; 21:349-3.
5. Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of Mineral Trioxide Aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surgery, Oral Med., Oral Pathol* 1995; 79: 756-63.
6. Kettering JD, Torabinejad M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 1995; 21:537-42.
7. 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.
8. Nakata TT, Baumgartner JC. Perforation repair comparing Mineral Trioxide Aggregate and Amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. *J Endod* 1998; 24:184-6.
9. 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.
10. Herzog-Flores, DS Velázquez LMA, González VM, Rodríguez FJM, Gómez MVB, Barrientos VG. Análisis fisicoquímico del mineral trioxide agregado (MTA) por difracción de rayos X, calorimetris e microscopia electrónica de barrido. *Rev ADM* 2000; 57:125-31.
11. Holland R, Bernabé PFE, Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E. Mineral trioxide Aggregate repair of lateral root perforations. *J. Endod* 2001; 27:281-4.
12. Tanomaru Filho M. Capacidade de selamento de materiais retrobturadores em perfurações radiculares laterais. *RBO* 2002; 59:80-2.

13. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* 2002;13:23-6.
14. Silva Neto UX, Moraes IG. Capacidade seladora proporcionada por alguns materiais quando utilizados em perfurações na região de furca de molares humanos extraídos. *J Appl Oral Sci* 2003; 11: 27-33.
15. Ferris DM, Baumgartner JC. Perforation repair comparing two types of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2004 Jun; 30:422-4.
16. 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.
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. Tsatsas DV, Meliou HA, Kerezoudis NP. Sealing effectiveness of materials used in furcation perforation in vitro. *Int Dent J* 2005; 55:133-41.
19. Faria MD. Avaliação qualitativa e quantitativa da resposta tecidual frente aos cimentos: MTA Ângelus cinza e MTA fotopolimerizável experimental. Análise microscópica de implantes realizados em subcutâneos de ratos. Araçatuba, 2006; 87 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP.
20. Cintra LT, de Moraes IG, Estrada BP, 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. Epub 2006 Apr 4
21. Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine. *J Endod* 2006; 32:1094-6.
22. Takita T, Hayashi M, Takeichi O, Ogiso B, Suzuki N, Otsuka K, Ito K. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. *Int Endod J* 2006; 39:415-22.
23. Bernabé PFE, Gomes-Filho JE, Rocha WC, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan-Junior E. Histological evaluation of MTA as a root-end filling material. *Int Endod J* 2007; 40:758-765.

24. Holland R, Bisco Ferreira L, de Souza V, Otoboni Filho JA, Murata SS, Dezan-Junior. Reaction of the lateral periodontium of dogs' teeth to contaminated and noncontaminated perforations filled with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2007; 33:1192-7.
25. De-Deus G, Reis C, Brandão C, Fidel S, Fidel RA. The ability of Portland cement, MTA, and MTA bio to prevent through-and-through fluid movement in repaired furcal perforations. *J Endod* 2007; 33:1374-7.
26. Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *J Endod* 2007;33:836-9.
27. Guven G, Cehreli ZC, Ural A, Serdar MA, Basak F. Effect of mineral trioxide aggregate cements on transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein production by human fibroblasts in vitro. *J Endod* 2007;33:447-50.
28. Gomes-Filho JE, Faria MD, Benabé PFE, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Dezan-Junior E, Costa MMTM, Cannon M. Mineral Trioxide Aggregate but not Light-Cure Mineral Trioxide Aggregate Stimulated Mineralization. *J Endod* 2008; 34(1): 62-5.