



**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
UNESP**

Faculdade de Odontologia- Campus de Araraquara

RAFAEL VICENTE FERINO

**Reação histológica ao cimento endodôntico à
base de MTA (Fillapex[®]) em
subcutâneo de ratos**

Araraquara

2012



Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Odontologia – Campus de Araraquara

RAFAEL VICENTE FERINO

**Reação histológica ao cimento endodôntico à
base de MTA (Fillapex[®]) em
subcutâneo de ratos**

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

Orientador: *Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri*

Co-orientadora: *Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru*

Araraquara

2012

Ferino, Rafael Vicente

Reação histológica ao cimento endodôntico à base de MTA (Fillapex®) em subcutâneo de ratos / Rafael Vicente Ferino.-- Araraquara: [s.n.], 2012.

60 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

Co-orientador: Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro

Tanomaru

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

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

Rafael Vicente Ferino

Reação histológica ao cimento endodôntico à base de MTA (Fillapex[®]) em subcutâneo de ratos

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de mestre

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri

2º Examinador: Prof. Dr. Marco Antônio Húngaro Duarte

3º Examinador: Prof. Dr. Mario Tanomaru Filho

Araraquara, 19 de Março de 2012

DADOS CURRICULARES

NOME: Rafael Vicente Ferino

FILIAÇÃO: Paulo Afonso Ferino

Vitória Natalina Balivo Ferino

DATA de NASCIMENTO: 24 de Setembro de 1982

2004-2008: Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Sagrado Coração – USC - Bauru

2008-2010: Curso de Especialização em Endodontia pela Associação Paulista de Cirurgião Dentista – APCD – Bauru

2010- 2012: Curso de pós Graduação, Mestrado em Odontologia – Endodontia, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Araraquara

Dedicatória Especial

Em primeiro lugar ao senhor **Deus** por ter me deixado percorrer uma longa caminhada até chegar aqui, com fé, esperança e força, permitindo realizar um sonho.

Aos meus pais **Paulo e Vitória**, sem eles eu não teria conseguido nada, obrigado pelo apoio, incentivo, compreensão e por sacrificar e dedicar todas as suas vidas a mim e as minhas irmãs; vocês são um exemplo de dignidade, luta, honestidade, união e força de vontade; enfim muito obrigado.

A minha irmã **Cristiane** e ao meu cunhado **Danilo** por terem me ajudado e agüentado pelos meses do período no mestrado, atrapalhando a vida do casal.

A minha irmã **Daniela** e meu cunhado **Flávio (Branco)**, ele por ter ajudado e agüentado no período da graduação me hospedando um tempo em sua casa e de inúmeras caronas, ela pelos conselhos, discussões e paciência no período de especialização e no mestrado.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri**, pela agradável e valiosa convivência. Serei eternamente grato pela confiança, orientação e dedicação dispensados a mim, durante o desenvolvimento e na obtenção dos resultados do projeto. Um professor sempre disposto a tirar dúvidas. Obrigado pela ajuda incansável na realização deste trabalho e dedicação para elaboração dessa tese.

A minha co-orientadora, ***Profa. Dra. Juliane Maria Guerreiro Tanomaru***, obrigado pelos ensinamentos e convívio durante meus estágios. Pela sua contribuição, sugestão no desenvolvimento desta dissertação, desde o início até a finalização, e sua colaboração na parte prática. Por estar sempre pronta a ajudar.

Ao professor, ***Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho***, pela grande paciência e imensa colaboração em acompanhar todas as etapas dessa dissertação e por tantos direcionamentos que me deu. Obrigado.

A professora, ***Profa. Dra. Estela Sasso Cerri***, por estar sempre disposta a ajudar, tirar dúvidas e sugestões durante o desenvolvimento e a finalização da dissertação.

Aos professores, ***Profa. Dra. Eleny Zanella Balducci e Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho***, pelas sugestões durante o Exame Geral de Qualificação que contribuíram, e muito, para a melhora deste trabalho.

Ao meu amigo e colega doutorando, ***Guilherme Ferreira da Silva (Xis)***, um irmão, pela amizade, paciência, descontração e conselhos, pela colaboração e ajuda na parte prática, desenvolvimento e elaboração final desta dissertação.

A minha professora, ***Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto***, grande amiga e professora que me ensinou os primeiros passos da pesquisa científica durante a minha graduação, além de sempre me apoiar e acreditar no meu trabalho.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Agradecimentos

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

Aos professores do Departamento de Endodontia desta Instituição: **Prof. Dr. Fábio Luiz Camargo Villela Berbert**, **Prof. Dr. Idomeo Bonetti Filho**, **Prof. Dr. Renato de Toledo Leonardo**, **Prof. Dr. Milton Carlos Kuga**, e **Profa. Dra. Gisele Faria**, meu agradecimento por permitir utilizar o laboratório da disciplina, pelos ensinamentos transmitidos durante a dissertação, nos estágios de docência e nas aulas. Obrigado pela oportunidade de convívio, pela amizade e pela contribuição na minha formação profissional.

Aos meus colegas do curso de mestrado, **Ariete**, **Ana Lúvia**, **Carol**, **Camila**, **Flavia**, **Gisele**, **Roberta**, **Rosymere**, **Natalia** e **Matheus**.

À minha amiga, **Roberta**, pela amizade sincera, auxílio nas aulas e nos estágios.

Aos meus colegas de doutorado, **Raquele**, **Norberto**, **Rodrigo** e **Guilherme**.

Ao meu amigo, **Rodrigo**, pela amizade.

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

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

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

Aos funcionários da disciplina de Endodontia, **Dona Cida**, **Creusa**, **Conceição** e **Marinho**, pela amizade, carinho e total apoio.

Aos funcionários do biotério da Faculdade pelo apoio e auxílio no tratamento dos animais.

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

À empresa **Ângelus®**, por ter cedido o material para ser utilizado no experimento.

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

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

Resumo	10
Abstract	12
1 Introdução	14
2 Objetivo	17
3 Material e Método	18
3.1 Animais	18
3.2 Procedimento Cirúrgico	19
3.3 Processamento Histológico	24
3.4 Método de análise	24
3.4.1 Análise morfológica	24
3.4.2 Densidade numérica de células inflamatórias	24
3.4.3 Imuno-histoquímica para marcação de macrófagos	28
3.4.4 Técnica histoquímica de von Kossa.....	29
4 Resultado	30
4.1 Análise morfológica	30
4.2 Densidade numérica de células inflamatórias	36
4.3 Imuno-histoquímica para marcação de macrófagos e von Kossa	41
5 Discussão	47
6 Conclusão	52
7 Referências	53
8 Anexos	60

Resumo

O agregado de trióxido mineral (MTA) tem sido amplamente utilizado em Endodontia, devido à sua boa adaptação marginal e biocompatibilidade. Na tentativa de associar propriedades físico-químicas de um cimento obturador de canal radicular a biocompatibilidade do MTA, algumas modificações foram feitas no MTA para possibilitar seu uso como um cimento obturador de canal radicular. Assim, a reação promovida por um cimento a base de MTA (MTA Fillapex) em subcutâneo de ratos foi investigada por análise morfológica e morfométrica. Oitenta ratos foram distribuídos em 4 grupos (n=20); em cada animal, um tubo de polietileno preenchido com MTA Fillapex, MTA, AH Plus ou Fill Canal foi implantado no subcutâneo dorsal. Após 7, 15, 30 e 60 dias, os tubos rodeados por tecido conjuntivo foram removidos, fixados em formaldeído 4% e incluídos em parafina. Nos cortes corados com HE, foi avaliada a densidade numérica de células inflamatórias na cápsula e análises estatísticas realizadas usando ANOVA e do Student-Newman-Keuls ($p \leq 0.05$). Alguns cortes foram submetidos a imuno-histoquímica para marcação de macrófagos; o método de von Kossa foi usado para detecção de estruturas calcificadas. Nossos resultados revelaram que, nos períodos de 7 para 15 dias, o número de células inflamatórias foi significativamente mais elevado na cápsula do MTA Fillapex em comparação com outros materiais. No entanto, uma redução significativa na densidade numérica de células inflamatórias foi verificada na cápsula do MTA Fillapex aos 30 e 60 dias quando comparado com os períodos iniciais. Aos 30 dias, macrófagos imunopositivos foram observados principalmente na superfície da cápsula em íntima justaposição ao MTA Fillapex, MTA e AH Plus. No entanto, o intenso processo inflamatório crônico adjacente ao Fill Canal exibiu numerosas células imunopositivas por toda extensão da cápsula. No período de 60 dias, a reação inflamatória promovida pelo MTA Fillapex foi semelhante do MTA e significativamente menor ao Fill Canal de preenchimento. Em contrapartida, observou-se um aumento gradual e significativo de células inflamatórias na cápsula adjacente ao Fill Canal. Estruturas von Kossa-positivas foram observadas na

cápsula adjacente para o MTA Fillapex, o MTA e AH Plus; estruturas positivas não foram encontradas na cápsula ao redor do Fill Canal. Os nossos resultados indicam que MTA Fillapex apresenta, no período de 60 dias, biocompatibilidade semelhante ao MTA.

Palavras Chaves: cimentos endodônticos, biocompatibilidade e MTA Fillapex

Abstract

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) has been widely used in Endodontics due to its good marginal adaptation and biocompatibility. In attempt to associate physicochemical properties of a root canal sealer with biocompatibility of the MTA, some modifications have been made in the MTA to provide its use as a root canal sealer. Thus, the tissue reaction promoted by a MTA-based sealer (MTA-Fillapex) in rat subcutaneous was investigated by morphological and morphometric analyses. Eighty male rats were distributed into 4 groups (n=20); in each animal, one polyethylene tubes filled with MTA-Fillapex, MTA, AH-Plus or Fill Canal was implanted in the dorsal subcutaneous. After 7, 15, 30 and 60 days, the tubes surrounded by connective tissue were removed, fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. In the HE-stained sections, the numerical density of inflammatory cells in the capsule was evaluated and statistical analyses performed using ANOVA and Student-Newman-Keuls test ($p \leq 0.05$). Sections were submitted to immunohistochemistry for the detection of macrophage; von Kossa method was used for detection of calcified structures. Our results revealed that, in the periods of 7 and 15 days, the number of inflammatory cells was significantly higher in the capsule of the MTA-Fillapex in comparison to other materials. However, significant reduction in the density numerical of inflammatory cells was verified in the capsule of the MTA-Fillapex in the 30 and 60 days when compared to the initial periods. At 30 days, immunolabelling for macrophages was mainly detected in the surface of capsule in close juxtaposition to the MTA Fillapex, MTA and AH Plus. However, the intense chronic inflammatory process adjacent to the Fill Canal exhibited numerous immunolabelled cells. At 60 days, the inflammatory reaction promoted by MTA Fillapex was similar to the MTA and significantly lower than Fill Canal. Otherwise, a gradual and significant increase was observed in the number of inflammatory cells in the capsule adjacent to the Fill Canal. Structures von Kossa-positive were observed in the capsule adjacent to the MTA-Fillapex, MTA and AH-Plus; positive structures were not seen in the capsule surrounding the Fill Canal.

In the period of 60 days, our results indicate that MTA-Fillapex, exhibits biocompatibility similar to MTA.

Key words: biocompatibility; MTA Fillapex, root canal sealer

1 Introdução

O sucesso do tratamento endodôntico está diretamente relacionado à correta intervenção do canal radicular, iniciada por um diagnóstico preciso e concluída com uma obturação mais hermética possível. Os cones de guta-percha têm sido considerados o material sólido de escolha para obturação durante o tratamento endodôntico, principalmente, por não serem irritantes aos tecidos apicais e periapicais. Porém, somente estes cones de guta-percha não são capazes de selar adequadamente o canal radicular sendo necessário, portanto, associá-los a algum tipo de cimento endodôntico os quais tem a função de preencher os espaços existentes entre os cones de guta-percha e a parede do canal radicular⁴⁴.

Um cimento endodôntico ideal deve apresentar características físicas, químicas e biológicas adequadas. Dentre estas propriedades, destacam-se a baixa solubilidade e desintegração, tempo de trabalho adequado, bom selamento marginal, radiopacidade suficiente para distingui-lo das estruturas anatômicas adjacentes e biocompatibilidade, ou seja, não interferir e, se possível, estimular o processo de reparo apical e periapical^{20,27,44}. Sendo assim, os cimentos endodônticos devem cumprir as seguintes exigências: ser bacteriostático, promover selamento apical e lateral, resistir à umidade, ser radiopaco e ser biocompatível. Além disso, o material deve ser estéril, de fácil inserção e remoção¹⁰.

Ao longo da história, vários cimentos foram desenvolvidos e estudados com o objetivo de se obter um material ideal para ser utilizado na obturação dos canais radiculares. Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol foram introduzidos na Endodontia em 1936, por Grossman, porém, somente em 1958 este material passou a ser comercializado no Brasil com o nome de Fill Canal. Desde então, tem sido crescente sua popularidade entre os profissionais brasileiros e até hoje este cimento é amplamente utilizado na odontologia por ser de fácil manipulação e inserção no canal radicular, por apresentar tempo de trabalho adequado e baixo custo⁴⁴. No entanto, no que se refere à biocompatibilidade, este cimento não apresenta propriedades satisfatórias devido, principalmente, ao comportamento do eugenol^{14,21,50} que confere a este cimento atividade antimicrobiana grande⁵⁸.

Estudos realizados com implantes de tubos de polietileno no subcutâneo de ratos relataram que os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol promovem uma resposta inflamatória intensa, mesmo em períodos prolongados^{5,6,9,38}. Estudos in vivo em cães demonstraram que este material utilizado como cimento endodôntico causa necrose dos tecidos apicais, acompanhada de extenso processo inflamatório crônico na região periapical^{42,60}. O seu emprego em selamento de perfurações de furca é acompanhado por um intenso e extenso processo inflamatório, intensa reabsorção do processo alveolar ocasionando um significativo aumento do espaço periodontal¹⁶.

Em relação aos cimentos à base de resina epóxica, destaca-se o AH Plus, pois, além de apresentar propriedades físicas e químicas adequadas como, por exemplo, alta radiopacidade⁶¹, baixa solubilidade²², escoamento adequado⁸ e boa capacidade seladora⁵², este cimento possui excelentes propriedades biológicas^{43,45}. Estudos mostraram que o AH Plus, quando utilizado na obturação de canais radiculares em dentes de cães, estimula a formação de tecido mineralizado na região periapical, obliterando na maioria dos casos, pelo menos parcialmente, o forame apical^{43,45}. Além disso, este cimento, em contato com a região periapical, provoca reação inflamatória suave no ligamento periodontal^{43,45}.

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) surgiu no início dos anos 90, desenvolvido pelo professor Mahmoud Torabinejad na Universidade de Loma Linda, nos Estados Unidos, com o objetivo de selar comunicações entre a cavidade pulpar e a superfície externa do dente, sendo indicado, inicialmente, para selamento de perfurações radiculares e em casos de retro-obturações^{40,64}. Atualmente, por este material apresentar melhor selamento marginal e biocompatibilidade^{4,16,30,31,62,65} quando comparado a outros materiais existentes no mercado, o MTA também tem sido considerado o produto de escolha em casos de reabsorção dentária, dentes com rizogênese incompleta e no capeamento pulpar⁶².

No entanto, o MTA possui propriedades físicas e químicas que dificultam a sua utilização como cimento obturador de canais radiculares. O material resultante da mistura do pó com água é difícil de ser manipulado^{12,63} e sua consistência granular dificulta sua inserção no canal radicular^{37,41}. Holland et al.^{29,34}, avaliando a reação periapical provocada pelo MTA após a obturação de dentes de cães, observaram que este material é biocompatível, porém, ressaltam a dificuldade de inserção do MTA no

canal radicular. Assim, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de se desenvolver um cimento obturador de canais radiculares que adicione às propriedades físicas e químicas de um cimento endodôntico ideal às propriedades biológicas do MTA^{3,35,51}. Em 2004, foi lançado, na Argentina, o Endo-CPM-Sealer que demonstrou ser um material com radiopacidade satisfatória²⁸, boa atividade antimicrobiana⁵⁹, não citotóxico²⁵, biocompatível^{16,24} e capaz de induzir a mineralização²⁴.

Considerando que o MTA é basicamente composto por cimento Portland (CP), estudos têm sido realizados no sentido de se desenvolver um cimento endodôntico a partir do CP^{3,24,47}. Um cimento endodôntico experimental, contendo CP, óxido de zircônia e um veículo resinoso, vem sendo desenvolvido na disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Trabalho recente demonstrou que este cimento exibe pH alcalino (pH 8, 0h-28d) e alto índice de liberação (30mg/L 0h-24h, 54mg/L 28h sei pico 94mg/L 7d entra em declínio) de íons cálcio o que pode ser um indicativo da biocompatibilidade deste material⁴⁷.

No Brasil, recentemente, a Ângelus desenvolveu e lançou no mercado o MTA Fillapex para ser utilizado como cimento endodôntico obturador de canais radiculares. Segundo o fabricante, este material apresenta como vantagens baixa solubilidade, capacidade osteocondutora, selamento marginal adequado, excelente viscosidade, alta radiopacidade e tempo de trabalho satisfatório para ser utilizado na obturação de canais radiculares. Recentemente, foi demonstrado que o MTA Fillapex apresenta boa atividade antimicrobiana contra o *Enterococcus faecalis*⁴⁹. Além disso, foi observado que este cimento é biocompatível e estimula a mineralização em tecido subcutâneo de ratos²⁶. Em contrapartida, o MTA Fillapex apresentou altos níveis de citotoxicidade em culturas usando células L929⁵⁴.

Em virtude de o MTA Fillapex ser um cimento recentemente desenvolvido, até o presente momento, são escassas as pesquisas realizadas para a comprovação da efetividade das propriedades físicas, químicas e biológicas deste material. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a resposta tecidual ao implante de um cimento à base de MTA, o MTA Fillapex, no subcutâneo de ratos, com o objetivo de verificar a biocompatibilidade deste produto e compará-lo ao MTA-Ângelus branco, AH Plus e o Fill Canal.

2 Objetivo

O presente estudo teve por objetivo avaliar a reação provocada pelo MTA Fillapex[®] Ângelus e por dois diferentes cimentos endodônticos (AH Plus[®] e o Fill Canal[®]) e um material selador (MTA Branco[®]) no tecido subcutâneo de ratos. Para isso, foram realizadas análises morfológicas, morfométrica, imuno-histoquímica e histoquímica da cápsula adjacente aos materiais implantados no subcutâneo.

3 Material e Método

3.1 Animais

O protocolo da presente pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Proc. CEUA nº 27 /2010)(ANEXO).

No presente estudo, foram utilizados 80 ratos, da linhagem Holtzman, adultos jovens, pesando em média 250g, provenientes do Biotério Central do Campus de Araraquara (UNESP). Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia (UNESP-Araraquara) em gaiolas de polietileno forradas com maravalha, com temperatura ($23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade controladas ($55 \pm 10\%$) e fotoperíodo de 12 horas (período de luz: 7:00 - 19:00 hs). Os animais receberam ração (Guabi Nutri Labor, Brasil) e água *ad libitum*. A limpeza das gaiolas foi realizada, no mínimo, 3 vezes por semana. As gaiolas foram lavadas e forradas com maravalha limpa; os animais foram monitorados diariamente.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais de acordo com o material testado (Quadro 1). Em cada animal, um tubo de polietileno preenchido com MTA Fillapex[®], MTA Branco[®], AH Plus[®] ou Fill Canal[®] foi implantado no subcutâneo dorsal. Cada material foi implantado em 20 ratos que foram sacrificados aos 7, 15, 30 e 60 dias após à cirurgia; dessa maneira, foram utilizados 5 animais para cada material por período.

Quadro 1 – Composição e procedência dos materiais estudados

Material	Composição	Indústria
MTA Fillapex [®]	Resina salicilato, resina diluente, resina natural, óxido de bismuto, sílica nanoparticulada, MTA, pigmentos	Ângelus, Londrina, PR
MTA-Ângelus Branco [®]	80% Cimento Portland 20 % óxido de bismuto	Ângelus, Londrina, PR
AH Plus [®]	Pasta A: resina epóxica Bisphenol-A, resina epóxica Bisphenol-F, tungstato de cálcio, óxido de zircônio, sílica, pigmentos de óxido de ferro PastaB: dibenzildiamine, aminoadamantane, tricyclodecane-diamine, tungstato de cálcio, oxido de zircônio, sílica, óleo de silicone	Dentsply, De Trey, Suíça
Fill Canal [®]	Pó: óxido de zinco, resina Staybelite, subcarbonato de bismuto, sulfato de bário, borato de sódio anidro Líquido: eugenol, óleo de amêndoas doce	Technew, Rio de Janeiro, RJ

3.2 Procedimento cirúrgico

Os materiais foram manipulados e inseridos em tubos de polietileno de 10 mm de comprimento por 1,5 mm de diâmetro, previamente esterilizados em óxido de etileno²³. A proporção dos materiais foi realizada da seguinte maneira: MTA Fillapex[®] preparado diretamente pelo seu auto-mix, MTA Branco[®] em uma proporção de 3:1 (3 partes de pó para 1 de água destilada), AH Plus[®] na proporção de 1:1 com comprimentos iguais de pasta base e pasta catalisadora e o Fill Canal[®] na proporção pó:líquido de 2:1).

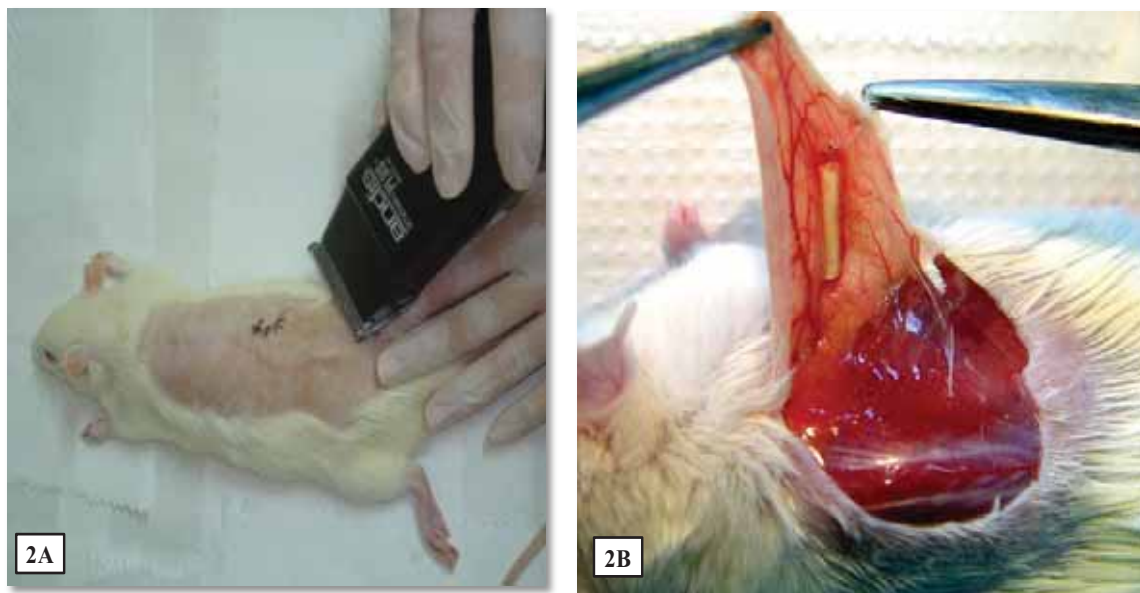
Os animais foram anestesiados com 0,08mL/100g de peso corporal de Cloridrato de Ketamina[®] 10% (Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda - Brasil) associada uma dose de 0,04mL/100g de peso corporal de Cloridrato de Xilazina[®] 2% (União Química Farmacêutica Nacional S/A - Brasil), administrada por via intraperitoneal com seringa de insulina.

Após a tricotomia (Figura 1A) e assepsia com solução de iodo a 5% da região dorsal do rato, realizou-se uma incisão de 2 cm com uma lâmina de bisturi nº 15 (Figura 1B), orientando-se na direção da cabeça para a cauda. O tecido foi divulsionado com auxílio de uma tesoura de ponta romba (Figura 1C) criando-se uma bolsa no subcutâneo; nesta bolsa foi, posteriormente, inserido o tubo de polietileno preenchido com um dos materiais (Figuras 1D e 1E). O local da incisão foi suturado com pontos simples utilizando fio de seda (Seda 4-0, ETHICON[®], São José dos Campos, SP-Brasil) (Figura 1F).

Os animais foram, colocados em gaiolas, devidamente identificados de acordo com o grupo e o período experimental, sendo observados até a recuperação da anestesia. Para maior conforto pós-operatório dos animais, foi administrada dipirona sódica (dose de 0,03 mg para cada 100 g de peso corporal) nos 3 primeiros dias após a cirurgia.



FIGURAS 1A – 1F – Seqüência cirúrgica da inserção do implante no subcutâneo da região dorsal do rato. A FIGURA 1A – animal anestesiado em decúbito ventral para realização da tricotomia da região dorsal, região onde serão colocados os tubos de polietileno com os cimentos. A FIGURA 1B – após a assepsia, com uma lâmina de bisturi foi realizada uma incisão de aproximadamente 2cm no plano mediano, no sentido da cabeça-cauda. A FIGURA 1C – divulsão do tecido com tesoura de ponta romba para criação da loja/bolsa cirúrgica para inserção dos tubos de polietileno. A FIGURA 1D – ilustra o local onde o tubo de polietileno será colocado na bolsa cirúrgica criada no subcutâneo. A FIGURA 1E – com uma pinça, o tubo de polietileno é inserido na bolsa cirúrgica. FIGURA 1F – após a inserção do implante no subcutâneo, a sutura foi realizada com fio de seda.



FIGURAS 2A e 2B – O rato anestesiado, em posição decúbito ventral, no momento da remoção do implante no subcutâneo. FIGURA 2A – tricotomia na região dorsal onde o implante foi colocado. FIGURA 2B – após a assepsia, remoção de uma porção da pele contendo o tubo de polietileno implantado no subcutâneo.

3.3 Processamento histológico

Após os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados com *overdose* de anestésico (600mg/kg de hidrato de cloral - Vetec[®], Brasil). Realizou-se a tricotomia na região dorsal do rato (Figura 2A) e, subseqüentemente, os tubos implantados no subcutâneo, juntamente com os tecidos adjacentes foram removidos (Figura 2B) e as peças foram, imediatamente, fixadas em formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1M e pH 7,2. Após 48 horas, as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina para obtenção de cortes longitudinais dos implantes no subcutâneo.

Após a inclusão na parafina, os blocos contendo os implantes e o tecido conjuntivo adjacente foram cortados com auxílio de um micrótomo (Micron, modelo HM 325). Cortes com 6µm de espessura foram aderidos a lâminas de vidro e corados com Hematoxilina de Carazzi e Eosina (H&E).

3.4 Método de análise

3.4.1 Análise Morfológica

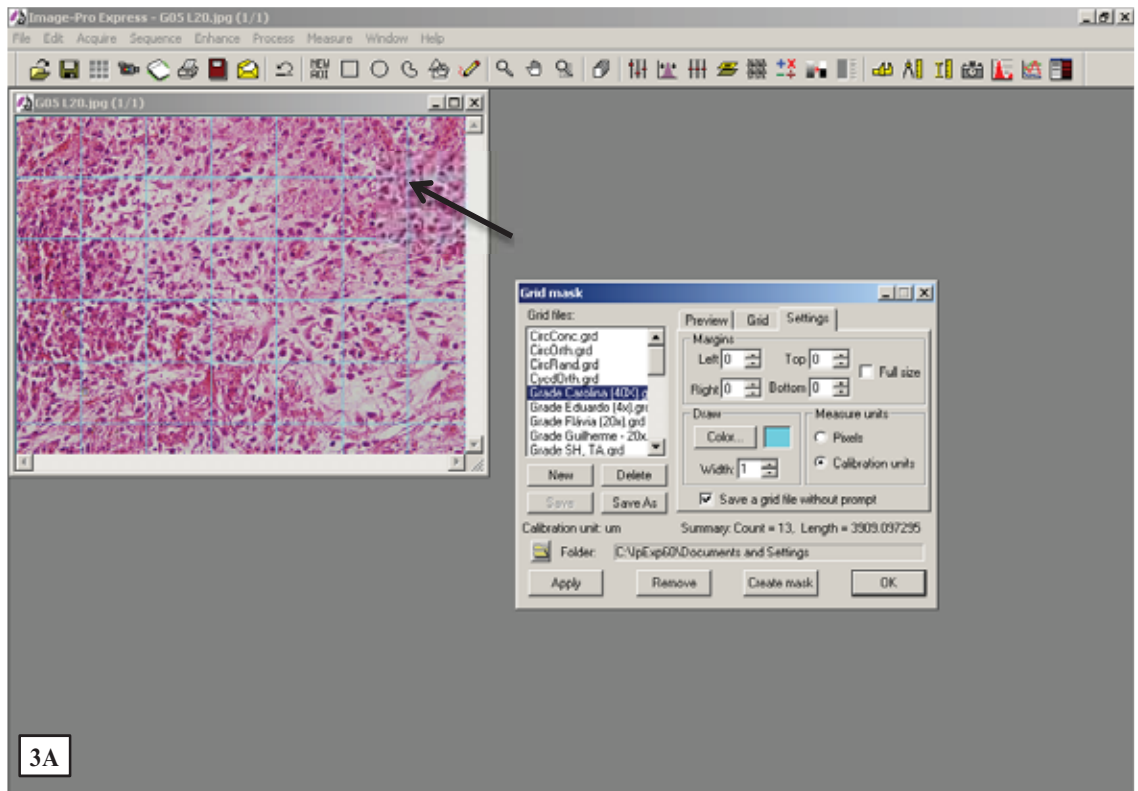
Os cortes semi-seriados dos implantes corados com hematoxilina & eosina (H&E) foram utilizados para a descrição morfológica da reação provocada pelos materiais no subcutâneo. Na análise morfológica, foi avaliada a presença do processo inflamatório na cápsula, bem como a sua extensão; considerou-se também o tipo de tecido conjuntivo que constituía a cápsula, presença de vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras colágenas.

3.4.2 Densidade numérica de células inflamatórias

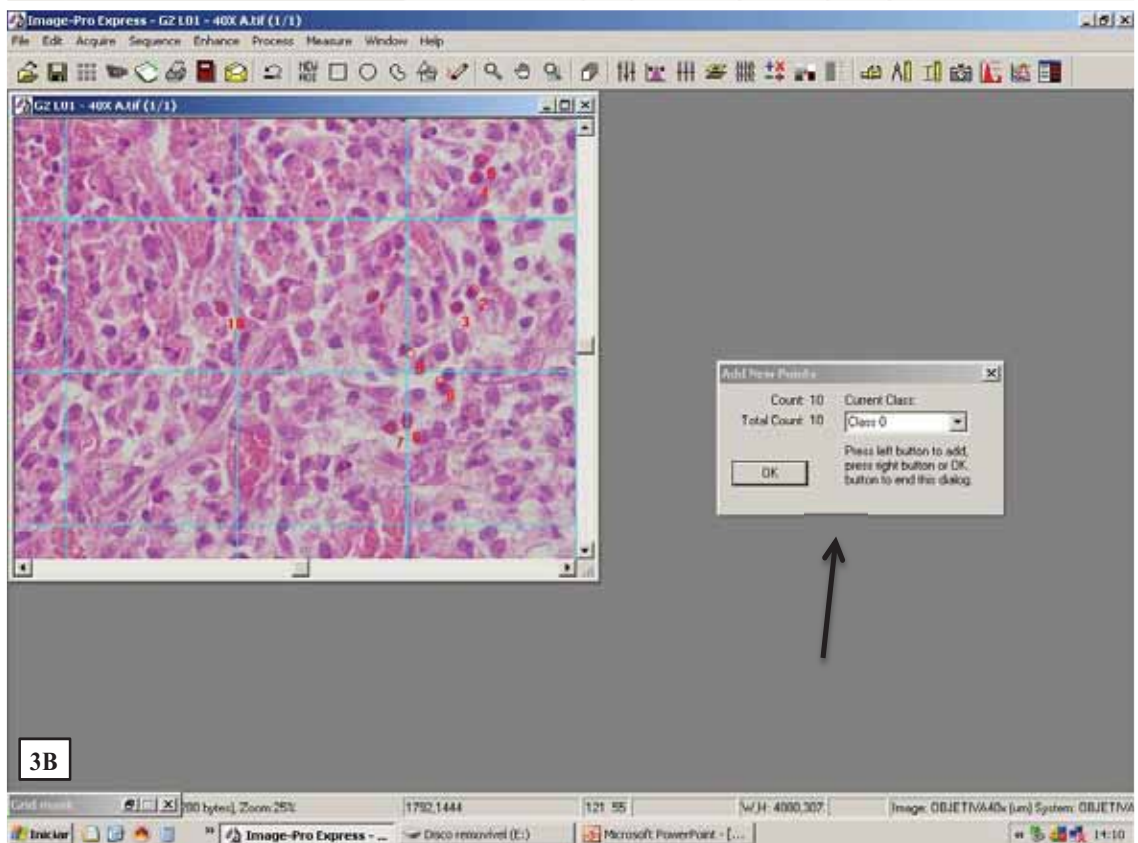
O número de células inflamatórias na cápsula adjacente ao material implantado foi estimado. Foram quantificados 3 cortes de cada animal, mantendo-se um intervalo mínimo de 100 µm entre os cortes. Com auxílio de uma câmera (DP-71, Olympus[®] – Japão) acoplada ao microscópio de luz (Olympus[®], modelo BX-51), em

aumento de 40x, imagens da cápsula adjacente aos materiais implantados foram capturadas. Posteriormente, com um programa de análise de imagens (Image-Pro Express 6.0, Olympus[®] – Japão), foi realizada a contagem de células inflamatórias, em cada corte, em uma área teste de aproximadamente 0,09mm² da cápsula (Figuras 3A e 3B). O valor total de células inflamatórias em cada animal (obtido a partir das áreas dos três cortes/animal) foi dividido pela área total (0,27mm²) obtendo-se, assim, um valor de células inflamatórias/mm². Ao final, foi estabelecida uma média para cada grupo experimental de acordo com o período experimental e o material estudado.

Os resultados quantitativos obtidos foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific, Sausalito, CA). Aos dados foi aplicado o teste estatístico paramétrico ANOVA para comparação dos diferentes grupos entre si dentro de cada período experimental. Posteriormente, quando observada diferença significativa em nível de 5%, realizou-se a comparação entre os materiais, dois a dois, pelo teste de comparações múltiplas de Student-Newman-keuls.



3A



3B

A FIGURAS 3A e 3B – Imagens do programa Image-Pro Express 6.0 (Olympus – Japão) utilizado para quantificação das células inflamatórias. A FIGURA 3A mostra a tela inicial do programa contendo a imagem captura em 40x (seta). Uma grade é sobreposta à imagem para auxiliar na contagem das células inflamatórias. A FIGURA 3B mostra a imagem ampliada através do zoom, com a grade aplicada e algumas células computadas que aparecem numeradas. Na janela lateral (seta) o número de células inflamatórias computadas é registrado pelo programa.

3.4.3 Imuno-histoquímica para marcação de macrófagos

Alguns cortes dos implantes foram aderidos às lâminas silanizadas (3-aminopropylthoxysilane – Sigma-Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO) para a realização da reação imuno-histoquímica marcação de macrófagos na cápsula. Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos em tampão citrato de sódio 0,001M (pH 6,0) e submetidos ao tratamento com micro-ondas, durante 20 minutos a temperatura de 90-94 °C. Após o resfriamento, procedeu-se a inativação da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% durante 20 minutos. Os cortes foram lavados em tampão Tris-HCl 0,05M (pH 7,5) e, posteriormente, foram tratados com BSA (albumina de soro bovino) a 2%, durante 20 minutos. Após lavagens em Tris-HCl, os cortes foram incubados em câmara úmida a 4°C com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-macrófago (MAC387 - macrophage marker mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology®, USA); a titulação usada foi de 1:120 e os cortes permaneceram incubados por 18 horas.

No dia seguinte, após lavagem em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado anti-IgG de camundongo/rato/cabra biotilado (Kit Dako LSAB+ System-HRP, Dako, USA) por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão Tris-HCl, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-peroxidase durante 30 minutos. Os cortes foram lavados com tampão Tris-HCl, a atividade da peroxidase foi revelada com solução de 3.3-diaminobenzidina (Betazoid DAB Chromogen Kit – Biocare Medical, USA) durante 5 minutos e, subseqüentemente, foi realizada a contra coloração com hematoxilina de Carazzi. Como controle negativo, os cortes foram submetidos às mesmas etapas, exceto a incubação com o anticorpo primário; nesta etapa, os cortes foram incubados com soro bovino não imune.

3.4.4 Técnica histoquímica de von Kossa

Cortes dos implantes com a cápsula de tecido conjuntivo foram também submetidos à técnica de Von Kossa, para detectar uma possível precipitação de fosfato de cálcio no tecido adjacente ao material (Behmer et al⁷, 1976; Junqueira, Junqueira, 1983). Após desparafinização e hidratação, os cortes foram imersos na solução de nitrato de prata a 5%, durante 1 hora, sob a ação de uma lâmpada incandescente (100 Watts). As lâminas foram lavadas em água deionizada por 3 min e em seguida, imersas em solução de hipossulfito de sódio a 5% por 5 min. Em seguida, os cortes foram lavados em água deionizada durante 5 min e, então, corados pelo Picrosirius e montados em meio resinoso (*Permunt*®, *Fisher Scientific, New Jersey, USA*).

4 Resultado

4.1 Análise morfológica

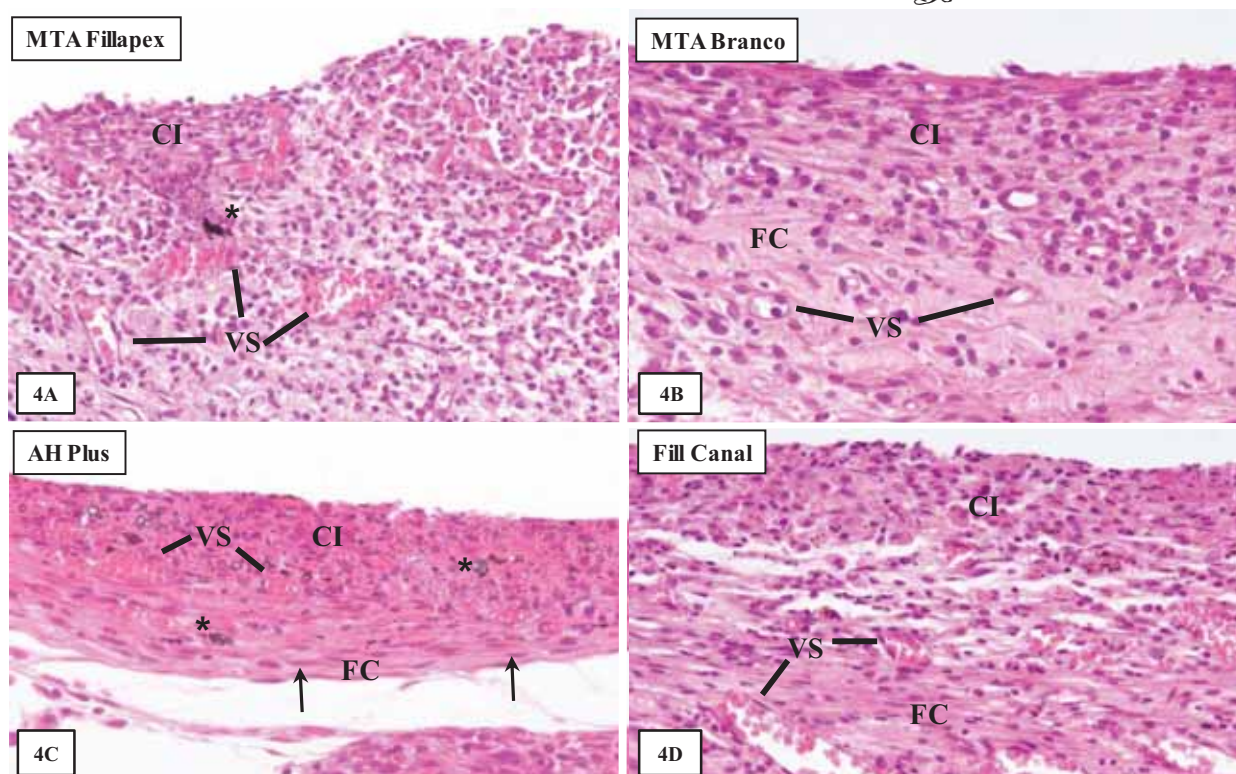
Aos 7 dias, os implantes contendo os materiais endodônticos (MTA Fillapex, MTA Branco, AH Plus e Fill Canal) induziram, no subcutâneo de ratos, a formação de uma cápsula de tecido conjuntivo contendo, invariavelmente, muitas células inflamatórias mononucleadas (Figuras 4A-4D). Frequentemente, partículas de cimento foram observadas dispersas nas cápsulas que envolviam o MTA Fillapex e o AH Plus (Figuras 4A e 4C).

No período de 15 dias, as cápsulas que envolviam os cimentos MTA Fillapex, AH Plus e Fill Canal apresentavam evidente e intenso processo inflamatório, contendo células mononucleadas, principalmente, linfócitos e macrófagos (Figuras 5A, 5C e 5D). Frequentemente, as cápsulas exibiam ainda diversos vasos sanguíneos distribuídos irregularmente (Figuras 5A, 5C e 5D); além disso, presença de partículas de cimento foi encontrada na cápsula do grupo AH Plus (Figura 5C). A cápsula formada em resposta ao MTA Branco apresentava características morfológicas evidentemente distintas; a cápsula exibia típicos fibroblastos dispostos entre feixes de fibras colágenas que pareciam circundar o material selador que preenchia os tubos de polietileno. As células inflamatórias mononucleadas estavam restritas a uma pequena faixa da cápsula mais próxima ao material (Figura 5B).

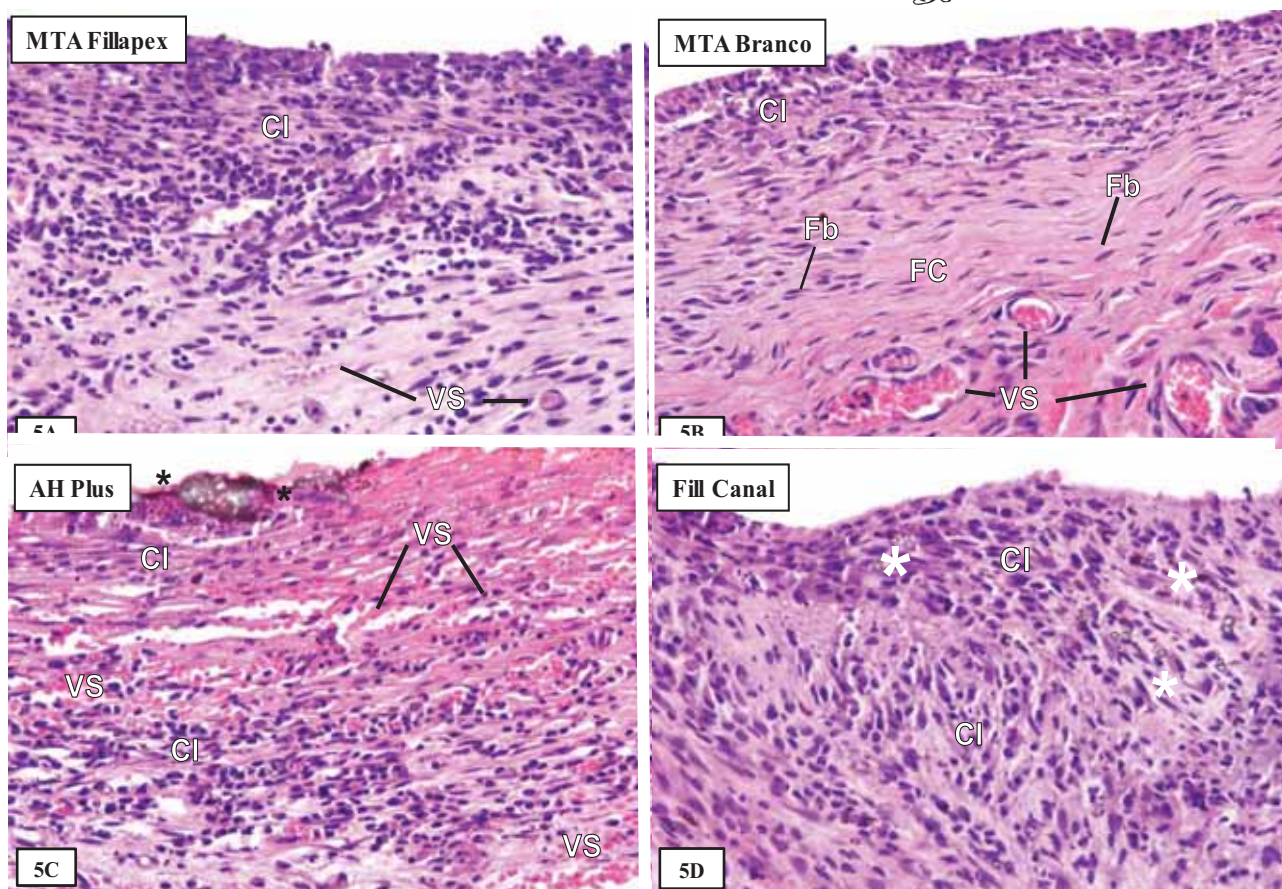
Aos 30 dias, o MTA Fillapex, MTA Branco e o AH Plus apresentavam-se envolvidos por cápsulas constituídas, principalmente, por fibroblastos situados entre feixes de fibras colágenas. As células inflamatórias estavam restritas à porção mais interna da cápsula, ou seja, adjacente aos implantes (Figuras 6A, 6B e 6C). No entanto, inúmeras células inflamatórias mononucleadas foram observadas por toda extensão das cápsulas que envolviam o Fill Canal (Figura 6D).

Aos 60 dias, escassas células inflamatórias foram observadas nas cápsulas que envolviam os materiais MTA Fillapex, MTA Branco e AH Plus (Figuras 7A - 7C). A cápsula formada em resposta ao MTA Branco estava constituída por um

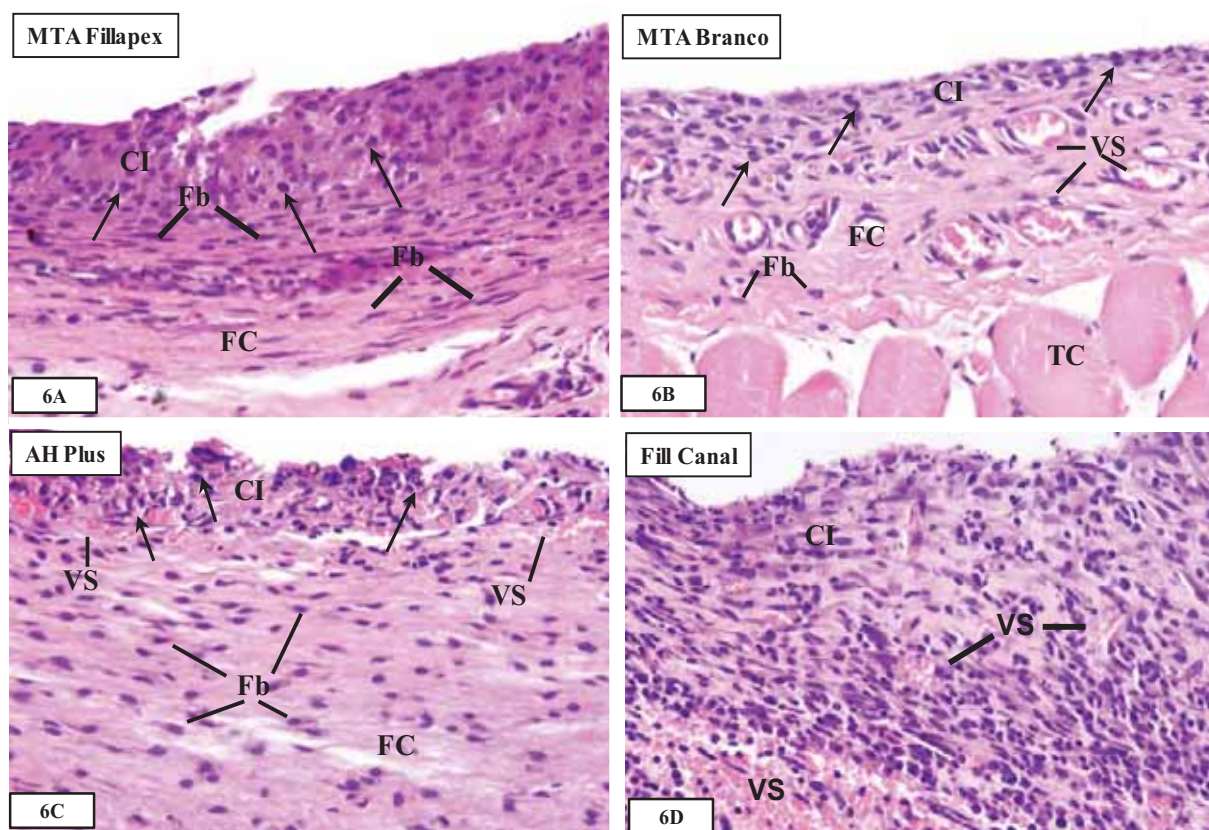
típico tecido conjuntivo denso, exibindo, portanto, muitos feixes de fibras colágenas entre os fibroblastos (Figura 7B). O tecido conjuntivo que constituía as cápsulas adjacentes aos cimentos MTA Fillapex e AH Plus apresentava-se ricamente vascularizado e exibia predomínio de células (Figuras 7A e 7C). Frequentemente, partículas do cimento AH Plus estavam dispersas na cápsula (Figura 7C). Um intenso processo inflamatório persistia na cápsula formada em resposta ao Fill Canal (Figura 7D). Partículas de cimento dispersas pela cápsula foram observadas nos grupos MTA Fillapex, AH Plus e Fill Canal (Figuras 7A, 7C e 7D).



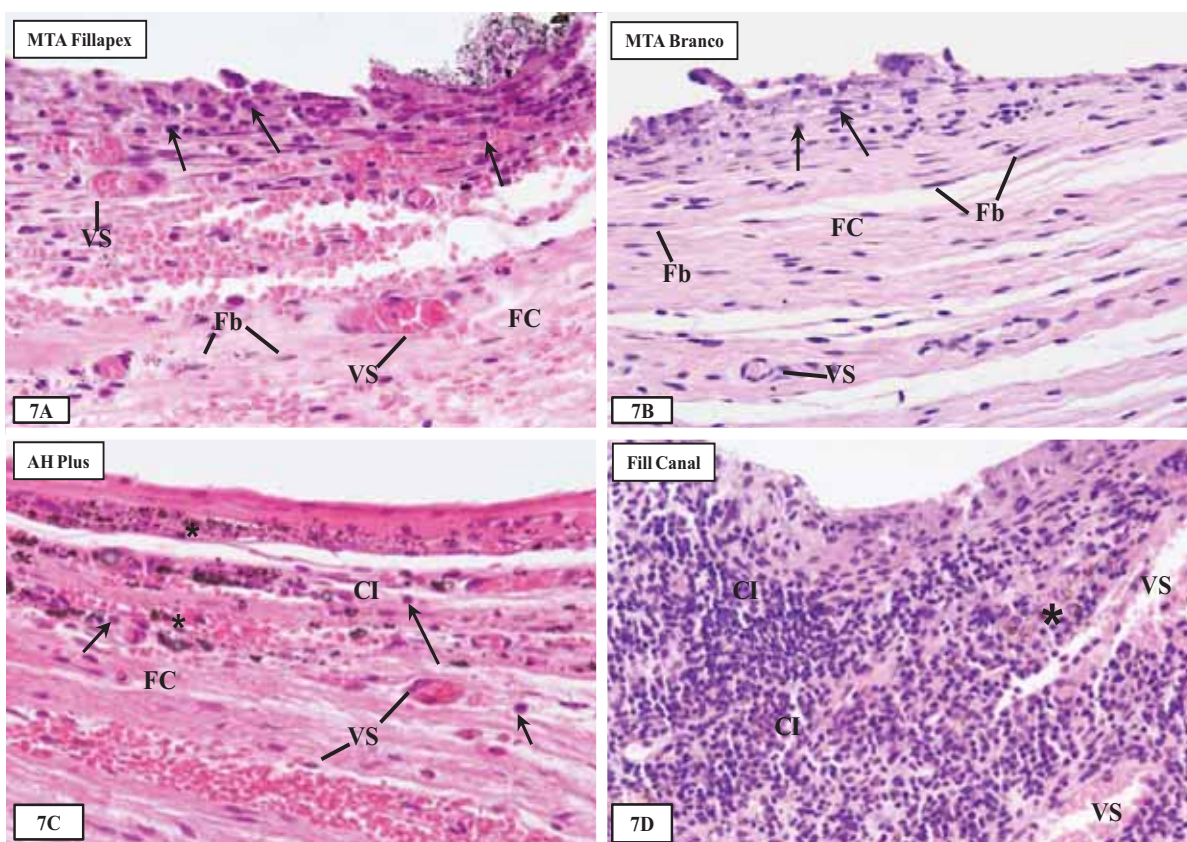
FIGURAS 4A–4D – Fotomicrografias mostrando cortes de porções da cápsula de tecido conjuntivo formada adjacente aos cimentos MTA Fillapex (FIGURA 4A), MTA Branco (FIGURA 4B), AH Plus (FIGURA 4C) e Fill Canal (FIGURA 4D) após 7 dias ao implante no subcutâneo. FIGURA 4A – inúmeras células inflamatórias (CI) e diversos vasos sanguíneos exibindo ampla luz (VS) ocupam uma grande extensão da cápsula; remanescentes do material implantado (asteriscos). 250x. FIGURA 4B – algumas células inflamatórias (CI) e pequenos vasos sanguíneos (VS) estão dispersos pela cápsula. Feixes de fibras colágenas (FC) são observados na porção mais externa da cápsula. 290x. FIGURA 4C – células inflamatórias (CI) estão presentes, principalmente, na porção mais interna da cápsula; vasos sanguíneos (VS) e partículas de material (asteriscos) dispersas na cápsula são também observadas. Fibroblastos (Fb) (setas) dispostos entre feixes de fibras colágenas (FC) estão na porção mais externa da cápsula. 270x. FIGURA 4D – o tecido conjuntivo exibe diversas células inflamatórias (CI), vasos sanguíneos com luz ampla (VS) e fibras colágenas (FC). 260x.



FIGURAS 5A-5B - Fotomicrografias mostrando cortes de porções da cápsula de tecido conjuntivo formada adjacente aos cimentos MTA Fillapex (FIGURA 5A), MTA Branco (FIGURA 5B), AH Plus (FIGURA 5C) e Fill Canal (FIGURAS 5D) após 15 dias ao implante no subcutâneo. FIGURA 5A – intenso processo inflamatório (CI) é observado junto ao material implantado. VS, vasos sanguíneos. 260x. FIGURA 5B – o tecido conjuntivo adjacente ao implante exibe leve processo inflamatório (CI). Na porção mais externa da cápsula, fibroblastos (Fb) estão situados entre feixes de fibras colágenas (FC); vasos sanguíneos (VS) exibindo ampla luz são também observados. 260x. FIGURA 5C – o tecido conjuntivo ricamente vascularizado (VS) apresenta diversas células inflamatórias (CI). Presença de partículas de material (asteriscos) na cápsula. 250x. FIGURA 5D – inúmeras células inflamatórias (CI) estão presentes por toda extensão da cápsula. 260x.



FIGURAS 6A-6D – Fotomicrografias mostrando cortes de porções da cápsula de tecido conjuntivo formada adjacente aos cimentos MTA Fillapex (FIGURA 6A), MTA Branco (FIGURA 6B), AH Plus (FIGURA 6C) e Fill Canal (FIGURA 6D) após 30 dias ao implante no subcutâneo. FIGURA 6A – a cápsula apresenta uma extensa faixa de tecido conjuntivo contendo inúmeras células (CI); Vasos sanguíneos (VS) células inflamatórias mononucleadas (setas) estão situadas, principalmente, na porção mais próxima ao cimento. Note que fibroblastos (Fb) parecem circundar as células inflamatórias. A porção mais externa da cápsula está constituída por fibroblastos (Fb) entremeados por feixes de fibras colágenas (FC). 270x. FIGURA 6B – algumas células inflamatórias mononucleadas (setas) são observadas na porção da cápsula mais próxima ao cimento implantado. Fibroblastos (Fb) entre feixes de fibras colágenas (FC) e vasos sanguíneos (VS) estão presentes na maior extensão da cápsula. TC, tecido muscular. 260x. FIGURA 6C – células inflamatórias mononucleadas (setas) estão presentes na porção mais interna da cápsula (CI). Note que a maior extensão da cápsula é constituída por tecido conjuntivo contendo fibroblastos (Fb) entre feixes de fibras colágenas (FC) com arranjo organizado. 260x. FIGURA 6D – inúmeras células inflamatórias mononucleadas (CI) são observadas por toda extensão da cápsula. VS, vasos sanguíneos. 240x.



FIGURAS 7A-7D- Fotomicrografias mostrando cortes de porções da cápsula de tecido conjuntivo formada adjacente aos cimentos MTA Fillapex (FIGURA 7A), MTA Branco (FIGURA 7B), AH Plus (FIGURA 7C) e Fill Canal (FIGURA 7D) após 60 dias ao implante no subcutâneo. FIGURA 7A – a cápsula, constituída por tecido conjuntivo frouxo, apresenta muitos vasos sanguíneos (VS); algumas células inflamatórias (setas) estão presentes na porção da cápsula próxima ao cimento. Na porção mais externa da cápsula, presença de fibroblastos (Fb) entre alguns feixes de fibras colágenas (FC). 270x. FIGURA 7B – a cápsula está constituída por tecido conjuntivo denso; fibroblastos (Fb) estão dispersos entre feixes de fibras colágenas (FC). Escassas células mononucleadas inflamatórias (setas) estão restritas à superfície da cápsula em contato com o cimento. 260x. FIGURA 7C – uma delgada faixa de tecido conjuntivo denso (TD), rico em fibras colágenas, é observada em contato com o cimento. Em sua maior extensão, a cápsula apresenta diversos vasos sanguíneos (VS) entre feixes de fibras colágenas (FC). Note que algumas células mononucleadas inflamatórias (setas) estão dispersas pela cápsula; partículas do cimento (asteriscos) também são observadas dispersas pela cápsula. 260x. FIGURA 7D – presença predominante de células mononucleadas inflamatórias por toda extensão do tecido conjuntivo que constitui a cápsula formada em resposta ao Fill Canal; partículas do cimento (asteriscos) também são observadas dispersas pela cápsula. VS, vasos sanguíneos. 260x.

4.2 Densidade numérica de células inflamatórias

O número de células inflamatórias (CI) no tecido conjuntivo subcutâneo adjacente aos materiais implantados (cápsula), nos diferentes períodos, pode ser observado nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 e Figura 8.

A análise dos resultados mostra que todos os materiais avaliados induziram, em todos os períodos experimentais, o aparecimento de células inflamatórias na cápsula formada em resposta aos materiais implantados.

Aos 7 dias, foram encontradas numerosas células inflamatórias nas cápsulas que envolviam os implantes em todos os grupos estudados. Nos grupos MTA Branco, AH Plus e Fill Canal, o número destas células foi menor, em comparação ao MTA Fillapex, entretanto, apenas no grupo AH Plus, esta redução foi estatisticamente significativa (Tabela 1, Figura 8).

Aos 15 dias, houve um aumento significativo no número de células inflamatórias nos grupos estudados, exceto no MTA Branco. Neste grupo, o número de células foi semelhante ao período de 7 dias (Tabela 5). O grupo MTA Fillapex foi o que apresentou o maior número de células inflamatórias; em seguida, os grupos Fill Canal, AH Plus e MTA Branco, o qual apresentou o menor número de células em comparação aos demais grupos. As diferenças entre todos os grupos foram estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$) (Tabela 2, Figura 8).

Aos 30 dias, com exceção do grupo Fill Canal, o número de células inflamatórias reduziu significativamente em todos os demais grupos, em comparação aos 15 dias. No grupo Fill Canal, o número destas células manteve-se praticamente constante do 15° ao 30° dia (Tabela 5). Portanto, o grupo Fill Canal foi o que apresentou o maior número de células inflamatórias (estatisticamente significativa), em comparação aos demais grupos e, em seguida, o grupo MTA Fillapex. Os grupos que apresentaram o menor número de células inflamatórias, neste período, foram os grupos MTA Branco e AH Plus, os quais não diferiram significativamente entre si. Entretanto,

no grupo MTA Branco, o número de células foi significativamente menor em comparação ao MTA Fillapex (Tabela 3, Figura 8).

No período de 60 dias, com exceção do grupo Fill Canal, houve uma redução significativa de 46%, 65% e 81%, respectivamente, no número de células inflamatórias dos grupos MTA Branco, MTA Fillapex e AH Plus, em comparação aos 30 dias (Tabela 5). Por outro lado, no grupo Fill Canal, o número destas células aumentou significativamente (27%), em comparação aos 30 dias. Embora os três grupos: MTA Fillapex, MTA Branco e AH Plus tenham apresentado um menor processo inflamatório ao redor dos implantes, no grupo AH Plus, este processo foi significativamente menor em comparação aos grupos MTA Fillapex e MTA Branco (Tabela 4, Figura 8).

Tabela 1 - Número de células inflamatórias por mm² na cápsula adjacente aos implantes no subcutâneo, no período de 7 dias

Animais	Grupos			
	MTA Fillapex	MTA Branco	AH Plus	Fill Canal
1	1611,1	744,4	318,5	871,3
2	791,3	895,2	637,1	769,2
3	1018,3	895,1	348,3	961,1
4	1025,6	848,6	944,4	1109,2
5	1641,6	762,3	785,18	866,6
Média/DP	1217,5±385,0^a	825,1±67,8^a	606,6± 272,3^{ab}	915,4±127,7^a

DP (Desvio Padrão)

Letras iguais sobrescritas (a) indicam semelhanças entre os grupos

ab: AH Plus foi estatisticamente diferente apenas do MTA Fillapex (p<0,05)

Tabela 2 - Número de células inflamatórias por mm² na cápsula adjacente aos implantes no subcutâneo, no período de 15 dias

Animais	Grupos			
	MTA Fillapex	MTA Branco	AH Plus	Fill Canal
1	2056,3	640,7	979	1375,3
2	2248,1	828,3	1028,3	1464,1
3	2060,3	648,1	1087,6	1749,3
4	1628,3	922,2	1041,9	1513,5
5	2106,1	869,1	1017,2	1327,1
Média/DP	2019,8±232,2^a	781,6±129,6^b	1030,8±39,4^c	1485,8±164,3^d

DP (Desvio Padrão)

Letras diferentes sobrescritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos ($a \neq b \neq c \neq d$)

Tabela 3 - Número de células inflamatórias por mm² na cápsula adjacente aos implantes no subcutâneo, no período de 30 dias

Animais	Grupos			
	MTA Fillapex	MTA Branco	AH Plus	Fill Canal
1	739,5	443,2	896,2	1233,5
2	906,1	481,4	409,8	1295,0
3	854,3	537,0	766,6	1596,2
4	1055,5	580,6	866,6	1230,8
5	1077,7	597,2	650,3	2171,6
Média/DP	926,6±141,5^a	527,88±65,1^b	717,9±197,2^{ab}	1505,4±401,7^c

DP (Desvio Padrão)

Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos ($a \neq b \neq c$) ($ab = a$; $ab = b$)

Tabela 4 - Número de células inflamatórias por mm² na cápsula adjacente aos implantes no subcutâneo, no período de 60 dias

Animais	Grupos			
	MTA Fillapex	MTA Branco	AH Plus	Fill Canal
	282,7	300	117,2	2214,8
2	364,1	269,1	120,9	2116,0
3	429,6	288,8	169,1	2209,8
1	256,7	259,8	180,2	1651,8
5	302,4	301,9	102,5	2114,6
Média/DP	327,1±69,6^a	283,9±18,7^a	137,9±34,3^b	2061,4±234^c

DP (Desvio Padrão)

Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos ($a \neq b \neq c$)

Tabela 5 – Número de células inflamatórias por mm² na cápsula adjacente aos implantes no subcutâneo nos diferentes períodos

Material	Períodos			
	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias
MTA Fillapex	1217,5 ^a ±385,0 ¹	2019,8 ^b ±232,2 ¹	926,6 ^a ±141,5 ¹	327,1 ^c ±69,6 ¹
MTA Branco	825,1 ^a ±67,8 ¹	781,6 ^a ±129,6 ²	527,88 ^b ±65,1 ²	283,9 ^c ±18,7 ¹
AH Plus	606,6 ^a ±272,3 ^{1M}	1030,8 ^b ±39,4 ³	717,9 ^a ±197,2 ¹²	137,9 ^c ±34,3 ²
Fill Canal	915,4 ^a ±127,7 ¹	1485,8 ^b ±164,3 ⁴	1505,4 ^b ±401,7 ³	2061,4 ^c ±234 ³

Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os períodos no mesmo grupo ($a \neq b \neq c$)

Diferentes números sobrescritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos ($1 \neq 2 \neq 3 \neq 4$) ($12=1$; $12=2$)

1M: AH Plus foi estatisticamente diferente apenas do MTA Fillapex ($p < 0,05$)

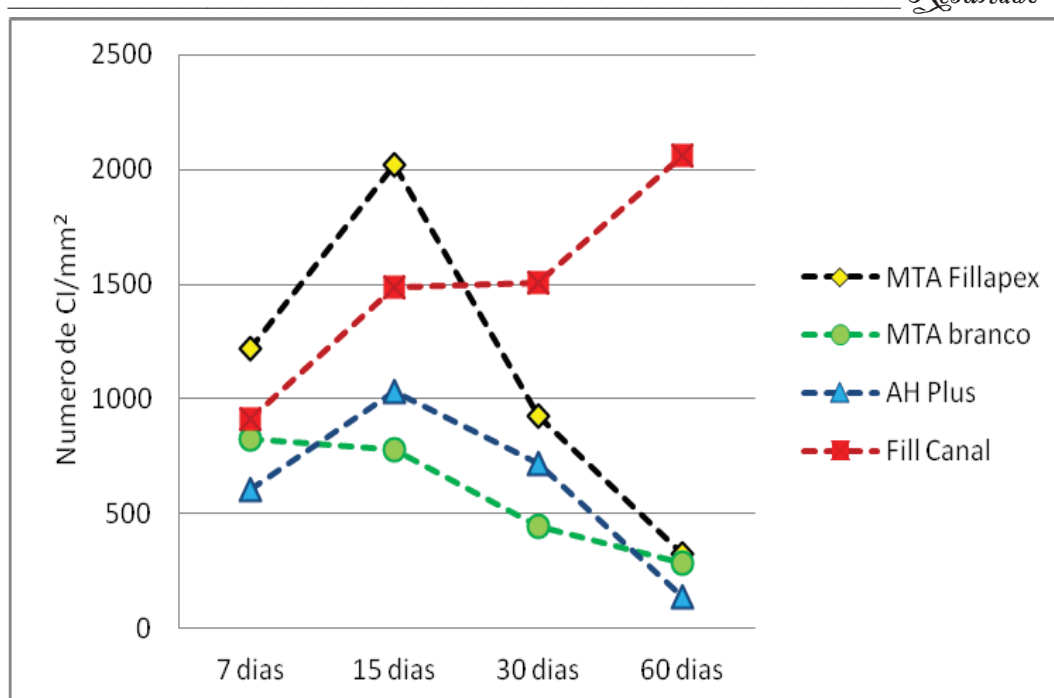
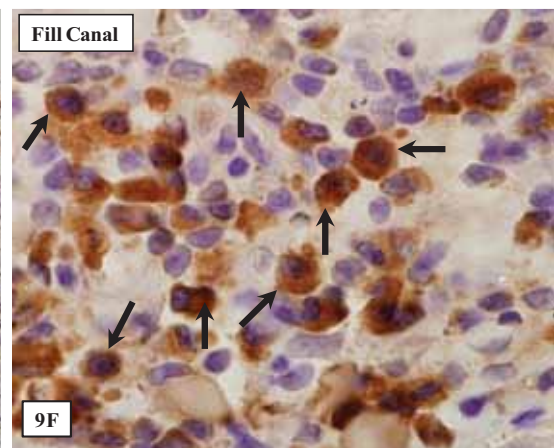
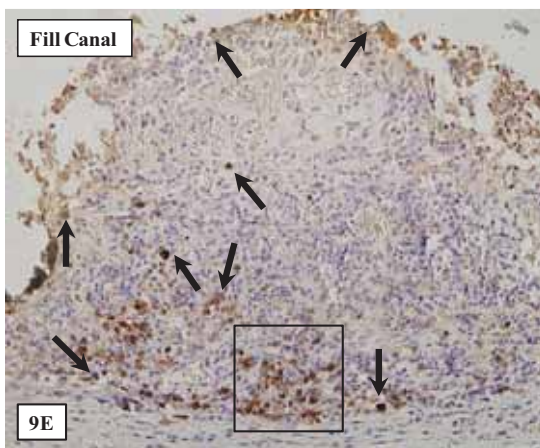
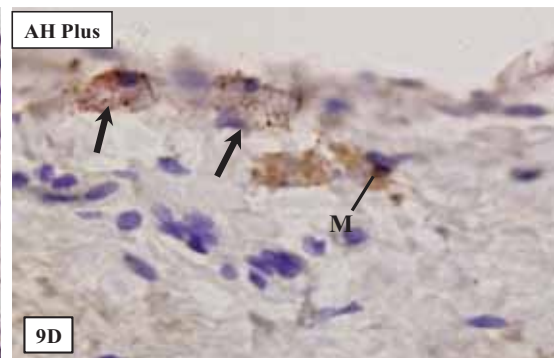
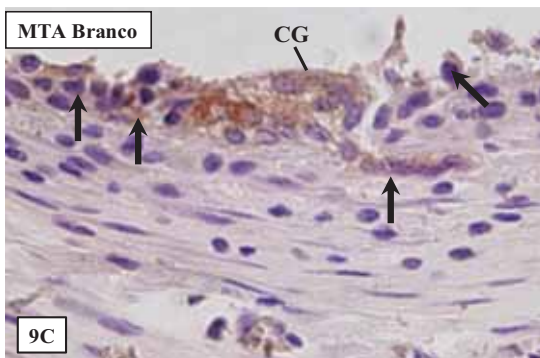
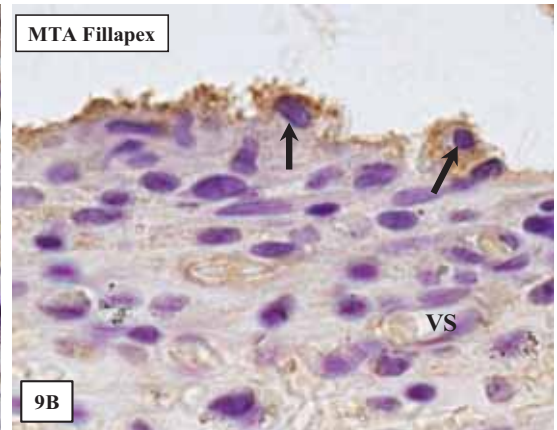
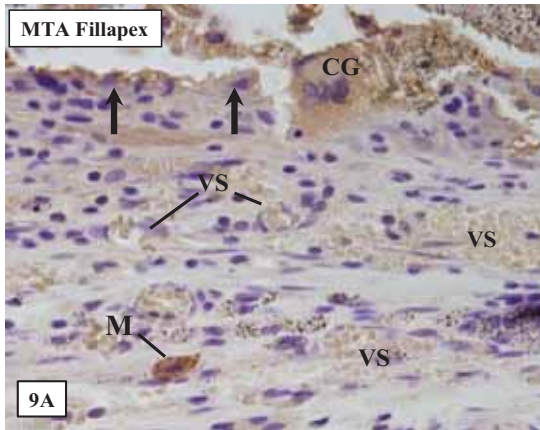


FIGURA 8 – Valores, em média, da densidade numérica de células inflamatórias em cada grupo experimental nos diferentes períodos.

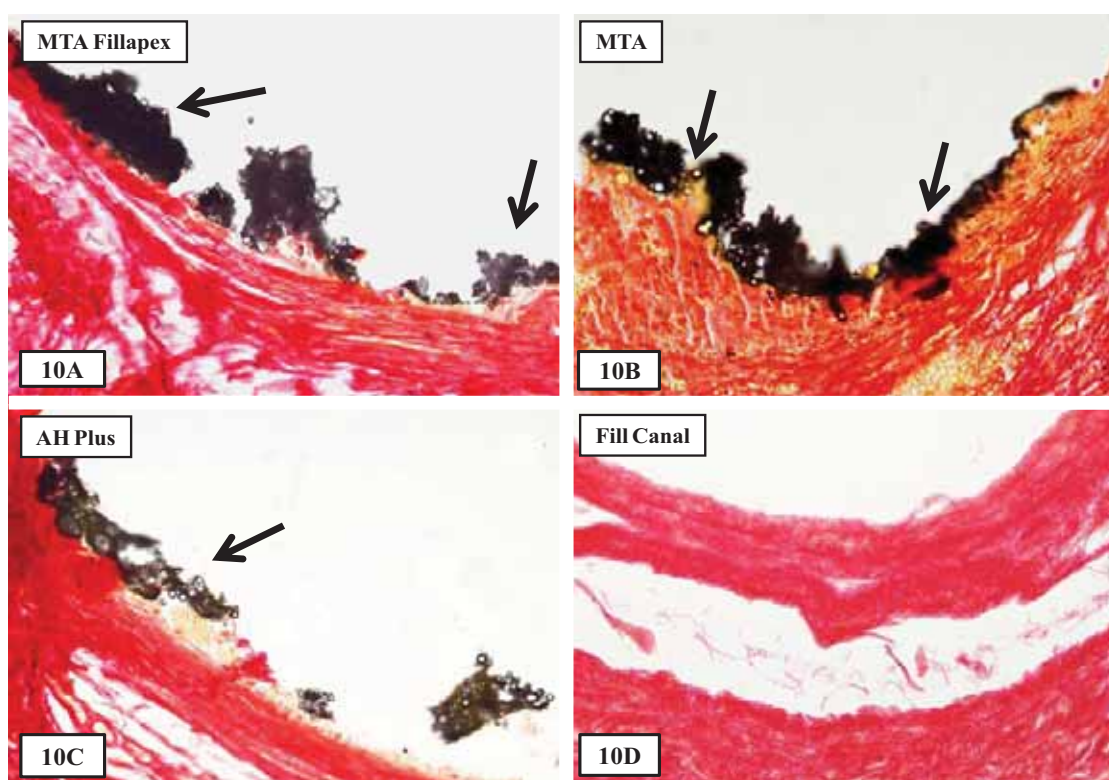
4.3 Imuno-histoquímica para marcação de macrófagos e von Kossa

Alguns cortes dos implantes envolvidos por tecido conjuntivo, no período de 30 dias, submetidos à reação imuno-histoquímica para marcação de macrófagos exibiram células imunopositivas (com coloração castanho) nas cápsulas formadas em resposta a todos os materiais analisados. Algumas células positivas foram observadas na superfície da cápsula em contato com os materiais bem como entre os fibroblastos e partículas de cimento dispersas pela cápsula (Figuras 9A-9E); marcação citoplasmática positiva foi também encontrada em células gigantes multinucleadas (Figuras 9A e 9C). No entanto, inúmeras células imunomarcadas estavam presentes por toda extensão da cápsula que envolvia o cimento Fill Canal (Figura 9E); estas células mononucleadas continham núcleo arredondado ou irregular e conspícua marcação citoplasmática (Figura 9F).

Os cortes submetidos ao método histoquímico von Kossa revelaram a presença de densas estruturas irregulares positivas ao método, impregnadas em negro. Estas estruturas foram observadas nas cápsulas que envolviam o Fillapex, MTA e AH Plus (Figuras 10A-10C). Em contraposição, estruturas positivas ao von Kossa não foram observadas nas cápsulas que envolviam o Fill Canal (Figura 10D).



FIGURAS 9A-9F – Fotomicrografias mostrando cortes de porções de cápsulas adjacentes aos cimentos MTA Fillapex (FIGURAS 9A e 9B), MTA Branco (FIGURA 9C), AH Plus (FIGURA 9D) e Fill Canal (FIGURAS 9E e 9F) após 30 dias ao implante no subcutâneo os quais foram submetidas à reação imuno-histoquímica para marcação de macrófago (em castanho) e contracoradas com hematoxilina. FIGURAS 9A, 9B, 9C e 9D – Macrófagos imunomarcados (setas) são observados na superfície da cápsula, em íntimo contato com o material; células gigantes multinucleadas (CG) também exibem citoplasma imunopositivo (Figuras 9A e 9C). Escassas células (M) exibindo citoplasma imunomarcado são observadas na cápsula. VS, vasos sanguíneos. Figura 9A: 450x; Figura 9B: 1.140x; Figuras 9C e 9D: 630x. FIGURA 9E – A cápsula exibe diversas células imunopositivas (setas) por toda extensão da cápsula. 180x. FIGURA 9F – área demarcada em 9E, mostra diversas células mononucleadas exibindo o citoplasma fortemente o citoplasma fortemente imunopositivo (setas). 860x



FIGURAS 10A-10D – Fotomicrografias mostrando cortes de porções da cápsula de tecido conjuntivo formada adjacente aos cimentos MTA Fillapex (FIGURA 10A), MTA Branco (FIGURA 10B), AH Plus (FIGURA 10C) e Fill Canal (FIGURA 10D) após 60 dias ao implante no subcutâneo os quais foram submetidas à técnica de von Kossa e contracoradas com picrosirius. FIGURAS 10A, 10B e 10C – estruturas fortemente positivas ao von Kossa (em preto) são observadas nas superfícies das cápsulas em íntimo contato com os cimentos MTA Fillapex, MTA Branco e AH Plus. 60x. FIGURA 10D – a cápsula formada em resposta ao Fill Canal apresenta-se negativa ao von Kossa. 60x.

5 Discussão

O Mineral Trióxido Agregado (MTA) surgiu com o objetivo de selar comunicações entre a cavidade pulpar e a superfície externa do dente, sendo indicado, inicialmente, no selamento de perfurações radiculares e em casos de retro-obturações^{40, 64}. Atualmente, principalmente devido a sua excelente biocompatibilidade, o MTA tem sido amplamente utilizado em Endodontia^{16,29, 32,33,34, 66}. Embora este material apresente um bom comportamento biológico, o MTA exibe baixo escoamento e uma consistência arenosa o que impede sua utilização como cimento obturador de canais radiculares⁴⁷. Holland et al.^{29,34} utilizaram o MTA associado a água destilada e ao propilenoglicol como um cimento endodôntico. No entanto, esses autores relataram a dificuldade de manipulação e inserção do MTA, devido a sua consistência arenosa. Em contraposição, o MTA manipulado com o propilenoglicol proporcionou uma mistura pastosa o que facilitou a sua inserção nos canais radiculares. No entanto, os autores relataram a necessidade de pesquisas adicionais a fim de obter melhores resultados, tanto no que se refere as propriedades físico-químicas como biológicas do cimento. Assim, novos materiais têm sido desenvolvidos a partir do MTA cujo objetivo é aliar a biocompatibilidade deste produto com as características físicas e químicas de um cimento obturador de canais radiculares⁴⁷.

O MTA Fillapex, utilizado neste estudo, é um material que contém MTA e foi desenvolvido com o objetivo de ser utilizado na obturação dos canais radiculares. Estudos recentes demonstraram que o MTA Fillapex apresenta boa atividade antimicrobiana⁴⁹. Embora o MTA Fillapex apresente altos níveis de citotoxicidade em culturas usando células L929⁵⁴, mostra-se biocompatível em tecido subcutâneo de ratos²⁶.

Nossos resultados morfológicos mostraram que o MTA Fillapex, no período de 7 dias, teve um comportamento biológico semelhante ao MTA branco e ao Fill Canal, porém inferior ao AH Plus. Estes resultados são sustentados a partir da densidade numérica de células inflamatórias presentes na porção mais interna da cápsula, ou seja, aquela em íntimo contato com o material. Portanto, aos 7 dias, o

número de células infamatórias foi significativamente menor na cápsula adjacente ao AH Plus em comparação aos demais materiais. No entanto, com exceção do MTA branco, todos os demais cimentos promoveram, aos 15 dias, um aumento significativo na densidade numérica de células inflamatórias na cápsula, refletindo, portanto, num processo inflamatório intenso. Além disso, a análise quantitativa revelou que o MTA Fillapex induziu a formação de um processo inflamatório significativamente mais intenso em comparação aos demais materiais. No que se refere ao cimento AH Plus, resultados semelhantes foram encontrados por Silveira⁵⁷. O aumento significativo no número de células inflamatórias, observado aos 15 dias, pode ser, em parte, explicado pela consistência pastosa deste cimento, conferindo-lhe alta capacidade de escoamento⁸, e pelo seu tempo de presa estendido⁴⁷. Estes dois fatores contribuem para a utilização do AH Plus como cimento obturador de canais radiculares, porém, por demorar a tomar presa⁴⁷ e por ter um grande escoamento⁸, há a possibilidade de extravasamento deste cimento do interior do tubo de polietileno para o subcutâneo, induzindo a reação inflamatória, conforme verificado no presente estudo.

O intenso processo inflamatório induzido pelo MTA Fillapex possa ser talvez, pelo menos em parte, devido à presença freqüente de partículas deste cimento dispersas na cápsula. Este cimento possui resina como veículo, tornando-o pastoso e, portanto, conferindo maior escoamento a este material, o que facilita sua utilização como cimento obturador de canais radiculares. Considerando que, no presente estudo, os tubos de polietileno foram preenchidos com MTA Fillapex e, imediatamente, implantados no subcutâneo é possível que tenha ocorrido algum extravasamento deste cimento para a bolsa cirúrgica. A associação de resina, como veículo, pode também ser a responsável pela irritação promovida no subcutâneo, ocasionando uma intensa vascularização, diapedese e migração de leucócitos, instalando-se, dessa maneira, o processo inflamatório. Embora a adição de resinas aos cimentos endodônticos melhore suas propriedades físicas, há evidências de que este componente, de maneira geral, prejudica suas propriedades biológicas^{2,15,69}. Um estudo recente mostrou que o MTA Fillapex apresenta uma grande solubilidade aos 7 dias¹¹ o que poderia explicar a presença de partículas do cimento dispersas na cápsula bem como a resposta promovida no subcutâneo por este cimento até os 15 dias. Estes resultados estão em desacordo com

Gomes-Filho²⁶ que avaliaram a reação tecidual provocada pelo MTA Fillapex no tecido subcutâneo de ratos. Segundo estes autores, o processo inflamatório foi maior aos 7 dias, diminuindo gradativamente até o período de 60 dias. No presente estudo, após os períodos de 7 e 15 dias, ocorreu uma diminuição significativa no número de células na cápsula adjacente aos implantes de MTA Fillapex.

No período de 30 dias, uma redução significativa no processo inflamatório foi verificada junto ao MTA Fillapex, MTA e AH Plus em comparação aos períodos iniciais (7 e 15 dias). No entanto, o número de células inflamatórias na cápsula adjacente ao MTA Fillapex ainda foi maior do que a observada no MTA, porém, diferença significativa não foi verificada entre o MTA Fillapex e o AH Plus. Neste período, as células inflamatórias, principalmente os macrófagos, estavam situadas na superfície mais interna da cápsula, ou seja, na superfície em contato com o cimento; usualmente, os macrófagos nas porções mais externas da cápsula foram observados próximos as regiões contendo partículas de cimento dispersas entre os componentes do tecido conjuntivo. Os macrófagos originam-se a partir dos monócitos que atravessam as paredes dos capilares sanguíneos e, no tecido conjuntivo, diferenciam-se em macrófagos. Os macrófagos são células geralmente arredondadas ou ovóides exibindo núcleos irregulares, freqüentemente riniforme; são as células responsáveis pela fagocitose e digestão de restos celulares, células infectadas, componentes da matriz extracelular e diversas partículas estranhas ao organismo. O início do processo inflamatório é caracterizado pela presença predominante de neutrófilos os quais diminuem com o tempo; em contrapartida, ocorre um aumento de linfócitos e macrófagos⁴.

Ocasionalmente, células gigantes multinucleadas imunopositivas foram também observadas na superfície das cápsulas. Sabe-se que as células gigantes multinucleadas são oriundas da fusão de monócitos/macrófagos⁶⁸, o que justifica a positividade destas células ao anticorpo usado como marcador de macrófagos.

No período de 60 dias, a densidade numérica de células inflamatórias nos implantes de MTA Fillapex foi semelhante ao observado no MTA, resultado semelhante ao de Gomes-Filho²⁶. Deve ser ressaltado que o número de células inflamatórias foi significativamente menor na cápsula adjacente ao AH Plus em comparação aos materiais

à base de MTA, sustentando achados de outros autores que mostraram que este material é biocompatível⁴⁵. No entanto, aos 60 dias, diversas partículas de AH Plus estavam presentes na cápsula, indicando que este cimento apresenta, pelo menos nos períodos iniciais, alta solubilidade¹¹. Após algum tempo, estas partículas parecem que se tornam quase que inertes, pois permanecem no tecido conjuntivo sem estimular uma reação de corpo estranho. No que diz respeito aos materiais à base de MTA, a cápsula formada em resposta ao MTA branco apresentou-se constituída por tecido conjuntivo denso, com fibroblastos dispostos entre os feixes de fibras colágenas com arranjo ordenado. Em contraposição, a cápsula formada em resposta ao MTA Fillapex caracterizava-se pela rica vascularização e pela presença de muitas células, a maioria fibroblastos, entremeadas por poucas fibras colágenas. Estas características indicam que o tecido conjuntivo que envolve o MTA Fillapex ainda contém muitas células e vasos sanguíneos presentes em resposta à reação do material. Estes achados reforçam a idéia que a resina adicionada ao MTA deve interferir nas propriedades biológicas do MTA, promovendo uma reação inflamatória mais intensa e prolongada quando comparada ao MTA branco.

A reação inflamatória provocada pelo MTA branco neste estudo foi semelhante à encontrada em diversos trabalhos realizados no tecido subcutâneo de ratos^{25,26, 32,66}, ou seja, no período inicial de 7 dias, houve um grande número de células inflamatórias o qual foi diminuindo gradualmente até o período de 60 dias. O MTA é composto em 80% por cimento Portland que em contato com a água leva ao surgimento de hidróxido de cálcio¹³. Assim como o hidróxido de cálcio, o MTA apresenta um pH alcalino e promove a liberação de íons cálcio^{17,47} os quais estimulam a produção e secreção de citocinas inflamatórias, tais como, a interleucina-1 e a interleucina-6. Estas citocinas promovem a migração de neutrófilos para a área de tecido lesado caracterizando uma intensa reação inflamatória nos períodos iniciais^{16,55,67}. Posteriormente, os íons cálcio reagem com o carbonato de cálcio presente no tecido formando cristais de calcita⁵³ o que contribui para a diminuição do processo inflamatório³⁰.

O Fill Canal induziu um processo inflamatório crônico; a cápsula formada em resposta a este cimento apresentou um aumento significativo de células

inflamatórias no decorrer dos períodos analisados. Assim, aos 30 dias, inúmeros macrófagos foram observados na cápsula adjacente ao Fill Canal; ao contrário dos demais materiais, os macrófagos estavam dispersos por toda extensão da cápsula, sugerindo que este cimento libera substâncias altamente irritantes ao tecido conjuntivo. Este comportamento irritante apresentado pelos cimentos a base de óxido de zinco e eugenol tem sido relatado por diversos autores^{5,16,21,50}. Segundo alguns autores, isto se deve a liberação lenta e prolongada do eugenol o qual parece se difundir lentamente para as células, causando desnaturação protéica o que leva à perda de função e desintegração celular³⁹; tem sido sugerido que o eugenol pode inibir a respiração celular²¹, além de causar reações hidrofóbicas no citoplasma da célula, causando a sua morte⁴⁶. Os íons zinco, presentes na composição dos cimentos a base de óxido de zinco e eugenol, também parecem ter uma ação secundária na pobre biocompatibilidade deste cimento¹⁹. Estes eventos influenciam na reação inflamatória promovendo a quimiotaxia das células de defesa para o tecido lesado^{5,16,21}. Dessa maneira, a quantidade de eugenol parece influenciar diretamente na intensidade da resposta inflamatória⁴⁸ o que deve explicar os resultados encontrados no presente estudo para o Fill Canal.

Áreas von Kossa-positivas para o cálcio foram observadas no MTA Fillapex, MTA branco e AH Plus, ainda no período de 60 dias, sugerindo que estes materiais podem estimular a formação de estruturas calcificadas no tecido subcutâneo de ratos. No MTA branco e no MTA Fillapex, este resultado tem origem a partir do óxido de cálcio (CaO) presente nestes materiais^{25,26,30}. Quando em contato com a água, há a formação de hidróxido de cálcio o qual se dissocia em íons cálcio e hidroxila. Os íons cálcio participam da ativação da adenosina trifosfatase cálcio-dependente^{23,56} e reagem com o gás carbônico, formando cristais de carbonato de cálcio que serve como nucleação, para a calcificação e favorece a mineralização^{23,56}. As áreas von Kossa-positivas observadas no AH Plus podem estar relacionadas à liberação de íons cálcio proporcionada por este cimento^{11,47} o qual está presente no tungstato de cálcio, um dos seus radiopacificadores¹⁸. A estimulação da formação de tecido mineralizado pelo AH Plus já foi demonstrado por estudos em dentes de cães⁴³.

No tecido subcutâneo adjacente aos implantes contendo Fill Canal, não foram encontradas áreas Von Kossa-positivas em nenhum dos períodos analisados.

Segundo o fabricante, este cimento possui como principais componentes o óxido de zinco (pó) e eugenol (líquido). Além disso, o pó deste material também é composto por subcarbonato de bismuto e sulfato de bário os quais são adicionados para conferir radiopacidade ao material. Estes constituintes apresentam atividade antimicrobiana, porém, são agentes irritantes⁵⁹. Sendo assim, não há na composição do Fill Canal nenhum material capaz de liberar íons cálcio e, portanto, de originar estruturas calcificadas von Kossa positivas.

6 Conclusão

- Apesar de, nos períodos iniciais, induzir uma reação inflamatória significativa, o MTA Fillapex, aos 60 dias, foi biocompatível, similarmente ao MTA branco;
- O cimento AH Plus, em todos os períodos, exibiu melhor resposta biológica, promovendo menor irritação e, conseqüentemente, a formação de um processo inflamatório menor em comparação ao MTA Fillapex;
- Os materiais MTA Fillapex, MTA Branco e AH Plus induziram a formação de estruturas calcificadas aos 60 dias.
- O cimento Fill Canal induziu a formação de um processo inflamatório crônico que aumentou significativamente com o decorrer do tempo, ou seja, de 7 a 60 dias.

7 Referências

1. Ângelus. MTA-Angelus: cimento reparador. Londrina: Ângelus.
2. Al-Hivasat AS, Tawar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. *Int Endod J.* 2010; 43: 148-5.
3. Asgary S, Shahabi S, Jafarzadeh T, Amini S, Kheirieh S. The properties of a new endodontic material. *J Endod.* 2008; 34: 990-3.
4. Baek SH, Hanns PJr, Syngcuk K. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, Super EBA, and MTA as Root-End Filling materials. *J Endod.* 2005; 31: 444-9
5. Batista RFC, Hidalgo MM, Hernandez L, Consolaro A, Velloso TRG, Cuman RKN, et al.. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. *J Biomed Mater Res.* 2007; 81A: 171–7.
6. Becker RM, Hume WR, Wolinsky LE. Release of eugenol from mixtures of Zoe in vitro. *J Pedod.* 1983; 8: 71–7.
7. Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas-Neto AGF. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. In: Behmer OA, Tolosa EMC, Freitas-Neto AGF. Coloração de grânulos intracelulares. Pigmento cálcio – Kossa. São Paulo: EDART, Editora da Universidade de São Paulo; 1976. p. 104.
8. Bernardes RA, de Amorim Campelo A, Junior DS et al. Evaluation of the flow rate of 3 endodontic sealers: Sealer 26, AH Plus, and MTA Obtura. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109: e47-e9.
9. Blackman R, Gross M, Seltzer S. An evaluation of the biocompatibility of a glass ionomer-silver cement in rat connective tissue. *J Endod.* 1989; 15: 76-8.
10. Bogen G, Kuttler S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. *J Endod.* 2009 ; 35: 777-90.

11. Borges R P, Sousa-Neto M D, Versiani M A, Rached-Júnior F A, De-Deus G, Miranda CES, et al. Changes in the surface of four calcium silicate-containing endodontic materials and epoxy resin-based sealer after a solubility test. *Int Endod J.* 2011. December 1-10.
12. Bortoluzzi EA, Duarte MAH, Demarchi ACCO, Bramante CM. The Use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of Mineral Trioxide Aggregate and White Portland Cement. *J Endod.* 2006; 32: 1194–7.
13. Camilleri J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregates. *Int Endod J.* 2007; 40: 462-70.
14. Correa GT, Veranio GA, Silva LE, Hirata Junior R, Coil JM, Scelza MF. Cytotoxicity evaluation of two root canal sealer and a commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by Trypan Blue assay. *J Appl Oral Sci.* 2009; 17: 457-61.
15. Cunha SA, Rached Jr FJA, Alfredo E, Leon JE, Perez DEC. Biocompatibility of sealers used in apical surgery: a histological study in rat subcutaneous tissue. *Braz Dent J.* 2011; 22: 299-305.
16. da Silva GF, Guerreiro-Tanomaru JM, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J.* 2011; 44: 100-10.
17. Duarte MAH, Demarchi ACCO, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SC . pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95: 345-7.
18. Duarte MAH, El Kadre GDO, Vivian RR, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, de Moraes IG. Radiopacity of Portland Cement associated with different radiopacifying agents. *J Endod.* 2009; 35: 737–40.
19. Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod.* 1995; 21: 122–7.

20. Eldeniz AU, Mustafa K, Ørstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J.* 2007; 40: 329-37.
21. Figueiredo JA, Pesce HF, Gioso MA, Figueiredo MAS. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. *Int Endod J.* 2001; 32: 377-85.
22. Garrido AD, Lia RC, França SC, da Silva JF, Astolfi-Filho S, Sousa-Neto MD. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on *Copaifera multijuga* oil-resin. *Int Endod J.* 2010; 43: 283-91.
23. Gomes-Filho JE, Faria MD, Bernabé PFE, Nery MJ, Otoboni-Filho A, Dezan-Júnior E, et al. Mineral trioxide aggregate but no light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. *J Endod.* 2008; 34: 62-5.
24. Gomes-Filho JE, Rodrigues G, Watanabe S, Bernabe PFE, Lodi CS, Gomes AC, et al. Evaluation of the tissue reaction to fast Endodontic Cement (CER) and Angelus MTA. *J Endod.* 2009; 35: 1-4.
25. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PFE, Costa MTM. A Mineral Trioxide Aggregate Sealer stimulated mineralization. *J Endod.* 2009; 35: 256-60.
26. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LTA, Nery MJ, Filho JAO, et al. Rat tissue reaction to MTA Fillapex. *Dent Traumatol.* 2011; 6: 1-5
27. Grossman LI. *Endodontic practice.* 10th ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 1982. 279p.
28. Guerreiro-Tanomaru JM, Duarte MA, Gonçalves M, Tanomaru-Filho M. Radiopacity evaluation of root canal sealers containing calcium hydroxide and MTA. *Braz Oral Res.* 2009; 23: 119-23.
29. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Jr E. Reaction of dogs' teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. *J Endod.* 1999; 11: 728-30.
30. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabe PFE, Dezan Jr E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with Mineral Trioxide Aggregate and Calcium Hydroxide. *J Endod.* 1999; 25: 161-6.

31. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J.* 2001; 12: 3-8.
32. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J.* 2002; 13: 23-6.
33. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabe PFE, Otoboni Filho JA, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J.* 2002; 13: 23-6.
34. Holland R, Mazuqueli L, Souza V, Murata SS, Dezan Junior E, Suzuki P. Influence of the type of vehicle and limit of obturation on apical and periapical tissue response in dogs' teeth after root canal filling with Mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2007; 6: 693-7
35. Jacobovitz M, Vianna ME, Pandolfelli VC, Oliveira IR, Rossetto HL, Gomes BP. Root canal filling with cements based on mineral aggregates: a in vitro analysis of bacterial microleakage. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108: 140-4.
36. Junqueira LCU, Junqueira LMMS. Técnicas básicas de citologia e histologia. In: Junqueira LCU, Junqueira LMMS. *Coloração de uso geral. Métodos para o tecido ósseo.* São Paulo: Editora Santos; 1983. p. 65-6.
37. Kogan P, He J, Glickman GN, Watanabe I. The effects of various additives on setting properties of MTA. *J Endod.* 2006; 32: 569 –72.
38. Kolokouris I, Economides N, Beltes P, Vlemmas. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod.* 1998; 24: 82–5.
39. Kozam G, Mantell GM. The effect of eugenol on oral mucous membranes. *J Dent Res.* 1978; 57: 954–7.
40. 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.

41. Lee YL, Lee BS, Lin AY, Lan WH, Lin CP. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials*. 2004; 25: 787-93.
42. Leonardo MR, Almeida WA, da Silva LA, Utrilla LS. Histological evaluation of the response of apical tissues to glass ionomer and zinc oxide-eugenol based sealers in dog teeth after root canal treatment. *Endod Dent Traumatol*. 1998; 14: 257-61.
43. Leonardo MR, da Silva LA, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol*. 1999; 15: 28-32.
44. Leonardo MR, Leal JM. Materiais obturadores de canais radiculares. In: Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos*. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 1063-145.
45. Leonardo MR, Flores DSH, Silva FWGP, Leonardo RT, Silva LAB. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using Roeko Seal and AH Plus Root Canal Sealers: a histopathological evaluation. *J Endod*. 2008; 34: 822-5
46. Lindqvist L, Otteskog P. Eugenol: liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast. *Scand J Dent Res*. 1981; 88: 552-6.
47. Massi S, Tanomaru-Filho M, Silva GF, Duarte MA, Grizzo LT, Buzalaf MA, Guerreiro-Tanomaru JM. pH, Calcium Ion Release, and Setting Time of an experimental Mineral Trioxide Aggregate-based root canal sealer. *J Endod*. 2011; 37: 844-6
48. Molnar EJ. Residual eugenol from zinc oxide-eugenol compounds. *J Dent Res*. 1967; 46: 645-9.
49. Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PM. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int Endod J*. 2011; 44: 1128-33.
50. Queiroz AM, Assed S, Consolaro A, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva RAB, et al. Subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. *Braz Dent J*. 2011; 22: 203-11.

51. Santos AD, Moraes JCS, Araújo EB, Yukimitu K, Valério Filho WV. Physicochemical properties of MTA and a novel experimental cement. *Int Endod J.* 2005; 38: 443-7.
52. Santos J, Tjäderhane L, Ferraz C, Zaia A. Long-term sealing ability of resin-based root canal fillings. *Int Endod J.* 2010; 43: 455-60.
53. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2005; 31: 97-100.
54. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. *Int Endod J.* 2012; 45: 12-8.
55. Shahi S, Rahini S, Yavari HR, Mokhtari H, Roshangar L, Alasi MM, et al. Effect of mineral trioxide aggregates and portland cements on inflammatory cells. *J Endod.* 2010; 36: 899-903.
56. Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of calcium hydroxide cement. *Arch Oral Biol.* 1991; 36: 117-28.
57. Silveira CMM, Pinto SCS, Zedebski RAM, Santos FA, Pilatti GL. Biocompatibility of four Root Canal Sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J.* 2011; 22: 21-7.
58. Sipert CR, Hussne RP, Nishiyama CK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. *Int Endod J.* 2005; 38: 539-43.
59. Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Hotta J, Watanabe E, Ito IY. Antimicrobial activity of endodontic sealers based on calcium hydroxide and MTA. *Acta Odontol Latinoam.* 2008; 21: 147-51.
60. Tanomaru-Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Utrilla LS. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31: 85-9.
61. Tanomaru-Filho M, Jorge EG, Guerreiro Tanomaru JM, Goncalves M. Radiopacity evaluation of new root canal filling materials by digitalization of images. *J Endod.* 2007; 33: 249-51.

-
62. Tanomaru-Filho M, Chaves Faleiros FB, Saçaki JN, Hungaro Duarte MA, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2009; 35: 1418-21.
 63. Torabinejad M, Falah R, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative leakage of mineral trioxide aggregate as a root end filling material. *J Endod.* 1995; 21: 109–21.
 64. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod.* 1995; 21: 349-53.
 65. Torabinejad M, Smith PW, Kettering JD, Pitt Ford TR. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used rootend filling materials. *J Endod.* 1995; 21: 295–9.
 66. Torabinejad TF, Watson, Pitt Ford TR. Sealing ability of a Mineral trioxide Aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* 1993; 19: 591–5.
 67. Violi NV. Avaliação histológica e imuno-histoquímica do subcutâneo e do alvéolo dentário de ratos com implantes de cimento Portland, MTA e MTA experimental [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.
 68. Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Ali Saghiri M, et al. Influence of white versus gray Mineral Trioxide Aggregate on inflammatory cells. *J Endod.* 2008; 34: 715-7.
 69. Yamanaka Y, Shigetani Y, Yoshiba T, Okiji T. Immunohistochemical analysis of subcutaneous tissue reactions to methacrylate resin-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2011; 44: 669-75.
 70. Zmener O, Pameijer CH, Kokubu GA, Grana DR. Subcutaneous connective tissue reaction to methacrylate resin-based and zinc oxide and eugenol sealers. *J Endod.* 2010; 36: 1574-9.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Proc. CEEA nº 27/2010

Araraquara, 16 de setembro de 2010

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em 15/09/2010, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Reação histológica provocada por diferentes cimentos endodônticos implantados no tecido subcutâneo e na tibia de ratos" (Proc. CEEA nº 27/2010) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para ABRIL/2012.

Atenciosamente,

Prof. Dr. ELÉNY ZANELLA BALDUCCI
Coordenadora do CEEA

Ao
Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
DD. Pesquisador Responsável
a/c Rafael Vicente Ferino
Departamento de Morfologia

Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA
Rua Humaitá n° 1.600 - Centro - CEP 14801-903 - Caixa Postal n° 331 - ARARAQUARA - SP
5º andar - fone (16) 3301-6431/6432 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: diretor@foc.unesp.br - home page: <http://www.foc.unesp.br>

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 19 de março de 2012.

RAFAEL VICENTE FERINO