

Thaís Christina Cunha

**Avaliação da resposta inflamatória e
processo de reparo do tecido subcutâneo
de ratos, em contato com diferentes
cimentos endodônticos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Odontológica, Área de Concentração em Endodontia.

Uberlândia, 2011

Thaís Christina Cunha

**Avaliação da resposta inflamatória e processo de
reparo do tecido subcutâneo de ratos, em
contato com diferentes cimentos endodônticos.**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade Federal
de Uberlândia, para obtenção do Título
de Mestre em Clínica Odontológica,
Área de Concentração em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Gabrielli Biffi
Co-Orientadora: Prof. Dra. Camilla Christian Gomes Moura

Banca Examinadora:
Prof. Dr. João Carlos Gabrielli Biffi
Dra. Camilla Christian Gomes Moura
Profa. Dra. Paula Dechichi
Prof. Dra. Ana Carolina

Uberlândia, 2011



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA



**RELATÓRIO DA COMISSÃO JULGADORA DA 205^a DEFESA DE
MESTRADO DA CD Thaís Christina Cunha DO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA DESTA UNIVERSIDADE.**

Às nove horas e trinta minutos do dia trinta de junho do ano de dois mil e onze, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento da Dissertação de Mestrado apresentada pela candidata Thaís Christina Cunha com o **título: Avaliação da resposta inflamatória e processo de reparo do tecido subcutâneo de ratos, em contato com diferentes cimentos endodônticos**. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Dissertações e Teses da Biblioteca desta Universidade. Acompanham este relatório os pareceres individuais dos membros da Comissão Julgadora.

Uberlândia, 30 de junho de 2011.

Prof. Dr. João Carlos Gabrielli Biffi
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovado/Reprovado

Profª. Drª. Paula Dechichi
Titulação: Doutora
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Aprovado/Reprovado

Profª. Drª. Ana Carolina Guimarães Faleiros
Titulação: Doutora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Aprovado/Reprovado

DEDICATÓRIA

Dedico mais esta conquista à minha querida família:
minha filhinha Maísa, meu marido Edilson, minha enteada Thaísinha
meu pai José Abadio, minha mãe Maria José e
meus irmãos, Cínthia, Débora e Marcelo
que acreditam em mim e com muito carinho
sempre me apoiaram em todas as etapas de minha vida.
Amo muito vocês!! Muito obrigada!!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“A Deus.... Obrigada por tudo Meu Senhor !!!!”

...e ainda se vier noites traiçoeiras, se a cruz pesada for, Cristo estarás contigo; o mundo pode até, fazer você chorar, mas Deus te quer sorrindo....”

“A vocês, ***Maria José e José Abadio***, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade; a vocês que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação, para que eu os trilhasse sem medo e cheio de esperança. A vocês que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que muitas vezes, eu pudesse realizar os meus sonhos. A vocês, meus pais por natureza, por opção e amor... muito obrigada!!

À minha filhinha **Maísa**, minha companheirinha, por compreender minha ausência, e nos momentos em que estamos juntas, encher meu coração com todo o seu amor e minha vida com toda sua alegria.

Ao meu marido **Edilson**, um homem guerreiro, honesto, amigo, companheiro... Obrigada por estar sempre ao meu lado, incentivando-me a crescer pessoal e profissionalmente.

“Não se mede o valor de um homem pelas suas roupas ou pelos bens que possui, o verdadeiro valor do homem é seu caráter, suas idéias e a nobreza de seus ideais”. Charles Chaplin

Aos meus irmãos **Cínthia, Débora e Marcelo**, pelo carinho e
amor durante toda vida.

*Não há palavras que definam como vocês foram
importantes nessa caminhada!!!*

Ao *Prof. Biffi*, meu mestre e orientador, por todo ensinamento, confiança, dedicação, incentivo....Um exemplo de competência, caráter, profissionalismo, integridade... Seus ensinamentos estarão sempre presentes em minha vida!!

À *Camilla Moura*, minha amiga e co-orientadora, a você minha eterna gratidão por todo estímulo, por toda força, empenho e dedicação, não medindo esforços para que alcançássemos o que tanto almejávamos. Sua alegria, coragem, força, e ânsia por conhecimento me incentivam a continuar minha caminhada. Com você, muito aprendi... Obrigada por tudo!!!

À professora *Paula Dechichi*, minha inspiração, uma mulher guerreira, de fibra, um exemplo de pessoa, por quem tenho profunda admiração. Sempre presente, disposta a ajudar, nos aconselhando, nos ensinando. Obrigada por tudo!

À *Daniela*, minha grande companheira nesta caminhada. Compartilhamos momentos tempestuosos, superamos juntas, grandes obstáculos, mas alcançamos nossos objetivos. Obrigada por estar sempre ao meu lado!! A distância, com certeza, não impedirá que nossa amizade continue!

Aos colegas do mestrado *Flaviana, George, Danilo* e as alunas de iniciação *Talita, Carla e Ana Carolina* pela valiosa colaboração durante a algumas etapas da realização da pesquisa.

Aos *professores da pós-graduação*, pelos ensinamentos durante minha formação de mestre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Curso de pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade oferecida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro e financiamento desta pesquisa.

Às Prof^a.Dra Luciana e Prof^a.Dra Karen pela valiosa contribuição durante processo de qualificação.

Ao laboratório de histologia e patologia por gentilmente ceder as instalações e equipamentos para a realização deste estudo.

Aos funcionários: Jucélia, Fabrício, Marcelo, Sr. Advaldo e Sr. Hélio, pelo carinho e amizade, por sempre dispostos a ajudar durante a execução desse trabalho.

Às secretárias da pós-graduação Graça e Abigail, pela dedicação e carinho que sempre tiveram comigo!

A todas as pessoas que estiveram comigo durante esses dois anos e que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho!!!

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1. Endodontia X Obturação (Cimentos Endodônticos)	9
2.2. Biocompatibilidade	17
2.3. Implante subcutâneo	19
2.4. Tecido conjuntivo normal versus inflamação	21
2.5. Fibras colágenas	25
3. PROPOSIÇÃO	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1- Cimentos Endodônticos	30
4.2- Animais	31
4.3- Pré-Operatório	32
4.4-Confecção dos corpos de prova	33
4.5- Procedimento cirúrgico	34
4.6- Procedimento cirúrgico para remoção dos implantes	37
4.7- Análise histopatológica	38
4.8 – Métodos de Análise	40
4.8.1- Análise Histológica Qualitativa	40
4.8.2 – Análise em picro-sírius e quantificação das fibras	
colágenas na cápsula fibrosa	41
4.8.3 – Análise Estatística	42
5. RESULTADOS	43
5.1- Análise histopatológica descritiva	44
5.2 - Análise microscópica qualitativa	44
5.2.1- 7 Dias	44
5.2.2 – 14 Dias	48
5.2.3 – 21 Dias	52

5.2.4 – 42 Dias	56
5.2.5 – 60 Dias	60
5.3. Análise quantitativa	65
5.3.1- Avaliação quantitativa da intensidade da reação	
Inflamatória	65
5.3.2- Avaliação quantitativa da porcentagem de fibras	
colágenas na cápsula fibrosa	67
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS	85
ANEXO	97

RESUMO

A presente pesquisa teve como objetivo verificar a resposta inflamatória e o processo de reparo em tecido subcutâneo de ratos a quatro cimentos endodônticos de composições distintas: Sealer 26®, Epiphany®, AH Plus® e Endofill. Neste estudo foram utilizados 35 ratos *Wistar*, sendo que em cada animal foram confeccionadas 4 lojas cirúrgicas subcutâneas na região dorsal. Em cada loja foi implantado um tubo de polietileno preenchido com um dos cimentos em teste. Após 7,14,21,42 e 60 dias de pós operatório, a região da pele em contato com o implante foi removida e os fragmentos foram processados para inclusão em parafina e posterior análise histopatológica.

Metade dos cortes obtidos foram avaliados de acordo com a intensidade da resposta inflamatória atribuindo scores: 0= ausente, 1= leve, 2=moderada e 3=severa que foram submetidos à análise estatística. A outra metade dos cortes foi corada em Picro-sírius Red para a análise da quantidade de fibras colágenas utilizando polarização ótica. Em sete dias, o tecido subcutâneo em todos os animais apresentou reação inflamatória severa, não sendo observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p>0.05$). Aos 14 e 21 dias, os espécimes com os cimentos Epiphany® e AH Plus® mostraram diferenças estatísticas significantes quanto à intensidade da reação inflamatória quando comparados aos do cimento Endofill ($p=0.0005$, $p=0.0003$, respectivamente). Os espécimes com cimento Endofill mantiveram reação inflamatória intensa aos 42 ($p=0.0203$) e 60 dias ($p=0.0072$) comparado aos do cimento Epiphany®. Não foram encontradas diferenças quanto à quantidade de fibras colágenas na cápsula fibrosa entre os cimentos, em todos os tempos avaliados. Todos os cimentos testados provocaram uma reação inflamatória inicialmente severa que decresceu ao longo dos períodos avaliados. O Cimento Endofill se mostrou com maior potencial irritante em todos os períodos avaliados. A cápsula fibrosa, presente em todas as interfaces analisadas, se apresentou como uma proteção desenvolvida pelo tecido à presença do material irritante.

Palavras-Chave: Biocompatibilidade, Cimentos Endodônticos, Cápsula fibrosa, Reparo tecidual

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the inflammatory response and repair process in subcutaneous tissue from the rats to four different sealers: Sealer 26, Epiphany, AH Plus and Endofill. Polyethylene tubes filled with fresh sealer were implanted in the four separate pockets created by blunt dissection in regions of the dorsum of each one of the third five male *Wistar* rats used. After 7, 14, 21, 42 and 60 days of post operatory, the implants were removed with the surrounding tissue, processed for inclusion in paraffin for the analysis histopathological. Qualitative and quantitative analysis was performed on HE sections as well as picro sirius (PS) sections. The intensity of the inflammatory response was evaluated and were scored as: 0- no inflammation; 1- mild inflammation; 2- moderate inflammation or 3- severe inflammation. Fibrous capsule thickness was evaluated on PS sections using polarization. The measurements were subject to non parametric analysis. Results: In seven days the subcutaneous tissue of all animals showed characteristics corresponding to the severe inflammatory reaction ($p > 0.05$). At 14 and 21 days the response inflammatory tissue obtained with the Epiphany and AH Plus sealers showed statistically significant differences compared to the response of Endofill ($p = 0.0005$, $p = 0.0003$, respectively). This sealer remained the most aggressive at 42 ($p = 0.0203$) and 60 days ($p = 0.0072$) compared to Epiphany. There were no significant differences in the quantity of fibrous collagens among the sealers in the five periods. Conclusion: All tested sealers caused a severe inflammatory reaction in initial periods which decreased along the time. Endofill was the most aggressive sealer on all analyzed periods. The fibrous capsule was formed in all interfaces analyzed, presented himself as a protection developed by the tissue to the presence of an irritating material.

Key-words: Biocompatibility, Endodontics sealers, Fibrous Capsule, Tissue repair.

Introdução

1- Introdução

Um dos principais objetivos da terapia endodôntica é a remoção dos agentes biológicos, físicos ou químicos, prejudiciais aos tecidos apicais e periapicais, permitindo assim que o organismo recupere sua condição de normalidade reparando os tecidos lesados (Leonardo, 2005).

O tratamento endodôntico envolve várias etapas: diagnóstico, abertura coronária, preparo biomecânico (instrumentação, irrigação), medicação intracanal, obturação dos canais radiculares e restauração permanente do dente. Estas, quando bem executadas e mantendo a cadeia asséptica durante todo o tratamento, são de fundamental importância para a obtenção do sucesso pós-tratamento. (Pedroso, 2000; Araújo, 2008.)

Os materiais dentários atualmente utilizados na terapia endodôntica podem ser categorizados de acordo com a sua função: para manutenção da vitalidade pulpar e, na terapia endodôntica propriamente dita, para desinfecção do espaço pulpar (irrigantes e medicação intracanal) e materiais de preenchimento radicular (materiais sólidos e cimentos).

Os cones de guta percha são utilizados para o preenchimento dos canais radiculares associados aos cimentos endodônticos. Esses são os materiais que, em estado sólido, compõem a maior parte da massa obturadora. No entanto, atualmente encontram-se também disponíveis no mercado, componentes alternativos como cones de Resilon® propostos para a utilização com um primer autocondicionador e um cimento resinoso, Epiphany®.

O avanço tecnológico na Endodontia trouxe uma enorme gama de possibilidades quanto aos cimentos obturadores. Independente da composição, a utilização de cimentos endodônticos tem por finalidade preencher espaços residuais entre o material obturador sólido e as paredes do canal radicular, obturando parte dos túbulos dentinários e o forame apical contra a invasão microbiana e, impedindo assim, a comunicação entre a cavidade bucal e a região periapical com o interior do canal. (Hauman & Love, 2003; de Campos-Pinto *et al.*, 2008, Onay *et al.*, 2007)

Com a grande proximidade existente entre o cimento obturador e os tecidos periapicais, considerando também a possibilidade de um eventual extravasamento, os cimentos obturadores devem ser bem tolerados pelos tecidos, facilitando e oferecendo condições para a reparação das áreas apicais e periapicais. (Bernáth & Szabó, 2003; Zmener *et al*, 2004, Onay *et a.l*, 2007).

A partir disso, vários experimentos têm sido realizados para verificar a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos. (Economides *et al.*, 1995; Bernáth & Szabó, 2003; Hauman & Love, 2003; Sousa *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2006;).

Biocompatibilidade, segundo a ASTM (2006) (*American Society for Testing and Materials*), é definida como a avaliação da resposta produzida pelo íntimo contato de um material com os tecidos vivos do hospedeiro em comparação à resposta produzida por um grupo controle. De acordo com a EN 1441 (European Committee for Standardization 1996), material biocompatível deve ser livre de qualquer risco.

A biocompatibilidade materiais endodônticos pode ser caracterizada por muitos parâmetros como genotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade, citotoxicidade, histocompatibilidade ou efeitos microbianos. (Hauman & Love, 2003). Dentre os principais métodos de avaliação encontram-se os testes de citotoxicidade conduzidos *in vitro* com cultura de células e/ou tecidos ou *in vivo* através da implantação subcutânea e óssea em animais de pequeno porte. (Bodrumlu *et al*, 2007). A composição química do cimento obturador é um requisito de grande importância quando se considera reações periapicais após a terapia endodôntica. (Batista *et al.*, 2006).

Estão disponíveis no mercado vários cimentos endodônticos com diferentes bases: óxido de zinco e eugenol, hidróxido de cálcio, resinas epóxica ou metacrilato, e à base de ionômero de vidro. Estes devem preencher vários requisitos: apresentar boa tolerância tecidual, estimular ou permitir deposição de tecido mineralizado, ter ação antimicrobiana, não sofrer contrações e não ser solubilizado dentro do canal radicular (Leonardo, 2005; Desai & Chandler, 2009), afim de que os resultados alcançados ao fim do tratamento sejam satisfatórios.

O cimento obturador a base de óxido de zinco eugenol (OZE) apresenta propriedades físico-químicas aceitáveis, entretanto, não apresenta comportamento biológico favorável ao tecido conjuntivo. Diversos estudos demonstram que o OZE é citotóxico, por conter eugenol em sua composição, não apresentando boa resposta tecidual aos testes de compatibilidade biológica. Apesar de sua limitação no que tange aos aspectos biológicos, o cimento de OZE é mundialmente usado por diversas décadas até os dias atuais. Este fato torna oportuna a busca de um recurso que vise minimizar a resposta tecidual inflamatória atribuída ao efeito irritante deste cimento. (Araújo, 2008).

Devido a esse desfavorável comportamento biológico apresentado, os materiais obturadores à base de óxido de zinco e eugenol estão sendo substituídos por cimentos à base de hidróxido de cálcio. As principais razões para se utilizar hidróxido de cálcio como material obturador referem-se à sua capacidade de estimular a deposição de tecido mineralizado na região do forame apical, mantendo a saúde do tecido periapical ou ajudando a promovê-la devido aos seus efeitos antimicrobianos. (Cruz *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2009). Dentre eles, o cimento Sealer 26®, que é um cimento à base de resina epóxica, possui em sua fórmula, quase todos os componentes de seu antecessor AH 26, diferenciando apenas na proporção dos mesmos e na presença do hidróxido de cálcio que foi adicionado em substituição à prata pulverizada.

Os cimentos à base de resina epóxica, entre eles o AH Plus® (introduzido no mercado em 1996), surgiram na Endodontia como uma alternativa aos cimentos existentes, devido às suas características: boa adesão à estrutura dentinária, longo tempo de trabalho, facilidade de manipulação e bom escoamento, e às propriedades físico-químicas vantajosas mantidas do seu também precursor (AH 26), alta radiopacidade, baixa solubilidade e pouca contração.

Recentemente foram introduzidos na prática endodôntica os cimentos à base de resina metacrilato. O cimento Epiphany® é utilizado juntamente com cones Resilon® (Research LLC, Madison, CT), e um primer

(Epiphany® primer) auto-condicionador. Estes interagem quimicamente formando um monobloco de resina, que se adere às paredes do canal radicular por meio de tags intertubulares na dentina radicular, o que diminuiria a microinfiltração e aumentaria a resistência a fraturas radiculares (Teixeira *et al.*, 2004, Versiani *et al.*, 2006, de Campos-Pinto *et al.*, 2008).

Nota-se na literatura que as pesquisas apontam para o desenvolvimento de um cimento que seja biocompatível e ao mesmo tempo apresente boas propriedades físico-químicas. Na expectativa de colaborar com esse contexto atual, direcionando para uma adequada utilização dos cimentos endodônticos, a presente pesquisa teve como objetivo verificar a resposta inflamatória e o processo de reparo em tecido subcutâneo de ratos aos cimentos de composições distintas: à base de hidróxido de cálcio (Sealer 26®), resina de metacrilato (Epiphany®), resina epóxica (AH Plus®), Óxido de Zinco e Eugenol (Endofill), bem como analisar a cápsula fibrosa formada na interface cimento-tecido conjuntivo.

Revisão de Literatura

2- *Revisão de literatura*

2.1- Endodontia X Obturação (Cimentos endodônticos)

O preenchimento tridimensional do sistema de canais radiculares após uma limpeza, desinfecção e instrumentação adequadas, respeitando a anatomia, é um dos objetivos a ser alcançado para a obtenção do sucesso da terapia endodôntica. (Zafalon *et al.*, 2007; Onay *et al.*, 2007).

O selamento do forame apical pela deposição de tecido mineralizado representa uma resposta biológica ideal após a terapia endodôntica. A ocorrência desse selamento está condicionada à correta execução de todas as fases operatórias, bem como a fatores como o limite de preenchimento e a composição do material obturador, visto que posteriormente estará em contato direto com os tecidos apicais e periapicais. (Leonardo *et al.* 1997). Somadas a isso, tem-se buscado um cimento endodôntico que, além de se adaptar à guta percha ou Resilon® e às paredes dentinárias do canal radicular e não sofra alterações dimensionais. (Scarparo, 2007).

A existência e/ou persistência e a intensidade das reações nos tecidos periapicais após o tratamento e/ou obturação endodôntica podem ser influenciadas por vários fatores: doença pré-existente, limpeza e instrumentação inadequada do sistema de canais radiculares, contaminação bacteriana, técnica de obturação e a quantidade de material em contato com o tecido (Berbert, 1996) e natureza química do cimento obturador (contato com os componentes tóxicos presentes em alguns cimentos, assim como a liberação de compostos voláteis por esses materiais). (Batista *et al.*, 2006; Bernáth & Szabó ,2003; Onay *et al.*,2007).

A literatura específica apresenta, para a finalização do tratamento endodôntico, uma gama de produtos e cada um deles com características e propriedades biológicas e físico-químicas desejáveis ou não.

Por mais de 100 anos, a guta-percha tem sido considerada o material de escolha padrão para finalização do tratamento endodôntico

(Merdad *et al.*, 2007), embora não represente um material obturador ideal (Ezzie *et al.*, 2006). Uma das desvantagens deste material é a sua pobre capacidade de selamento, sendo necessário o uso de um cimento obturador para proporcionar um selamento efetivo. Somando-se a isso, quando a restauração coronária está defeituosa ou ausente, a contaminação com saliva pode causar a dissolução deste cimento obturador, oferecendo assim uma oportunidade para a colonização de bactérias; e levando consequentemente a um fracasso do tratamento (Hassanloo *et al.*, 2007).

Ainda hoje, não existe um cimento que apresente características físico-químicas e biológicas ideais. (Bouillaguet *et al.*, 2006). Essas propriedades são estudadas com o objetivo de se alcançar a substância perfeita que preencha certos requisitos, facilitando o controle de qualidade e a padronização do material (Figueiredo *et al.*, 2000). Entre elas estão: boa tolerância tecidual; ser reabsorvido no periápice, em casos de extravasamento acidental; estimular ou permitir a deposição de tecido mineralizado ao nível apical; ter ação antimicrobiana; facilidade de inserção; ser plástica no momento da inserção, tornando-se sólida posteriormente; possuir bom tempo de trabalho; propiciar um bom selamento; não deve sofrer contrações; ser impermeável; possuir bom escoamento; viscosidade e aderência; não ser solubilizado dentro do canal radicular; apresentar pH próximo ao neutro; ser radiopaco; não manchar as estruturas dentais; ser estéril ou passível de esterilização; de fácil remoção. (Leonardo, 1998. Desai & Chandler, 2009.)

De maneira geral, os cimentos endodônticos podem ser agrupados de acordo com a sua composição. Encontram-se disponíveis materiais à base de: de óxido de zinco/ eugenol, como Endofill, Fill Canal, Cimento de Rickert, N-Rickert, Endomethásone, Pulp Canal Sealers, Roth 801 e 811, Cimentos de Grossman; de resina epólica, AH Plus®; de hidróxido de cálcio, como Sealer 26®, Apexit, Sealapex; de resinas metacrilato, como EndoRez e Epiphany®; de ionômero de vidro, como Ketac Endo e Endion (Bouillaguet *et al.*, 2004; Scarparo, 2007, Araújo, 2008); de silicone; um cimento experimental à base de polímero de mamona e cimento à base de MTA (Araújo, 2008). Para cada um

destes tipos, existem diferentes marcas comerciais e muitos deles são utilizados por cirurgiões dentistas brasileiros.

Apesar do avanço tecnológico dos novos cimentos, o cimento endodôntico à base de óxido de zinco e eugenol, introduzido no mercado por Grossman em 1936, ainda hoje, devido a seu baixo custo e facilidade de aquisição, é bastante utilizado. Porém, devido ao seu potencial irritante, a busca constante de recursos que visem minimizar esse efeito ainda é bastante pertinente.

Os materiais à base de óxido de zinco e eugenol apresentam propriedades físico-químicas aceitáveis, tais como impermeabilidade, constância de volume, adesão e pouca solubilidade. No entanto, não apresentam comportamento biológico favorável ao tecido conjuntivo, como demonstrado em estudos *in vitro* (Guigand *et al.*, 1999) e *in vivo* (Figueiredo *et al.*, 2001; Zmener *et al.*, 2010), sendo agressivo aos tecidos apicais e periapicais. (Araújo, 2008). Seu caráter irritante possui influência direta e significativa no processo de reparo tecidual após o término do tratamento de canais radiculares, podendo desencadear ou manter reações inflamatórias crônicas nos tecidos periapicais (Schwarze *et al.*, 2002). Esse potencial é atribuído principalmente a altas concentrações de eugenol (Hume, 1988; Economides *et al.*, 1995) que, pode permanecer em sua forma livre por até 10 anos. (Queiroz, 2008. Araújo, 2008).

As reações histológicas do cimento de OZE foram bem evidenciadas há décadas, sendo comprovado que o eugenol é citotóxico (Hume, 1988), gera reações adversas em animais experimentais e humanos, provoca dermatite de contato, e reações alérgicas verdadeiras (Araújo, 2008). Ele altera a capacidade de aderência ao substrato dos macrófagos e, consequentemente o processo da fagocitose; altera a função antimicrobiana dos neutrófilos influenciando a reação nos tecidos periapicais (Chen *et al.*, 2008); em altas concentrações, este componente atua como inibidor da respiração celular (Hume, 1984); é bactericida e, em baixas concentrações inibe a quimiotaxia de células leucocitárias, a síntese de prostaglandinas e a

atividade nervosa. (Markowitz *et al*,1992). Outro inconveniente é o fato deste composto apresentar baixa capacidade de ser fagocitado e eliminado, permanecendo partículas de óxido de zinco e eugenol nos tecidos periapicais, levando à persistência do processo inflamatório.

Após passar por inúmeras modificações, em 1974, Grossman publicou a nova formulação do cimento de OZE que apresenta os seguintes constituintes: Pó: Óxido de Zinco - 42 partes; Resina Staybelite – 27 partes; Subcarbonato de Bismuto – 15 partes; Sulfato de Bário – 15 partes; Tetraborato de Sódio anidro – 1 parte. Líquido: Eugenol. Nessa fórmula, Grossman corrigiu a proposta em 1962, removendo o óleo de amêndoas doce do eugenol para que o cimento não ficasse com dois retardadores do tempo de endurecimento, ou seja, o tetraborato de sódio anidro no pó e o óleo de amêndoas doce no líquido. A presença de resina hidrogenada confere à mistura uma boa adesividade, o subcarbonato de bismuto o torna mais plástico e o sulfato de bário melhora a sua radiopacidade. (Pedroso, 2000).

A versão brasileira foi fabricada e comercializada a partir de 1965 com o nome Fill Canal®, sendo atualmente substituído e amplamente empregado pelo cimento Endo-Fill com a mesma fórmula pela Herpo Produtos Dentários Ltda. (Pedroso, 2000).

Os cimentos à base de resina epólica surgiram como alternativa aos cimentos existentes no mercado, e foram ganhando espaço devido às suas características como adesão à estrutura dentária, adequado tempo de trabalho, facilidade de manipulação e bom escoamento (Leonardo, 1998).

Em 1957, foi lançado o cimento AH26 formado por uma combinação macromolecular sintética do grupo das resinas epóxicas que apresenta na formulação um pó (óxido de bismuto, prata pulverizada, dióxido de titânio e hexametilenotetramina) e uma resina base (éter de bisfenol A diglicidil). A partir de então, diversas modificações foram sendo realizadas e deram origem a vários cimentos à base de resina epólica, como o Sealer 26® e o AH Plus®.

O AH Plus®, introduzido no mercado em 1996, é um cimento à base de resina epóxica, criado a partir de alterações na fórmula de cimento AH 26 (Scarparo *et al.*, 2009). Nesta formulação preservou-se, a química das resinas epóxicas, as quais, por meio de uma reação de adição do polímero linear, deixariam de elaborar substâncias tóxicas. Propriedades como, estabilidade dimensional e radiopacidade, constância de volume, adesividade e pequena solubilidade, bom escoamento e resistência foram mantidas, ou mesmo melhoradas no AH Plus® quando comparadas ao AH 26. (Neves, 2005).

Esse cimento é composto por um sistema pasta-pasta; pasta A ou “pasta epóxi” e pasta B ou “pasta amina”. De acordo com o fabricante (Dentsply HERO Indústria e Comércio Ltda. – Petrópolis-RJ, Brasil), o AH Plus® possui a seguinte formulação: Pasta A: Resina Epóxica, tungstanato de cálcio, óxido de zircônio, Aerosil e óxido de ferro) e Pasta B: Amina Adamantada, N,N” – Dibenzil-5-oxaniomane-diamina-1,9, TCD-Diamina, tungstanato de cálcio, óxido de zircônio, Aerosil e Oléo de silicone). A proporção de mistura para se preparar o AH Plus® é de 1:1, em volume, com tempo de trabalho de aproximadamente 4 horas a 23°; seu tempo de endurecimento por cerca de 8 horas a 37°C, segundo o fabricante. Dentre suas características, o Cimento AH Plus® apresenta uma boa capacidade seladora apical (Almeida ,1997). Há divergências quanto a estudos de biocompatibilidade. Alguns autores (Koulaouzidou *et al.*, 1998; Tai *et al.*, 2001) relataram que os efeitos citotóxicos desse cimento foram reduzidos mas, outros discordam (Huang *et al.*, 2002). Em testes de implantes subcutâneos (Sousa *et al.*, 2006) e testes de aplicação dental em animais (Tanomaru Filho *et al.*, 2008; Leonardo *et al.*, 2003), o AH Plus® provou ter excelente comportamento biológico, permitindo o selamento do forame pela deposição de um tecido cementóide.

Os efeitos benéficos do hidróxido de cálcio fizeram com que esse composto passasse a ser empregados na obturação definitiva dos canais radiculares, na tentativa de se obter melhores propriedades. (Silva *et al.*, 1997; Pedroso, 2000; Valera *et al.*, 2004). Seu primeiro uso clínico como material de

preenchimento endodôntico foi feito provavelmente por Rhoner em 1940 (Desai & Chandler, 2009).

Materiais que contêm hidróxido de cálcio em sua composição, apresentarão propriedades biológicas e antimicrobianas, se houver a liberação de íons cálcio e hidroxila (Hauman & Love, 2003b). Os íons hidroxila promovem o aumento do pH da região periapical e apresentam um potencial bactericida. Sua difusão através da dentina radicular, altera o pH da superfície radicular externa e interfere com a atividade osteoclástica. O aumento do pH interfere na função dos fibroblastos, estimulando o processo de reparo da superfície radicular e participa da formação de tecido mineralizado, com a ativação da fosfatase alcalina e da síntese de colágeno. A liberação de íons cálcio é importante, pois, quando em abundância no tecido, ocorre sua participação no processo de ativação da adenosina trifosfatase cálcio dependente. O cálcio reage com o gás carbônico, reduzem a fonte de alimentação das bactérias anaeróbias do tecido e formam cristais de carbonato de cálcio, que servem de núcleos de calcificação e favorecem a mineralização (Queiroz, 2008; Desai & Chandler, 2009; Tanomaru-Filho *et al*, 2009).

Porém, essa dissociação em íons pode afetar a integridade estrutural dos cimentos além de comprometer o selamento ao longo do tempo (Hauman & Love, 2003b). Portanto, cimentos como Sealapex e CRCS podem facilmente se desintegrar no tecido (Soares *et al.*, 1990) e assim causar inflamação crônica (Hauman & Love, 2003b). No geral, esses cimentos apresentam boa citocompatibilidade (Kolokouris *et al.*, 1998; Gomes-Filho *et al.*, 2007).

Dentre os cimentos modificados pela adição de Ca(OH)2, o Sealer 26® encontra-se entre os mais utilizados. Ele possui composição similar à do AH 26 (Siqueira Jr. & Gonçalves, 1996; Pedroso, 2000) cimento à base de resina epóxica. A diferença básica entre ambos é que o Sealer 26® possui hidróxido de cálcio, enquanto o AH26 apresenta a prata. Vários trabalhos têm demonstrado que a ação irritante do cimento AH26 é decorrente da resina epóxica (Bisfenol A). Porém, Economides *et al.*(1995) consideram a

hexametilenotetramina a responsável pelo poder irritante do cimento, devido à liberação de formaldeído.

O Sealer 26® possui a seguinte composição: Hidróxido de cálcio, óxido de bismuto, hexametilenotetramina, dióxido de titânio e como resina o éter de bisfenol A diglicidil. Sua proporção ideal é de aproximadamente 2 a 3 partes de pó para uma de resina, por volume. Quanto maior a proporção, maior a radiopacidade do cimento. O tempo de presa (Fidel *et al.*, 1995; Pedroso, 2000) se dá cerca de 48 a 60 horas em temperatura ambiente, enquanto que no interior do canal ele endurece em aproximadamente 12 horas. O endurecimento se deve à reação entre a resina e a hexametilenotetramina, o agente ativador. Não há participação do hidróxido de cálcio nessa reação.

É esperado, pelas suas características que o cimento Sealer 26®, quando não extravasado, sofra pouca solubilização e, consequentemente, pouca liberação de formaldeído ou da própria resina, nos períodos pós-presa do cimento. Contudo, na intimidade do tecido, em casos de extravasamento, pela ação dos líquidos tissulares e das próprias células de defesa do organismo, a possibilidade de se expor a resina e a própria liberação da hexametilenotetramina, com suas conseqüentes ações irritantes, é bem maior. (Moraes, 2006).

Em estudos *in vivo* realizados com Sealer 26®, observou-se uma reação inflamatória leve ou ausente (Leonardo *et al.*, 1997; Figueiredo *et al.*, 2001), podendo resultar na formação de tecido mineralizado em tecido conjuntivo de ratos (Holland *et al.*, 2002). Segundo Tanomaru-Filho *et al.* (2006), um aumento da proporção pó/líquido do cimento Sealer 26® resulta em boa resposta tecidual, proporcionado pelo aumento da quantidade de hidróxido de cálcio, conduzindo a um satisfatório reparo apical e periapical. Entretanto, outros estudos demonstraram resultados desfavoráveis para este cimento (Silva *et al.*, 1997; Veloso *et al.*, 2006) mesmo após um maior período de observação.

Mais recentemente foram introduzidos na prática endodôntica os cimentos à base de resina metacrilato. Esses cimentos foram inicialmente desenvolvidos para a utilização em cirurgias ortopédicas envolvendo tecido ósseo. O cimento ortopédico original possui na sua composição um polímero polimetacrilato (preferencialmente o polietilmacrilato), um monômero na forma líquida composto do n-butilmetacrilato e uma amina que ativa o composto, tal como a N'N dimetil p-toluidina. Estudos preliminares com a resina original mostraram boa adesividade com a dentina e com a guta percha, além de resultados favoráveis em estudos de citotoxicidade. Porém, características indesejáveis, tais como curto tempo de trabalho e infiltração apical, também foram notadas. O cimento passou por modificações na composição do polímero e do monômero e na proporção polímero/monômero, além da adição de partículas tais como óxido de zinco, hidroxiapatita e ionômero de vidro na tentativa de melhorar sua capacidade de selamento, dando origem a cimentos para uso endodôntico. (Scarparo, 2007).

Entre esses cimentos está o Epiphany® (Pentron®-Clinical Technologies, L.L.C., Wallingford, CT, EUA), que é composto à base de resina metacrilato, com polimerização dual. A matriz de resina é constituída por uma mistura de BISGMA, BISGMA etolado, PEGDMA, EBPDMA e por uma mistura UDMA como obturadores, além de sulfato de bário, sílica, hidróxido de cálcio, bismuto, estabilizadores e pigmentos (Versiani *et al.*, 2006; Onay *et al.*, 2007; Merdad *et al.*, 2007.).

O cimento Epiphany® é utilizado juntamente com o Resilon®, (Research LLC, Madison, CT), que são cones sintéticos de poliéster (Versiani *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2006, Oliveira *et al.*, 2006) e um primer (Epiphany® primer) auto-condicionador. O uso dos três leva a uma interação química, formando um monobloco de resina, que se adere mais às paredes do canal através de tags intertubulares na dentina, quando comparados à guta percha, o que aumentaria a resistência dos dentes a fraturas radiculares. (Teixeira *et al.*, 2004, Versiani *et al.*, 2006, de Campos-Pinto *et al.*, 2008). Este fato, também, diminuiria a microinfiltração coronária (Shipper *et al.*, 2004) e segundo estudos

recentes levaria a uma menor periodontite apical (Shipper *et al.*, 2005). A alta liberação de cálcio pelo Epiphany® é outro fator que pode explicar a redução da periodontite apical observada clinicamente, visto que sua presença torna o pH do meio mais alcalino, levando a efeitos bioquímicos que culminam na aceleração do processo de reparo (Shipper *et al.*, 2005). Imai & Komabayashi (2003) apontam como desvantagem desse sistema a possível dificuldade de retratamento, porém outros estudos demonstraram boa efetividade na remoção, que pode ser feita com solventes ou calor (Ezzie *et al.*, 2006).

Já com relação à sua histocompatibilidade, os resultados variam de inflamação severa a leve, variando em função da metodologia utilizada e tempo de análise (Scarparo *et al.*, 2009). Diante disso, mais estudos precisam ser realizados para auxiliar a compreensão de suas propriedades biológicas.

2.2 Biocompatibilidade

Respeitar o limite de trabalho, atuando dentro do canal dentinário contribui para a diminuição de agressões mecânicas e químicas impostas aos tecidos durante o tratamento endodôntico, oferecendo, dessa forma, melhores condições para a restauração da normalidade. O extravasamento de material no periodonto apical dificulta o desenvolvimento do processo reparativo e as repercussões desse fato podem permanecer como lesões inflamatórias crônicas. Nesse caso, o reparo acontece através da fagocitose por células inflamatórias e por meio do encapsulamento do corpo estranho por um tecido conjuntivo fibroso. (Mendonça & Estrela, 2001).

A extrusão desses materiais pode perpetuar uma periodontite apical. Por isso, a composição química e a biocompatibilidade do cimento obturador são requisitos de grande importância quando se considera reações periapicais após a terapia endodôntica visto que, os componentes tóxicos presentes poderiam produzir irritação ou mesmo necrose ao redor dos tecidos. (Batista *et al.*, 2006)

Dentro desse contexto, conhecer a compatibilidade biológica dos cimentos endodônticos é de extrema importância devido ao fato de que, se

esses cimentos forem irritantes aos tecidos da região periapical, causarem inflamação de maior porte ou promoverem necrose tecidual de grande extensão nesta área, o tratamento endodôntico será prejudicado e, como consequência, a capacidade de reparação da região periapical sofrerá interferências importantes (Nassri *et al.*, 2003).

A reação tecidual iniciada por cimentos endodônticos pode ser testada pela análise nas falhas de tratamentos endodônticos em humanos, mas essa observação não apresenta de forma objetiva a influência do material. (Zafalon, 2004)

Pesquisas envolvendo a avaliação da toxicidade dos materiais dentários devem obedecer a critérios específicos e aceitos internacionalmente. Vários testes podem ser efetuados para se verificar a compatibilidade biológica de um material. O Technical Report nº9, da Federação Dentária Internacional, e o Documento nº41 da ANS/ADA, recomendam três níveis de avaliação dos materiais utilizados na terapia endodôntica intrarradicular.

Os testes iniciais ou primários *in vitro* são aqueles que dão uma idéia geral da toxicidade do material e incluem os testes de toxicidade sistêmica aguda, os testes de inalação, os testes de mutagenicidade, o letal dominante e os testes de citotoxicidade *in vitro*. Eles determinam de maneira preliminar, o comportamento biológico de materiais e de seus componentes de modo a simular as reações biológicas quando colocados em contato ou dentro dos tecidos do organismo (Hanks *et al.*, 1996). Para este propósito, têm-se utilizado parâmetros como crescimento celular, morfologia celular, conteúdo protéico das células e liberação de mediadores como citocinas e quimiocinas (Hauman & Love, 2003a).

Os testes secundários são aqueles que avaliam a toxicidade local, e incluem os testes nos quais os materiais terão uma permanência mais prolongada em contato com os tecidos, *in vivo*, tais como os testes de sensibilidade e de irritação de membranas e os implantes em tecido conjuntivo subcutâneo e ósseo de animais de pequeno porte e o teste de uso em primatas e humanos. (Sousa *et al.*, 2000). Neste nível, os materiais teste podem ser

injetados diretamente (Figueiredo *et al.*, 2001) ou implantados por meio de dispositivos, em tecido subcutâneo (Nassri *et al.*, 2003; Zafalon *et al.*, 2007; Gomes-Filho *et al.*, 2008; de Oliveira *et al.*, 2010) ou intra-ósseo (Sousa *et al.*, 2004; Zmener *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2006). São realizados no intuito de informar sobre o padrão de resposta tecidual desenvolvido no organismo frente a um material, com a vantagem de poder comparar as respostas teciduais desencadeados por diferentes materiais implantados num mesmo animal (Costa *et al.*, 2005).

No terceiro nível, os testes comprobatórios (avaliando-se materiais endodônticos) são os que avaliam a resposta do tecido pulpar, tecidos apicais e periapicais frente ao material. Eles envolvem o uso de animais, principalmente cães (Torabinejad *et al.*, 1995; Leonardo *et al.*, 1999) ou macacos (Torabinejad *et al.*, 1997; Bernath & Szabo, 2003). Nesta fase os canais radiculares são tratados e os materiais de preenchimento são levados até a junção cemento-dentina ou deliberadamente extruídos a fim de se induzir a reação do tecido periapical (Hauman & Love, 2003a). Estes testes são considerados caros, demorados e difíceis de serem controlados (Hauman & Love, 2003a). Por fim, no intuito de determinar a biocompatibilidade de materiais endodônticos permanentes, é necessário realizar estudos em humanos, clínicos retrospectivos ou prospectivos controlados (Hauman & Love, 2003a).

2.3 Implante subcutâneo

A avaliação da biocompatibilidade por meio da introdução dos materiais em tecido subcutâneo de animais é considerada como um teste secundário pela ADA (Costa *et al.* 2001) e FDI e foi idealizada por Dixon e Rickert (1933) e aperfeiçoada por Torneck (1966).

Modelos experimentais em roedores têm sido bastante utilizados para a avaliação de cimentos endodônticos, com uma metodologia que varia desde a injeção dos cimentos em conjuntivo subcutâneo (Figueiredo *et al.*, 2001), até testes de implantação de tubos de teflon (Economides *et al.*, 1995; Kolokouris *et al.*, 1998; Sousa *et al.*, 2006; Zafalon *et al.*, 2007), polietileno

(Torneck, 1961; Torneck, 1966; Gördyusus *et al.* 1998; Scarparo *et al.*, 2009), silicone (Zmener *et al.*, 1990; Zmener *et al.*, 2005; de Oliveira *et al.*, 2010; Zmener *et al.*, 2010), e tubos produzidos a partir de dentina humana (Gomes-Filho *et al.*, 2008; Garcia Lda *et al.*, 2010) Implantes realizados diretamente no tecido ósseo também são utilizados, principalmente na análise de materiais retro-obturadores (Pertot *et al.*, 1992 ; Sousa *et al*, 2006).

O implante de cápsulas de colágeno contendo o material a ser avaliado (Zambuzzi *et al.*, 2005) é uma metodologia recente, porém de uso restrito na avaliação de materiais endodônticos, uma vez que, após a dissolução do colágeno, os cimentos ou pastas escoariam para todo tecido conjuntivo, dificultando assim a avaliação do material testado (Bortolo, 2009).

Os tubos de dentina, utilizados desde 1928, apresentam boa tolerância tecidual. Este método utiliza raízes dentais humanas autoclavadas buscando mimetizar condições clínicas (Gomes-Filho *et al.*, 2008). Além disso, permite simular a anatomia de raízes humanas e avaliar a ação dos materiais testados nas paredes dentinárias (Horsted *et al.*, 1980).

Já os implantes subcutâneos de materiais contidos em tubos de teflon ou polietileno caracterizam-se por serem de fácil manipulação e implantação, quimicamente estáveis e não sofrem influência das substâncias que possam ser acondicionadas em seu interior (Torneck, 1966).

Segundo Ozbas *et al.* (2003), a introdução dos materiais experimentais em tubos é reconhecida como método válido para o implante de materiais odontológicos endodônticos, pois simula as condições clínicas dos canais radiculares, ou seja, o contato da abertura apical com o tecido conjuntivo periapical. Outra vantagem da aplicação deste método é a de permitir a implantação de materiais prontamente manipulados, diminuindo a difusão para os tecidos adjacentes dos componentes dos materiais testados, assim como o controle da quantidade de material que ficará em contato com os tecidos, padronizando o contato material/tecido por meio do diâmetro do tubo Kolokuris *et al.*,1998). Neste tipo de teste, a intensidade da resposta

inflamatória está relacionada ao período de tempo pós-implante, ao tipo e a quantidade de material utilizado. (Batista *et al.*, 2007).

No modelo introduzido por Torneck (1966), (Scarparo, 2007), foi avaliado a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos à presença de tubos de polietileno vazios. O autor observou que, após o período de sessenta dias ocorria o reparo do tecido conjuntivo com a formação de cápsula fibrosa envolvendo os implantes, rica em fibroblastos e fibras colágenas. O polietileno não causa irritação aos tecidos circunjacentes, assim a reação na abertura do tubo é relacionada apenas à toxicidade do material contido em seu lume. (Ozbas *et al.*, 2003).

Esta técnica de implantação tem sido usada em inúmeros trabalhos (Leal *et al.*, 1988; Costa *et al.*, 1997; Nassri *et al.*, 2003; Onay *et al.*, 2007; Scarparo *et al.*, 2009; Garcia Lda *et al.*, 2010). Eles comprovaram que a pouca ou nenhuma resposta inflamatória tecidual na interface tubo/tecido, permite avaliar a reação promovida na interface cimento/tecido, a qual é classificada de acordo com a intensidade e duração da inflamação promovida pelos materiais.

Essa reação aos materiais implantados é classificada como aguda ou crônica, e subdividida em leve, moderada, severa ou ausente. Porém, há uma ampla variedade de critérios utilizados na classificação histológica para determinação da biocompatibilidade de um material (Figueiredo *et al.*, 2001; Shahi *et al.*, 2006; Onay *et al.*, 2007). O tipo de célula predominante em cada período pós-implantação avaliado, o aspecto da matriz extracelular e a presença de cápsula conjuntiva são importantes fatores a serem avaliados (Zafalon *et al.*, 2007; de Campos-Pinto *et al.*, 2008; Garcia Lda *et al.*, 2010).

2.4- Tecido conjuntivo normal *versus* inflamação

De acordo Zafalon (2004), a utilização de materiais biocompatíveis, dentro dos padrões aceitáveis, adicionada ao grau de inflamação causado é de suma importância para a recuperação dos tecidos e do paciente. Tal resposta inflamatória é defensiva e tem por objetivo localizar e eliminar o agente agressor, protegendo, ao mesmo tempo, os tecidos vizinhos.

John Hunter, cirurgião dentista, observou em 1793 que, a inflamação não é uma doença, mas uma resposta inespecífica que possui um efeito salutar sobre o seu hospedeiro. *Cornelius Celsus*, escritor romano do primeiro século da era cristã, descreveu os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. (Consolaro, 2009)

A inflamação, entre várias definições, pode ser considerada uma reação da microcirculação induzida por uma injúria aos tecidos, com a consequente movimentação de elementos intravasculares, células e moléculas para o espaço extravascular. (Siqueira Jr.& Dantas, 2000). Ela representa um mecanismo de defesa tecidual próprio dos tecidos conjuntivos e ocorre apenas em tecidos vascularizados, pois depende dos vasos para levar até a região agradida as células e substâncias necessárias ao controle do agressor e reparar, em seguida, a área afetada (Consolaro, 2009).

Ao extravasar ou ultrapassar o limite do ápice radicular, o material obturador entra em contato com o tecido conjuntivo presente no periodonto (Bernath & Szabo, 2003), local onde reside uma enorme quantidade de fibroblastos e células de defesa (Siqueira, 2005).

A destruição, diluição, dissipação ou circunscrição do agente agressor implica mobilização de substâncias e de células sanguíneas, com participação fundamental do aparelho circulatório, especialmente da microcirculação em função da permeabilidade das paredes venulares e capilares (Consolaro, 2009).

As mudanças moleculares são resultantes de respostas celulares às injúrias. As células mobilizam recursos próprios ou com o auxílio de células especializadas em defesa procuram manter sua integridade morfológica e funcional (Zafalon, 2004). É comum considerar que bactérias e outros microorganismos sejam causadores de inflamação, mas agentes físicos, químicos, tecido necrótico e reações imunológicas podem levar a uma reação inflamatória. A persistência dessa inflamação local é indesejável, podendo

ocasionar dor local, edema, desintegração da matriz extracelular e atraso no processo de reparo (Huang *et al.*, 2005).

O tecido conjuntivo apresenta diversos tipos de células como fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, células adiposas e leucócitos polimorfonucleares, separadas por um abundante material extracelular na qual se encontram vasos sanguíneos e linfáticos (Junqueira & Carneiro, 2004). Ao conjunto de células sanguíneas que infiltram na área lesada e nela acumula-se, pode ser referido como infiltrado inflamatório (Consolaro, 2009).

Os fibroblastos sintetizam as fibras colágenas, reticulares e elásticas além das glicoproteínas e proteoglicanas da matriz extracelular (Junqueira & Carneiro, 2004). Alguns exibem motilidade e contratilidade, características que auxiliam na organização estrutural do tecido durante o reparo e desenvolvimento. Portanto, apresentam funções tais como participar da resposta imune desencadeada pela presença de um agente estranho proliferando e invadindo o sítio de uma lesão, servir para a base de migração celular, participar da formação do tecido de granulação e remodelar esse tecido levando à colagenização da ferida e à formação de uma cicatriz fibrosa. (Siqueira Jr. & Dantas, 2000).

Os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) apresentam função na resposta inflamatória aguda à lesão tecidual, caracterizando-se por serem células móveis com atividade fagocitária. Podem estar envolvidos, em número reduzido, nos processos crônicos, mas em processos supurativos, ainda que crônicos, podem exercer papel de destaque. (Siqueira, 2003 a). Sua interação com bactérias executa a regurgitação e citólise com intensa liberação de enzimas lisossomas e digestão tecidual local promovendo a formação de pus (Consolaro, 2009). Quando em contato com cimentos endodônticos, eles liberam enzimas para o meio extracelular, destruindo as proteínas estruturais do tecido. Esta lise possivelmente atrai macrófagos para a região, propiciando uma renovação celular constante estimulada pela morte celular (Consolaro, 2009).

Os macrófagos são importantes componentes celulares do tecido de granulação, e são responsáveis pela remoção de debris celulares, fibrina e outros materiais estranhos da região a ser reparada. Na presença de estímulos quimiostáticos adequados, eles promovem a migração e proliferação de mastócitos, polimorfonucleares leucócitos e linfócitos. Todas essas células contribuem direta ou indiretamente para recuperação do tecido pela migração e proliferação de fibroblastos (de Oliveira *et al.*, 2010)

Quando ocorrem falhas na devolução da normalidade às células e, no local ocorre evolução para a necrose, haverá liberação de proteínas livres na região que será detectada pelos mastócitos que liberam mediadores, dando início à resposta inflamatória. Os matócitos são células teciduais fixas carregadas de grânulos de secreção ricos em mediadores químicos como a histamina e as glicosaminoglicanas. Esses colaboram com as reações imunes e tem papel fundamental na proteção do organismo, como por exemplo, na inflamação, nas respostas alérgicas e na expulsão de parasitas (Junqueira & Carneiro, 2004). Além disso, eles possuem função relevante na gênese do tecido conjuntivo, incluindo a liberação de mediadores que estimulam a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (Garbuzenko *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2007). Sua maior concentração acontece nos espaços perivasculares, perineurais e subepiteliais (Consolaro, 2009).

Embora plasmócitos e basófilos também possam ser encontrados no conjuntivo, são células que apresentam menor importância para o desenvolvimento das reações inflamatórias desenvolvidas pelo contato com um “biomaterial”. Eles são usualmente encontrados em processos inflamatórios crônicos. Estas células produzem anticorpos específicos para bactérias e/ou proteínas estranhas, tendo dessa forma importância clínica visto que sugerem reação inflamatória humoral. Elas relacionam-se, portanto, com as respostas imunes de base celular e de síntese de anticorpos (Scarparo, 2007).

O processo inflamatório pode ser dividido em agudo e crônico. A inflamação aguda é caracterizada por ser de curta duração (alguns minutos, horas ou poucos dias) e principalmente pela exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas (edema) e migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos.

Já a inflamação crônica possui duração maior e está associada histologicamente com a presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e tecido necrótico (Fujiwara & Kobayashi, 2005).

A inflamação crônica é frequentemente associada à destruição irreversível do parênquima, sendo esta lesão preenchida por tecido conjuntivo fibroso (Consolaro, 2009). Células inflamatórias, principalmente neutrófilos e macrófagos, recrutados durante a resposta inflamatória inicial, produzem citocinas e quimiocinas, mediadores responsáveis pela migração e proliferação de células de reparo com fibroblastos e pela neo-angiogênese (Mantovani *et al.*, 2002). Portanto, para que ocorra reparo, é necessário a formação de novos vasos e formação de brotos nos já existentes, fenômenos chamados de neo-angiogênese e neo-vascularização, e também deposição de nova matriz e remodelação (Singer & Clark, 1999).

2.5 – Fibras Colágenas

As fibras do tecido conjuntivo são formadas por proteínas que se polimerizam formando estruturas muito alongadas.

As fibras colágenas são formadas pela proteína colágeno, um tipo de família de proteínas, selecionadas durante a evolução dos organismos, para exercer diferentes funções, principalmente estruturais. Durante esse processo, essas proteínas, influenciadas pelo meio ambiente e pelas necessidades funcionais do organismo dos animais, modificaram-se, adquirindo variáveis graus de rigidez, elasticidade e força de tensão. O colágeno é o tipo mais abundante de proteína do organismo, representando 30% do seu peso seco. (Junqueira & Carneiro, 2004).

A síntese do colágeno foi inicialmente associada a um grupo restrito de células do conjuntivo como fibroblastos, osteoblastos, condroblastos e osteoblastos. Atualmente, entretanto, existem suficientes evidências que mostram que vários outros tipos celulares também podem produzir esta proteína, que se distingue pela sua composição química, características

morfológicas, distribuição, funções e patologias. Nos colágenos tipo I, II e III, as moléculas de colágeno (tropocolágeno) se agregam em subunidades (microfibrilas) que se juntam para formar as fibrilas. Pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas são importantes para a união destas moléculas. Posteriormente, esta união é reforçada pela formação de ligações co-valente, catalisadas pela atividade de enzima lisil oxidase, que oxida moléculas do aminoácido lisina, estabelecendo pontes entre elas. As fibrilas de colágeno são estruturas finas e alongadas com diâmetro variável (20 a 90 nm) e que podem atingir vários micrômetros de extensão. Elas possuem estriações transversais com uma periodicidade característica de 64nm determinada pela sobreposição das moléculas de tropocolágeno. Nos colágenos tipo I e tipo III, estas fibrilas se associam para formar fibras. (Junqueira & Carneiro, 2004)

As fibras colágenas clássicas (feitas de colágeno tipo I) são as fibras mais numerosas no tecido conjuntivo. Elas são estruturas longas, com percurso sinuoso e, por causa disto, suas características morfológicas são difíceis de serem estudadas em cortes histológicos. No estado fresco estas fibras têm cor branca, conferindo esta cor aos tecidos nos quais predominam. Estas fibras são birrefringentes, pois são constituídas por moléculas alongadas, arranjadas paralelamente umas às outras. Desse modo, quando examinadas no microscópio de polarização, entre filtros polaróides, as fibras aparecem brilhantes contra um fundo escuro. Alguns corantes ácidos compostos por moléculas alongadas, como por exemplo, o Sirius Red, são capazes de se ligar paralelamente a moléculas de colágeno intensificando consideravelmente a sua birrefringência normal, produzindo uma cor amarela forte. Devido a esta propriedade, o Sirius Red é usado como método específico para detecção do colágeno. (Junqueira & Carneiro, 2004).

Proposição

3- Proposição

O presente estudo teve como objetivos avaliar:

Histologicamente o padrão de resposta tecidual inflamatória dos cimentos Sealer 26®, Epiphany®, AH Plus® e Endofill, recém-manipulados, nos períodos de 7, 14, 21, 42 e 60 dias e a presença da cápsula fibrosa formada na interface cimento-tecido conjuntivo e a quantidade de colágeno presente em sua constituição.

Materiais e Métodos

4-Material e Métodos

4.1- Cimentos Endodônticos

Os cimentos testados no presente estudo e sua composição estão apresentados no quadro abaixo:

MATERIAL	INDÚSTRIA	COMPOSIÇÃO
Epiphany®	Pentron Clinical Technologies, LLC., Wallingford, CT, EUA.	Resinas: UDMA (dimetacrilato uretano) PEGDMA (polietileno glicol dimetacrilato) EBPADMA(bisfenolAdimetacrilato etoxilato), BIS-GMA (bisfenolAglicidil metacrilato) . Sulfato de bário, óxido de bismuto, hidróxido de cálcio, sílica, aminas, peróxidos, fotoiniciadores e pigmentos.
AH Plus®	Dentsply De Trey, Konstanz, Alemanha	Pasta A: resina epóxica, tungstênio de cálcio, óxido de zircônio, aerosil, óxido de ferro. Pasta B: amina adamantana, N,N-Dibernil-5-oxanonano-diamina1,9,TCD-Diamina, tungsteanato de cálcio, aerosil, óleo de silicone.
Sealer 26®	Dentsply Indústria e Comércio Ltda. Maillefer	Pó: Trióxido de Bismuto, Hidróxido de Cálcio, Hexametileno Tetramina, Dióxido de Titânio. Resina: Epóxi Bisfenol.
Endo Fill	Dentsply HERO Indústria e Comércio Ltda. Petrópolis- RJ, Brasil.	Pó: Óxido de Zinco, Resina Staybelite, Subcarbonato de Bismuto, Sulfato de Bário, Tetraborato de Sódio anidro. Líquido: Eugenol.

Quadro 1. Cimentos endodônticos, fabricantes e composição química.



Figura 1. Ilustração dos cimentos endodônticos; A. Epiphany®; B. Sealer 26®.



Figura 2. Ilustração dos cimentos endodônticos: Endofill e AH Plus®.

4.2- Animais

Neste estudo foram utilizados 35 ratos Wistar (*Rattus Norvegicus*) machos, da mesma linhagem, adultos-jovens, com idade entre 2 a 3 meses e peso corporal entre 300 a 400g, provenientes do Biotério Central da

Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas forradas com serragem, recebendo ração sólida comercial balanceada e água *ad libitum* e, com condições de saúde satisfatória. Previamente ao início do presente estudo, o projeto de pesquisa foi submetido à avaliação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA- Protocolo N° 016/09 - Anexo 1), da Universidade Federal de Uberlândia, o qual foi aprovado no dia 21 de janeiro de 2009.

4.3-Pré-Operatório

Inicialmente os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais de acordo com o período de observação histológica (7, 14, 21, 42 e 60 dias). Cada grupo possuía sete animais, e identificados individualmente por números (Figura 3).

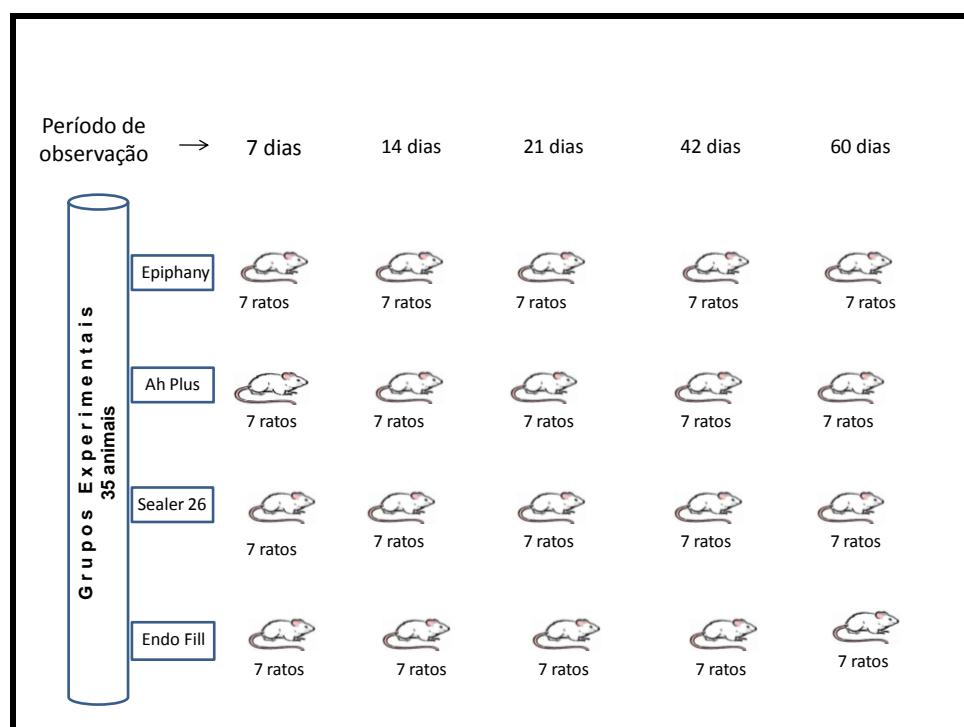


Figura 3 - Representação esquemática dos grupos experimentais.

Os procedimentos foram realizados, de forma simultânea e sincronizados, por uma equipe de colaboradores, o que permitiu maior agilidade e confiabilidade dos procedimentos.

4.4-Confecção dos Corpos de Prova

Cento e quarenta (140) corpos de prova foram confeccionados a partir de sonda uretral estéril de 0,6mm de diâmetro interno (Embramed Ind. Com. Ltda- São Paulo-SP, Brasil). Os tubos foram preenchidos em toda sua extensão (Figura 4A) com os cimentos avaliados, manipulados de acordo com orientações do fabricante, utilizando seringa plástica de 5 ml. Com uma lâmina de bisturi estéril nº 15 (Lamedid Ltda, Tamboré-SP, Brasil) realizou-se os cortes dos corpos de prova (Figura 4B) com 10 mm de comprimento, mantendo-os em placas de petri estéreis. Neste momento outros colaboradores preparavam as lojas cirúrgicas nos animais para a inserção dos corpos de prova. As extremidades dos tubos permaneceram abertas, sendo que em uma das pontas, no momento da inserção dos implantes, foi completa com cimento. Esta extremidade com cimento fresco, em íntimo contato com o tecido adjacente, foi o local de observação da reação tecidual. O transporte do corpo de prova até a região subcutânea foi realizado com porta amálgamas. (Figura 4 C e D). A porção lateral do tubo de polietileno serviu como controle negativo das observações histológicas.

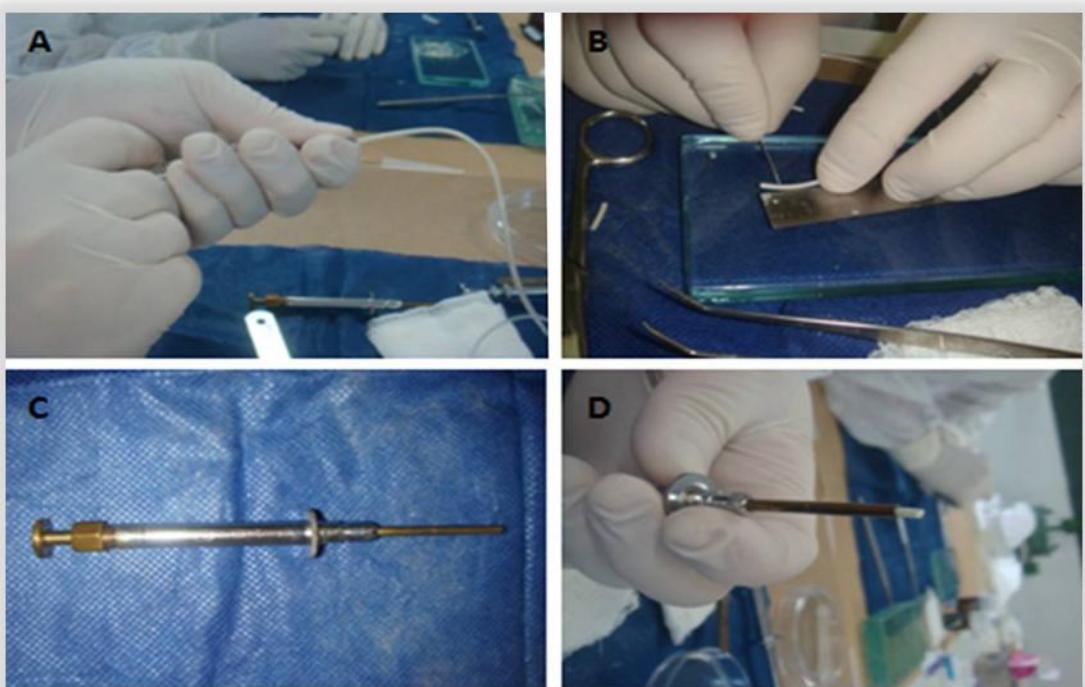


Figura 4. A. Inserção do cimento no tubo de polietileno em toda a sua extensão; B. Secção do tubo em partes de 1 cm; C. porta amálgama adaptado para a inserção do tubo no subcutâneo do rato; D. Aspecto do tubo em posição para a inserção.

4.5- Procedimento cirúrgico

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com o auxílio de seringas descartáveis de insulina de 1ml (BD Plastipak®, Becton Dickinson Ind. Cirúr. Ltda, Curitiba, Brasil), com Cloridrato de Cetamina (Cetamin®- Rhobifarma indústria farmacêutica Ltda), - 0,1ml/100gr/rato, associado ao cloridrato de xilazina 2% (Anasedan®- Vetbrands Saúde Animal) 0,07ml/100gr/rato, o qual é um agente sedativo, relaxante muscular e analgésico. (figura 5A). Após a administração anestésica, os animais foram mantidos em suas respectivas gaiolas individuais até a completa sedação. Quando necessário, realizava-se uma complementação anestésica.

Posteriormente, foi realizada a tricotomia manual na região dorsal dos animais (Figura 5B), a fim de evitar a penetração de pêlos nas lojas cirúrgicas. Em seguida, procedeu-se ao posicionamento do gabarito (Figura 5C) no dorso

dos animais e foram feitas as marcações dos locais incisões. Antes da incisão, a anti-sepsia do local com gaze embebida em digluconato de clorexidina 0,5% (Figura 5D). Os cimentos em estudo foram colocados nas lojas cirúrgicas de acordo com o esquema da Figura 6.

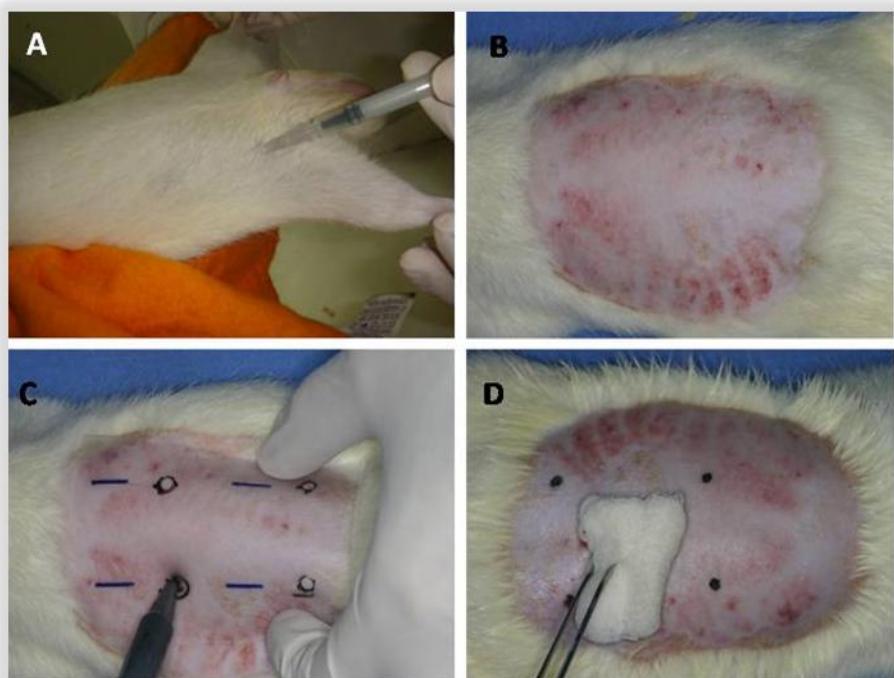


Figura 5. A. Anestesia; B. Tricotomia; C. Marcação realizada com gabarito; D. Assepsia com clorexidina.

Quatro incisões de 1cm de largura foram realizadas em forma de V com o auxilio de uma tesoura ponta-romba nas regiões previamente marcadas (Figuras 7 A e B). Realizou-se posteriormente a divulsão do tecido com a própria tesoura (Figura 7 C), aprofundando-se 2 cm acima da linha de incisão, confeccionando assim as lojas cirúrgicas.

Os corpos de prova, contendo os cimentos teste, foram inseridos cuidadosamente nas devidas lojas cirúrgicas, utilizando um dispositivo, tipo porta-amálgama (Figura 7D), de forma que o corpo de prova fosse devidamente protegido durante sua inserção, evitando contaminações nas paredes laterais. Os tubos foram posicionados de modo que a extremidade que

continha a complementação era voltada para a cabeça do animal, lado oposto ao da incisão, afim de que a reação inflamatória formada na área da incisão não interferisse na análise microscópica da interface cimento/tecido conjuntivo.

Após o posicionamento do implante, para fechamento da ferida foi utilizado cianoacrilato de etila (Super Bonder, Loctite, Itapevi, SP, Brasil), cooptando os bordos da lesão. Todos os procedimentos foram realizados sob rigorosas condições de assepsia.

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas individuais para que a cicatrização da ferida cirúrgica. Além disso, os animais permaneceram sob constante observação diária, para que intercorrências não pudessem comprometer o experimento. Os animais não receberam medicação pós-operatória com o objetivo de não provocar possíveis alterações nos resultados.

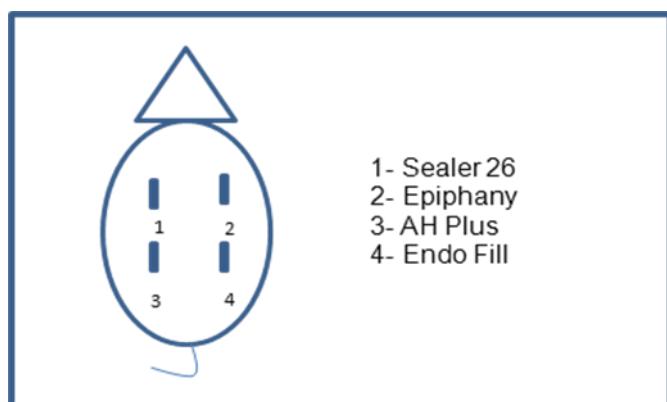


Figura 6. Demonstração da disposição dos cimentos nas lojas cirúrgicas

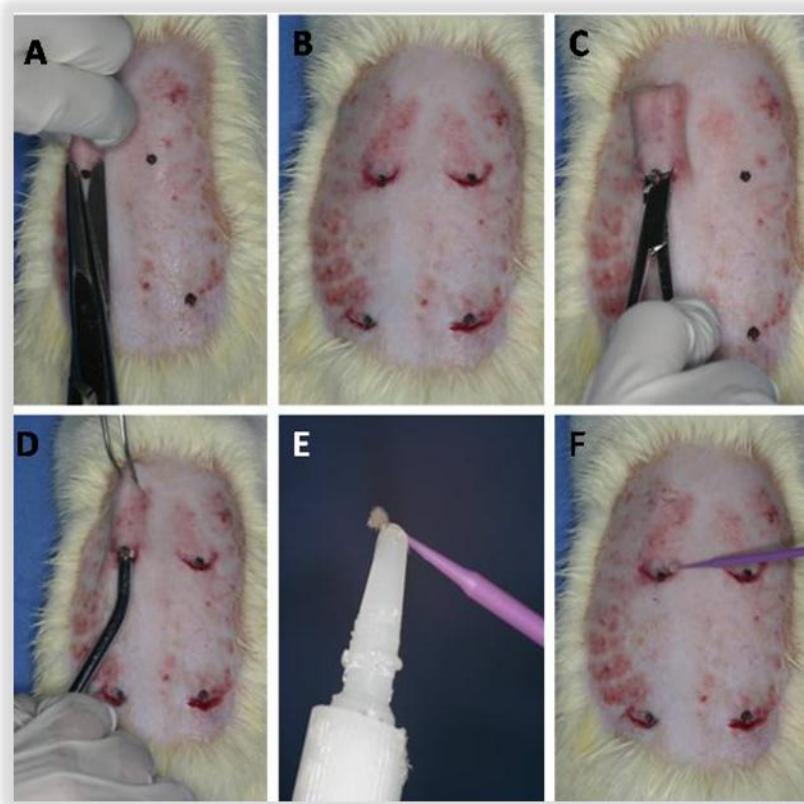


Figura 7- A e B Incisão com tesoura de ponta romba em forma de “V”, C. divulsão do tecido para a introdução do corpo de prova, D. Inserção do corpo de prova, E. Cola suberbonder®, F. Coaptação dos bordos da ferida.

4.6- Procedimento cirúrgico para remoção dos implantes.

Após os tempos experimentais de 7, 14, 21, 42 e 60 dias, sete animais de cada grupo foram anestesiados e realizou-se novamente a tricotomia e desinfecção da região. Utilizando tesoura ponta-romba, procedeu-se o descolamento e remoção da pele com o tubo de polietileno e tecidos adjacentes. A localização dos corpos de prova foi feita por meio de palpação. As áreas que continham os tubos implantados foram retiradas por meio do recorte de um retalho, abrangendo tecido normal adjacente além da área a ser estudada (Figura 8 A,B e C). O sacrifício do animal anestesiado foi feito por meio de deslocamento cervical.

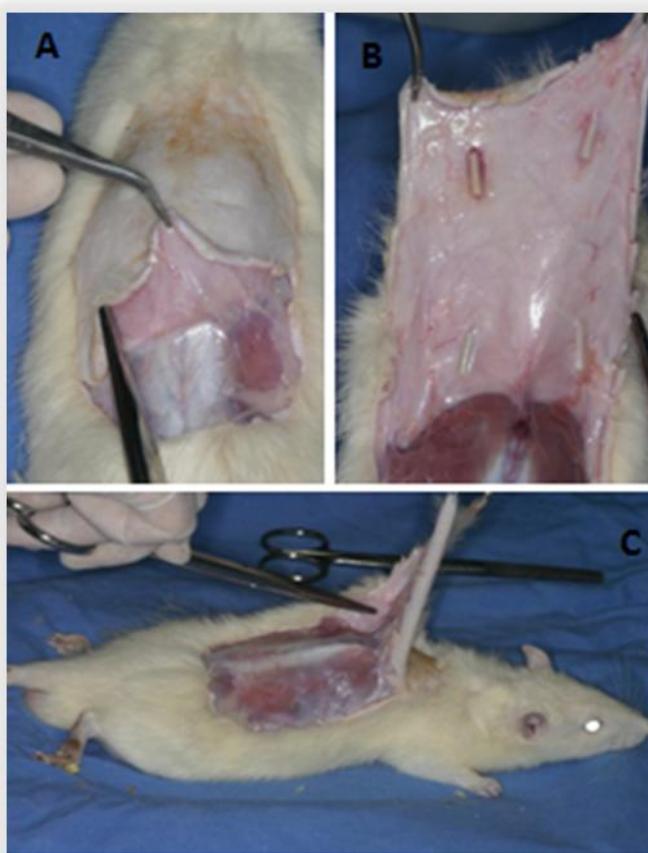


Figura 8. A. B.e C. Procedimento cirúrgico para remoção de implantes e tecidos adjacentes.

As peças foram fixadas com alfinete em placas de parafina para que a pele ficasse distendida facilitando assim, o processo de fixação histológica. Em seguida, foram imersas em formol a 10% tamponado e em PBS 0,1M por 48 horas, em frascos unitários opacos, ao abrigo da luz, com a identificação do rato, grupo e localização dos tubos, para posterior análise histopatológica.

4.7-Análise histopatológica

Após a fixação, as peças cirúrgicas foram lavadas em tampão PBS, analisadas macroscopicamente, sendo aparadas com navalhas permanecendo cerca de 3mm de tecido em torno do implante.

Os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xanol e incluídos em parafina, posicionados de forma que a face de corte do bloco fosse paralela ao longo eixo do implante (Figura 9 A).

Os blocos de parafina (figura 9) foram identificados e posicionados em micrótomo (Micrótomo Leica RM 2145, Leica microsystems, Wetzlar, Germany), sendo então seccionados até se encontrar os tubos de polietileno. Estes foram cuidadosamente removidos e o espaço por eles ocupados foi preenchido com parafina líquida. Após 24 horas, a microtomia foi retomada, obtendo-se 20 cortes semi-seriados, longitudinais à extensão do tubo, com 5 μm de espessura, passando pelas duas interfaces cimento endodôntico/conjuntivo subcutâneo. Metade dos cortes obtidos foram corados em Hematoxilina e eosina (HE), para análise qualitativa ao Microscópio de Luz (ML- Olympus Optical Co. LTD, Brasil), segundo critério apresentado a seguir. A outra metade das lâminas histológicas foi processada e corada em Picrosírius para a análise das fibras colágenas utilizando polarização ótica.

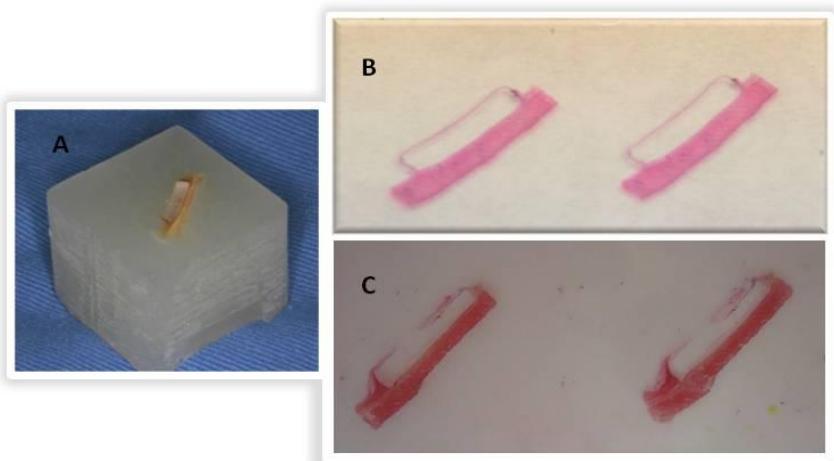


Figura 9. **A.** Ilustração do implante incluído em parafina. **B.** Lâmina histológica contendo cortes corados em HE. **C.** Lâmina histológica contendo corte corado em Picro-Sirius.

4.8-Métodos de análise

4.8.1. Análise histológica qualitativa

O processo de reparo e a intensidade da inflamação do tecido em contato com o cimento endodôntico foram avaliados morfologicamente considerando os tipos celulares presentes no infiltrado inflamatório e as características da cápsula presente na interface implante/tecido conjuntivo.

Para a avaliação histopatológica, foi utilizado microscópio óptico com conjunto ótico para aumentos de 4, 10, 40 e 100X. Para cada espécime, foram analisadas três lâminas histológicas, na região de interface cimento/tecido conjuntivo. Foram avaliados, por meio de análise histopatológica descritiva, diferentes eventos microscópicos, tais como:

- Tipo de infiltrado inflamatório (células polimorfonucleares e/ou células mononucleares).
- Presença de células fagocitárias (macrófago e células gigantes multinucleadas).
- Presença de necrose.
- Material residual.
- Presença de fibroblastos no local, compondo um tecido conjuntivo denso modelado ou não.

A intensidade da reação inflamatória foi estabelecida de forma descritiva seguindo os critérios (FDI):

- ✓ Ausente: Ausência de reação inflamatória.
- ✓ Discreta: Escassas células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo.
- ✓ Moderada: Grande quantidade de células inflamatórias dispostas focalmente.

- ✓ Intensa: Grande quantidade de células inflamatórias difusas no tecido conjuntivo adjacente.

A intensidade da reação observada em cada corte foi convertida em scores 0, 1, 2 e 3, correspondentes a inflamação ausente, leve, moderada e intensa, respectivamente. Os scores foram utilizados para análise estatística dos dados.

4.8.2 Avaliação com picro-sírius e quantificação das fibras colágenas na cápsula fibrosa.

Para análise morfométrica das áreas de formação de cápsula fibrosa, foi utilizada a coloração Picro-sírius (PS). Para a coloração com PS as lâminas foram colocadas em solução de PS por 45 minutos, lavadas rapidamente em água destilada e contra coradas por 3 minutos na hematoxilina de Harris. A seguir as lâminas foram lavadas rapidamente em água, secadas ao ar livre, desidratadas em álcool absoluto (I, II e III), diafanizadas em xanol (I, II e III) e montadas com uma gota de entelan e lamínula. A quantificação da espessura da cápsula foi realizada sob a luz polarizada, em aumento de 200 vezes. Por esse método, o colágeno mostra-se birrefringente. O colágeno tipo I, presente no tecido cicatricial apresenta fibras grossas, com coloração variando do amarelo-alaranjado ao vermelho. O colágeno tipo III, produzido por fibroblastos jovens antes do colágeno tipo I, que está presente em tecidos de granulação (reticulina) se apresenta como fibras finas, pouco compactadas, corando do amarelo-esverdeado ao verde. A região da cápsula foi marcada para obtenção do percentual de colágeno por área de campo analisado. Foram avaliados dois campos por corte, sendo o colágeno quantificado na interface em contato com a luz do tubo, região de maior contato com os cimentos, excluindo-se as periferias. A determinação da porcentagem de colágeno organizado de forma paralela, em fibras, em relação a área total avaliada no campo foi obtida utilizando-se o software Image J. Os campos de interesse foram capturados por meio de uma câmera acoplada a um microscópio e a um computador. Os resultados foram expressos em média de porcentagem de fibras colágenas por campo analisado. Esses dados foram submetidos à

análise estatística, objetivando comparar a espessura da cápsula fibrosa entre os cimentos em cada tempo experimental.

4.8.3 Análise estatística

Os dados obtidos após a classificação da intensidade de inflamação, convertidos em scores foram submetidos a teste para verificação da normalidade da amostra. Uma vez que esta não apresentou distribuição paramétrica, foi aplicado o teste de Friedman seguido pelo pós teste de Dun's. Os dados referentes a cápsula fibrosa também foram avaliados quanto a normalidade, sendo aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se $p<0.05$.

Resultados

5-Resultados

5.1. Análise macroscópica descritiva

De acordo com o acompanhamento dos animais ao longo da pesquisa e a análise macroscópica das peças cirúrgicas, em todos os períodos de avaliação, a cicatrização da ferida ocorreu de forma satisfatória, com ausência de exsudado.

5.2. Análise microscópica qualitativa

5.2.1. 7 dias

No primeiro período de análise foi observada inflamação intensa, com focos de necrose dependendo da quantidade do material residual. Notou-se, neste tempo de avaliação, grande semelhança entre os cimentos testados. No infiltrado inflamatório observou-se predomínio de linfócitos, macrófagos e células gigantes multinucleadas de corpo estranho (Figuras 10,11,12,13). Nos casos onde se utilizou o cimento Endofill (Figura 13), percebeu-se a predominância de células linfoplasmocitárias. Os vasos sanguíneos encontravam-se dilatados com microcirculação bastante ativa. A superfície lateral do tubo de polietileno (controle) apresentou inflamação discreta, com a nítida organização tecidual (Figura 30). Nesse período não se observou formação de tecido conjuntivo denso circundando o material. Mas, nos casos com utilização do cimento Epiphany® (Figura 11) observou-se evolução no processo reparador caracterizado por maior organização no posicionamento paralelo das células.

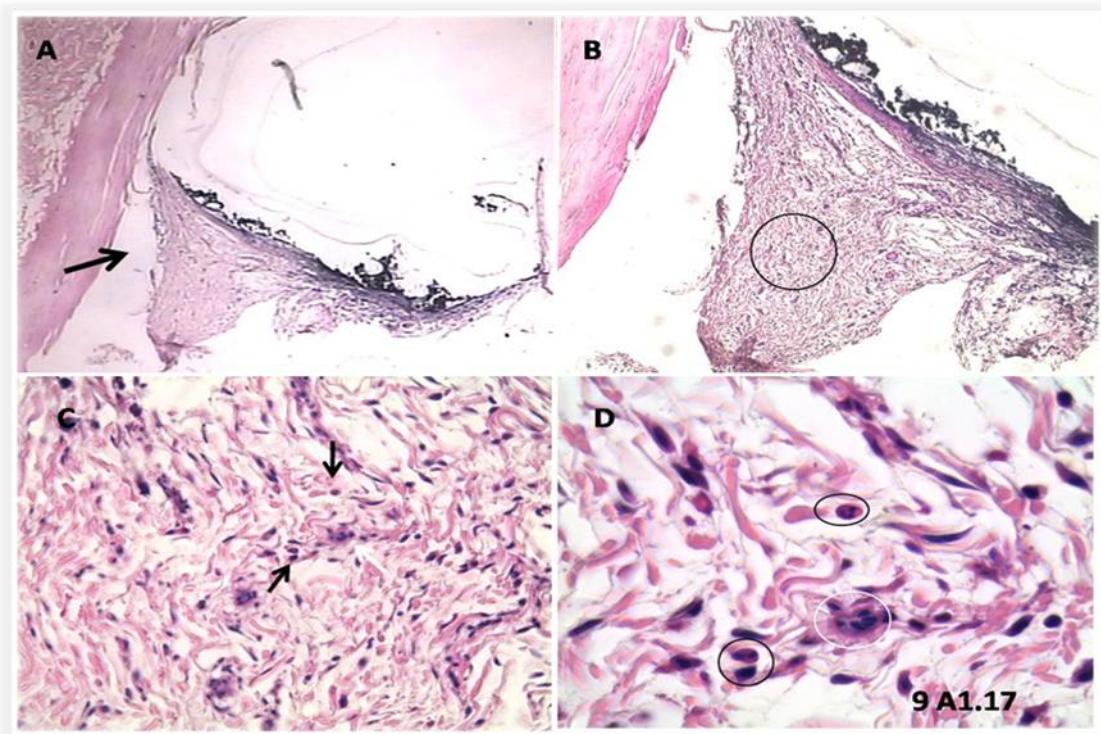


Figura10. Sealer 26® – 7 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Aumento da área de contato do corpo de prova com o tecido, caracterizando uma área sem contato com o material residual 10X. **C.** Aumento da região com células do infiltrado inflamatório 40X. **D.** Aumento, evidenciando neutrófilos (círculos pretos) e células gigantes (círculos brancos) 100X.

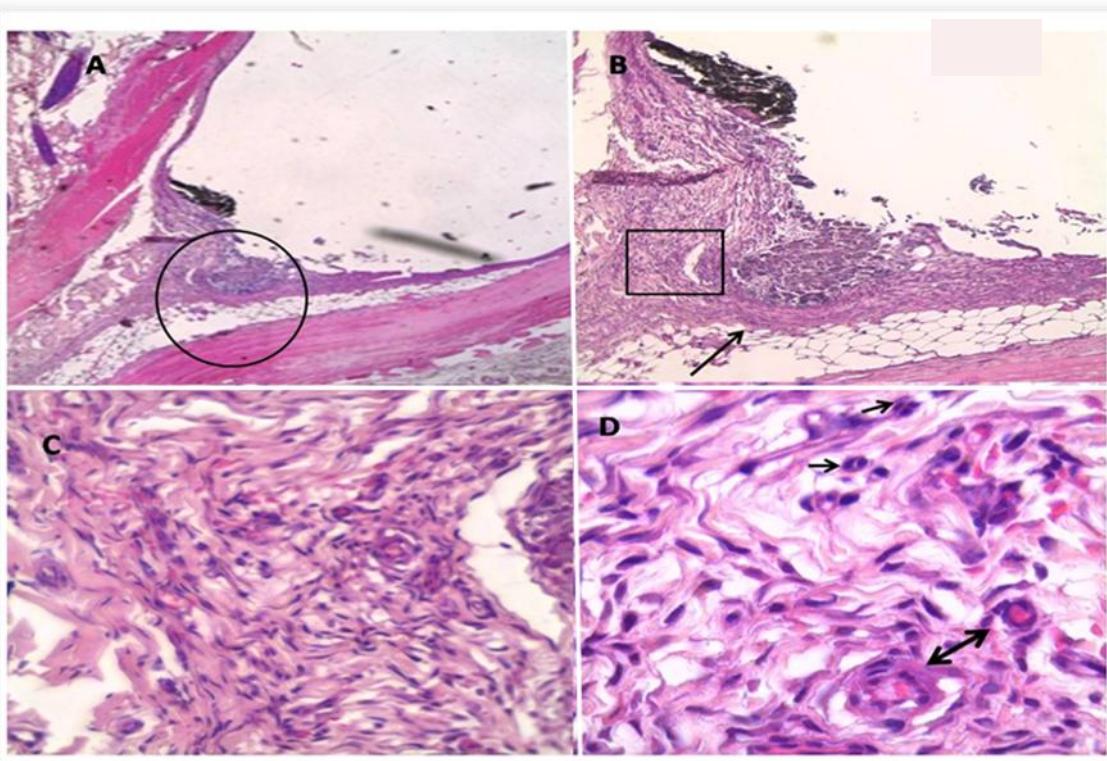


Figura 11. Epiphany® – 7 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Aumento da região circulada em A. Notar organização paralela das células ao redor do material (Seta) 10X. **C.** Aumento da região marcada por quadrado em B 40X. **D.** Aumento de C. Observar presença de células inflamatórias e vasos sanguíneos (microcirculação ativa) 100X.

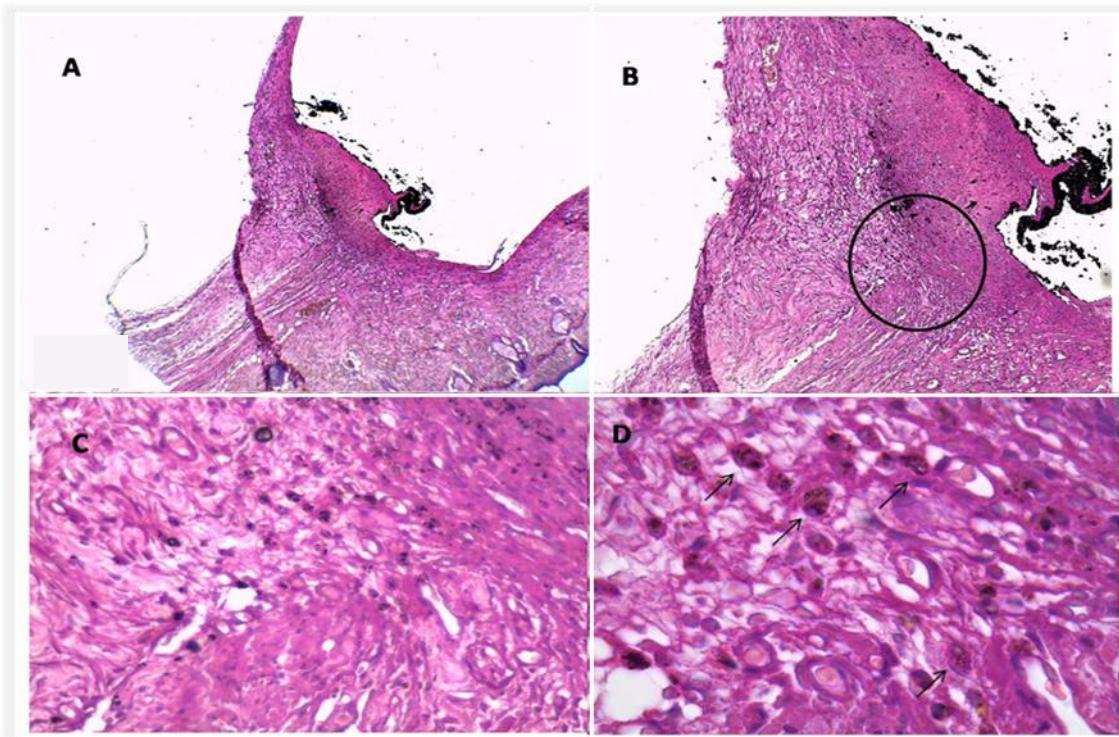


Figura12. AH Plus® – 7 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Maior aumento da área em contato com o tecido. Notar o aspecto de desorganização do tecido 10X. **C.** Presença de células do infiltrado inflamatório e microcirculação ativa 40X. **D.** Aumento: macrófagos com cimento em seu interior e pequenos vasos caracterizando a microcirculação 100X.

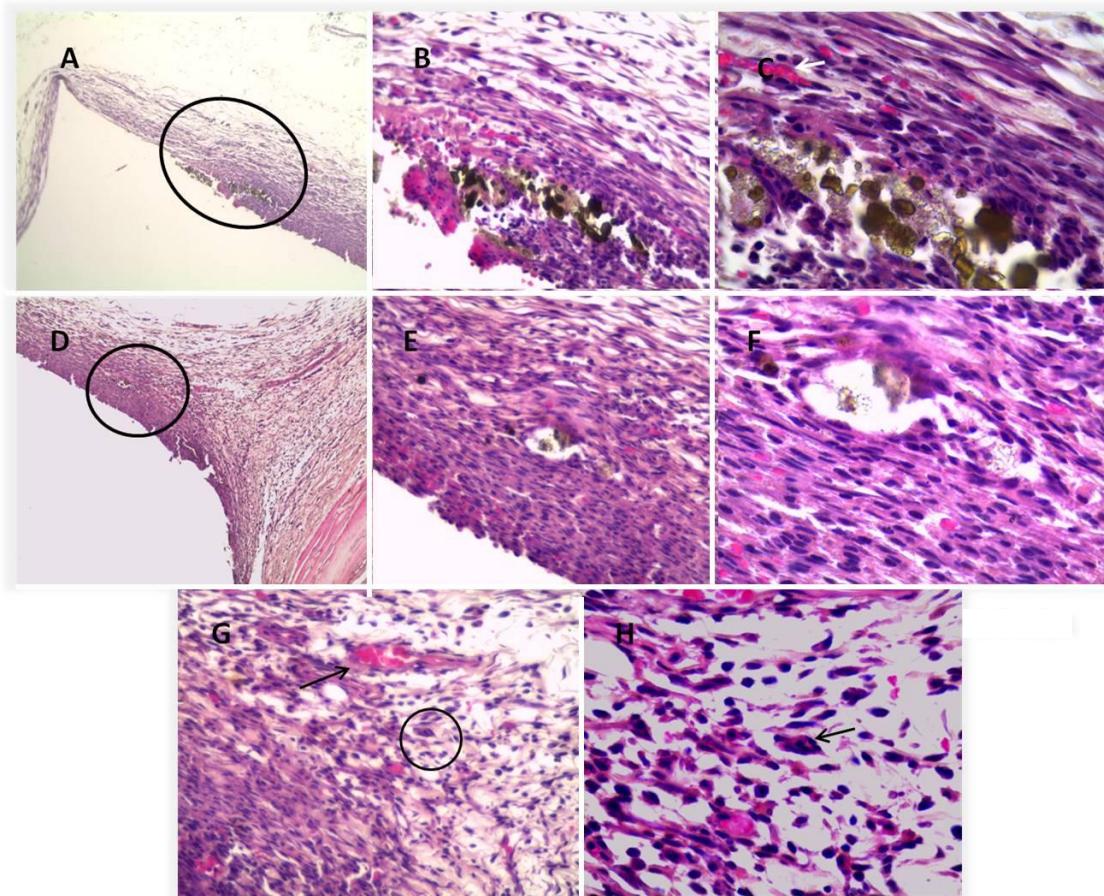


Figura13. Endofill – 7 dias. **A.** Vista panorâmica de um dos lados do implante 4X. **B.** Maior aumento evidenciando tecido em contato com o material 10X. **C.** Presença de células linfoplasmocitárias em maior aumento 40X. **D.** Vista panorâmica do outro lado do implante. **E.** Infiltrado inflamatório 40X. **F.** Predominância de células linfoplasmocitárias 100X. **G.**Microcirculação ativa (seta) e células gigantes (Círculo) 40X. **H.** Maior aumento células gigantes (seta) 100X.

5.2.2. 14 Dias

Aos 14 dias, ainda observou-se a presença da inflamação variando de discreta a moderada. De acordo com a quantidade de resíduo presente em contato com o tecido observou-se focos maiores ou menores de reação inflamatória. Notou-se, nos casos onde se utilizou os cimento Sealer 26® (Figura 14), AH Plus® e Epiphany® a presença de mastócitos. Neste período, foi observado o iniciou da formação de tecido conjuntivo denso, isolando os cimentos Epiphany® e AH Plus®, dos tecidos vizinhos (Figuras 15 e 16). Já na

presença do cimento Sealer 26®, verificou-se ainda certa desorganização tecidual. Notou-se que a quantidade de cimento residual interfere na formação da barreira de tecido conjuntivo denso, estando mais bem formada em locais onde a quantidade de resíduos não foi exagerada. Neste período o cimento Epiphany® apresentou melhor resposta tecidual, apresentando inflamação ausente a discreta, ainda evidenciada pela presença de macrófagos e vasos sanguíneos congestos (Figura 15). Com o cimento Endofill percebeu-se a presença de infiltrado linfoplasmocitário e a ausência de organização celular nas regiões próximas ao cimento (Figura17). A região de controle, a partir desse período de observação, apresentou-se sem inflamação, caracterizada pela presença de faixa de tecido conjuntivo denso.

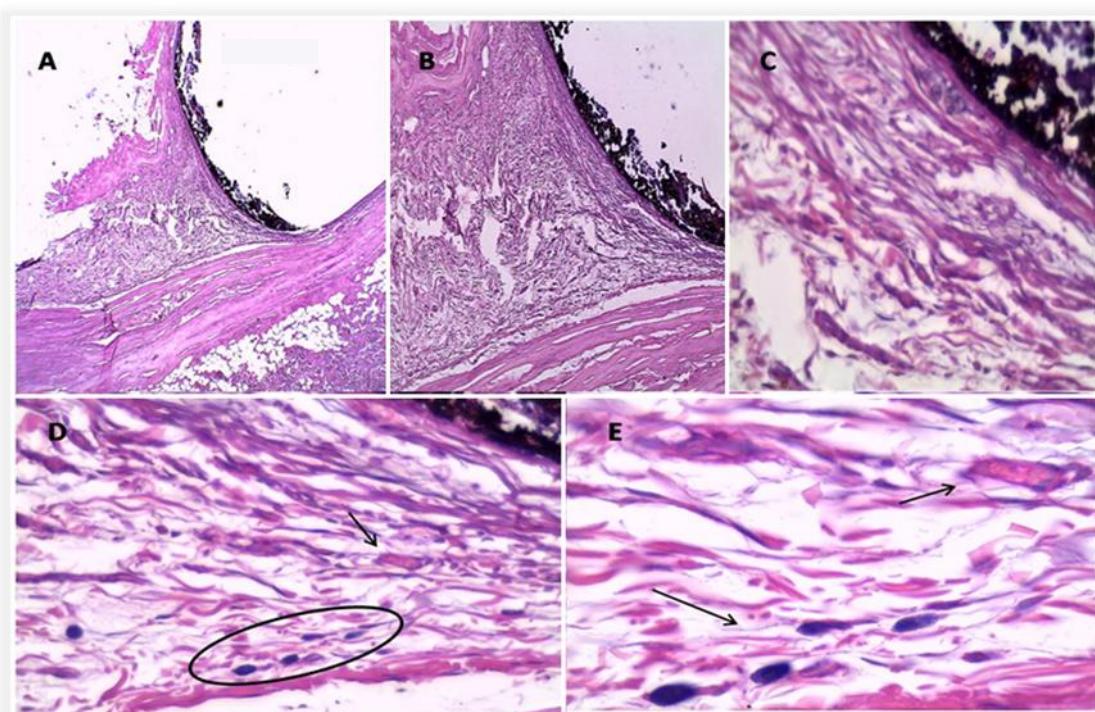


Figura14. Sealer® – 14 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Aumento da região em contato com o cimento. Notar a tentativa de organização celular delimitando a região 10X. **C.** Vista em maior aumento da formação capsular 40X. **D.** Presença de vasos congestos (seta) e mastócitos (círculo) 40X. **E.** Aumento de vasos e mastócitos (seta) 100X.

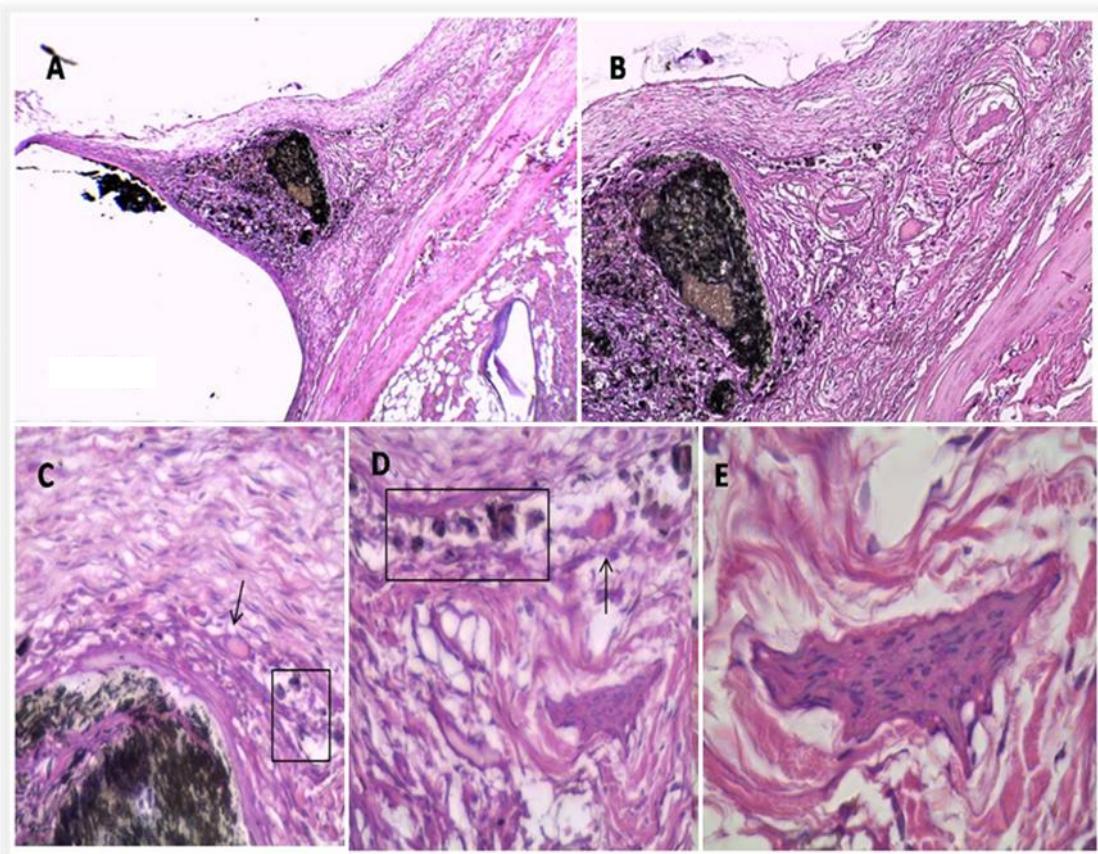


Figura15. Epiphany® - 14 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Maior aumento região em contato com o cimento. Notar presença de Células Gigantes de Corpo Estranho (círculos) 10X. **C.** Região de organização celular, porém com presença de macrófagos (Quadrado) e vasos sanguíneos (seta) 4X. **D.** Macrófagos (Quadrado) e Vasos sanguíneos (Seta) 40X. **E.** Maior aumento células gigantes de corpo estranho 100X.

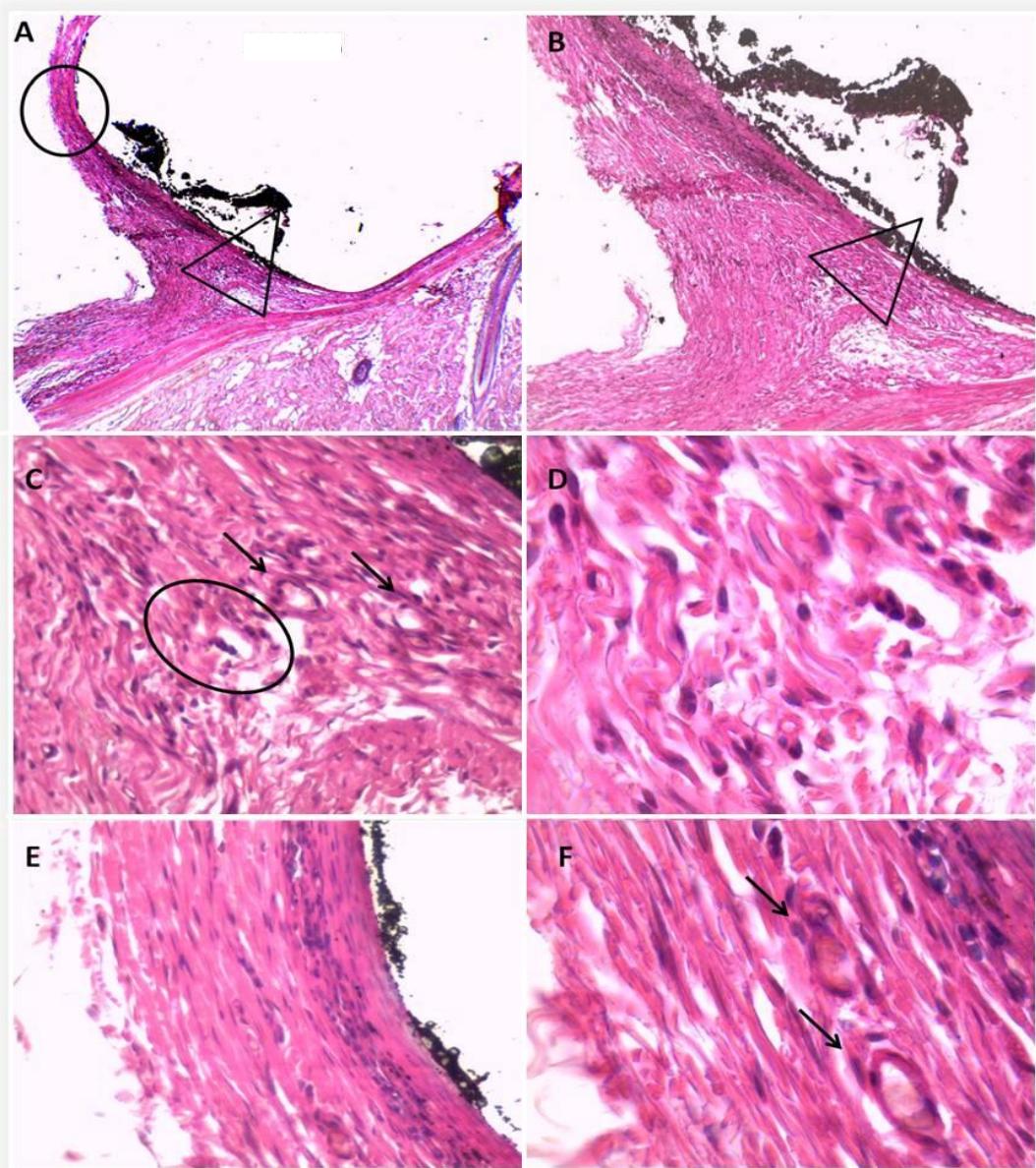


Figura16. AH Plus® – 14 dias. **A.** Vista panorâmica. Área em contato com menor quantidade de cimento (Círculo). Área em contato com maior quantidade de cimento (triângulo) 4X. **B.** Maior aumento da região em contato com o cimento (Infiltrado inflamatório – triângulo)10X. **C.** Área com infiltrado inflamatório, presença de vasos sanguíneos (setas) e células gigantes (Círculo) 40X. **D.** Aumento de C. 100X. **E.** Região pouco cimento: organização para formação de cápsula 40X. **F.** Presença de vasos na cápsula 100X.

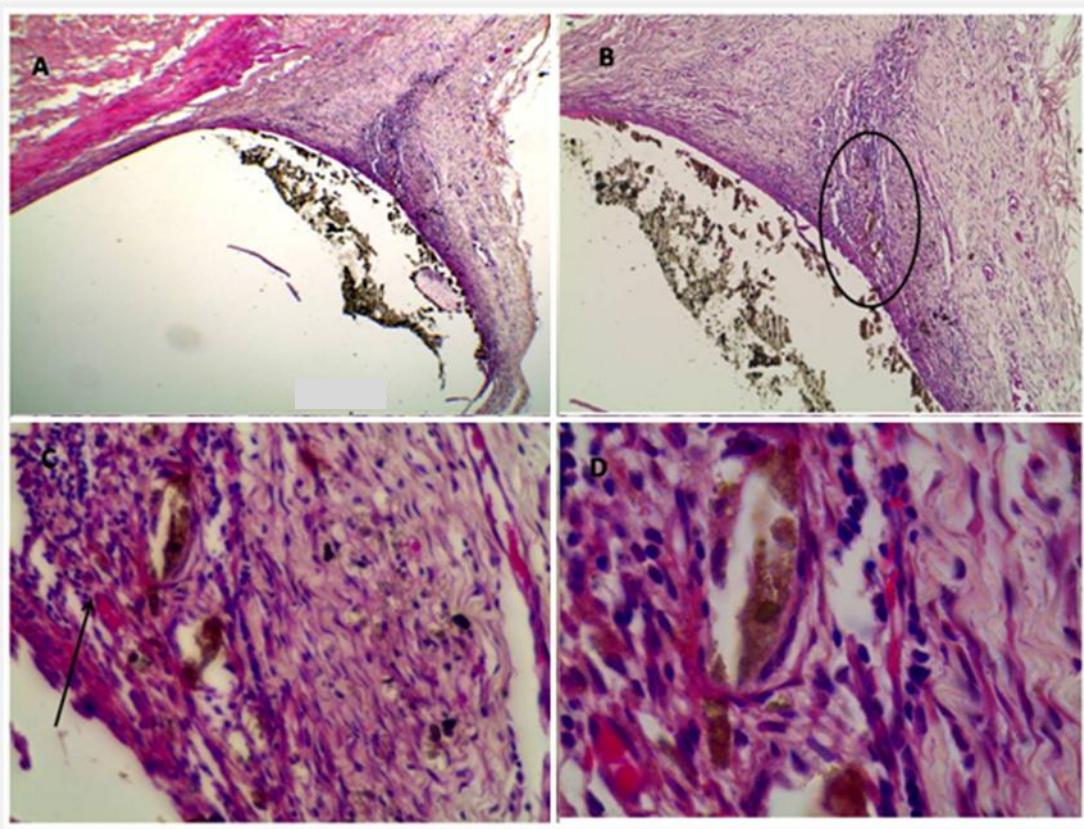


Figura 17. Endofill – 14 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Maior aumento da região em contato com o cimento. **C.** Observar infiltrado inflamatório (Seta) 40X. **D.** Maior aumento das células do infiltrado, com presença de vasos sanguíneos 100X.

5.2.3. 21 Dias

Aos 21 dias, verificou-se desde ausência de inflamação até inflamação discreta ou moderada, com presença de macrófagos relacionados às regiões onde há maior contato com o material avaliado. A resposta tecidual ao cimento Sealer 26® (Figura 18), foi equivalente aos cimentos Epiphany® e AH Plus® (Figuras 19 e 20) apresentando maior organização tecidual e formação de tecido conjuntivo denso envolvendo regiões com cimento (figura 18). Células gigantes multinucleadas de corpo estranho, vasos sanguíneos congestos e inflamação intensa associadas a focos de necrose, ainda foram notados nos implantes com Endofill (Figura 21). Neste período foi evidente a

formação de tecido conjuntivo denso. Em algumas regiões fica nítida a presença da cápsula fibrosa irregular livre de inflamação (Figuras 19 e 20).

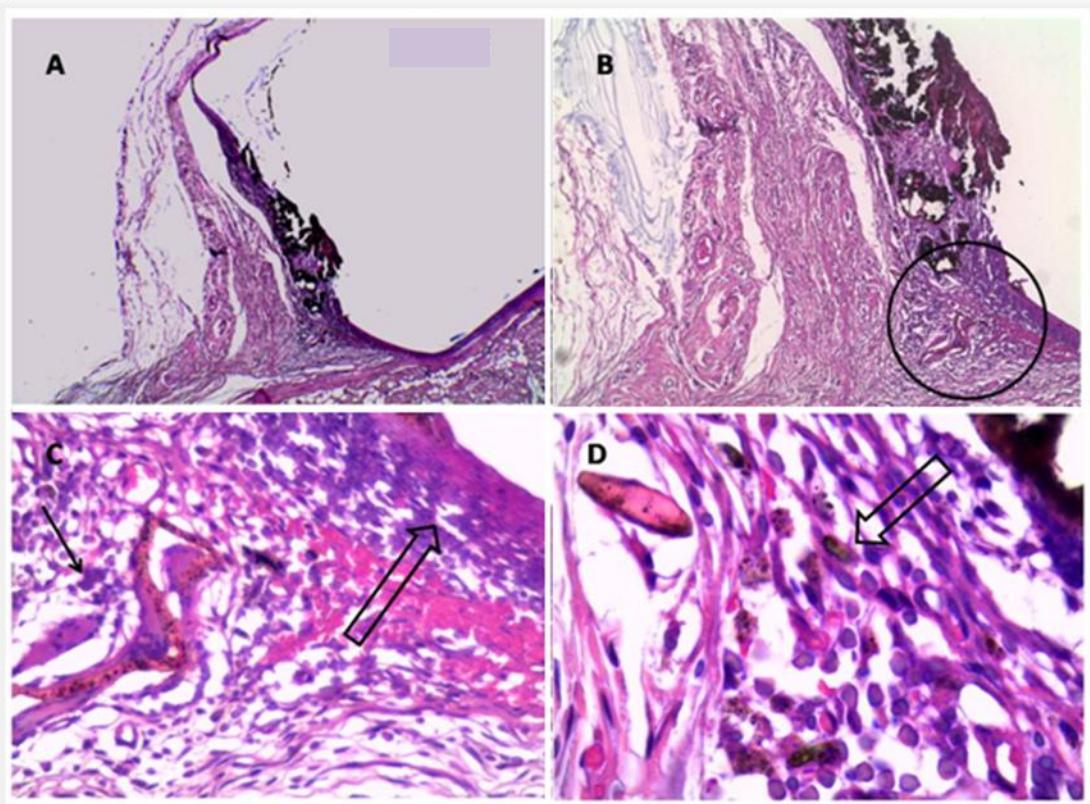


Figura 18. Sealer 26® – 21 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Aumento da região em contato com o cimento 10X. **C.** Aumento da região circulada em B evidenciando capsula fibrosa com pequena condensação (Seta vazada) e células gigantes de corpo estranho envolvendo o material (seta) 40X. **D.** Maior aumento mostrando a presença de macrófagos 100X (Seta vazada).

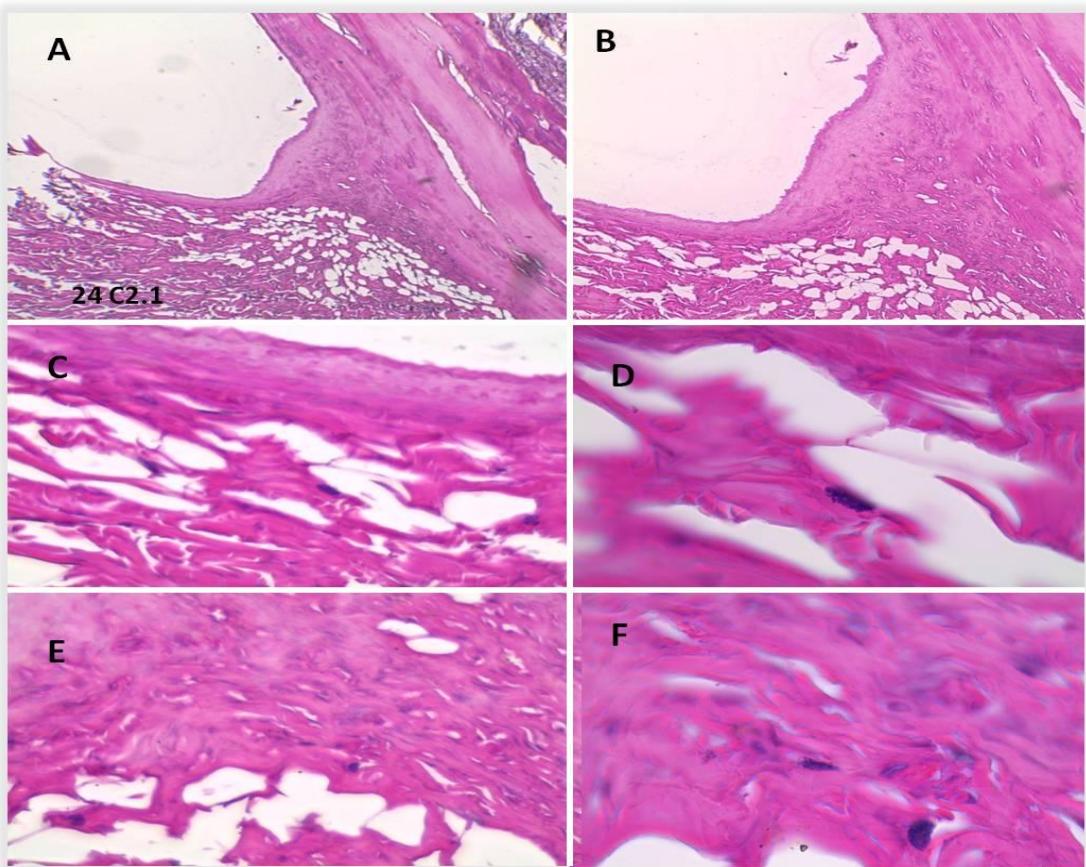


Figura 19. Epiphany® – 21 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Maior aumento da região em contato com o cimento 10X. **C e E.** Maior aumento visualizando a cápsula fibrosa formada e presença de mastócitos 40X. **D e F.** Maior aumento dos mastócitos visualizados em C e E 100X.

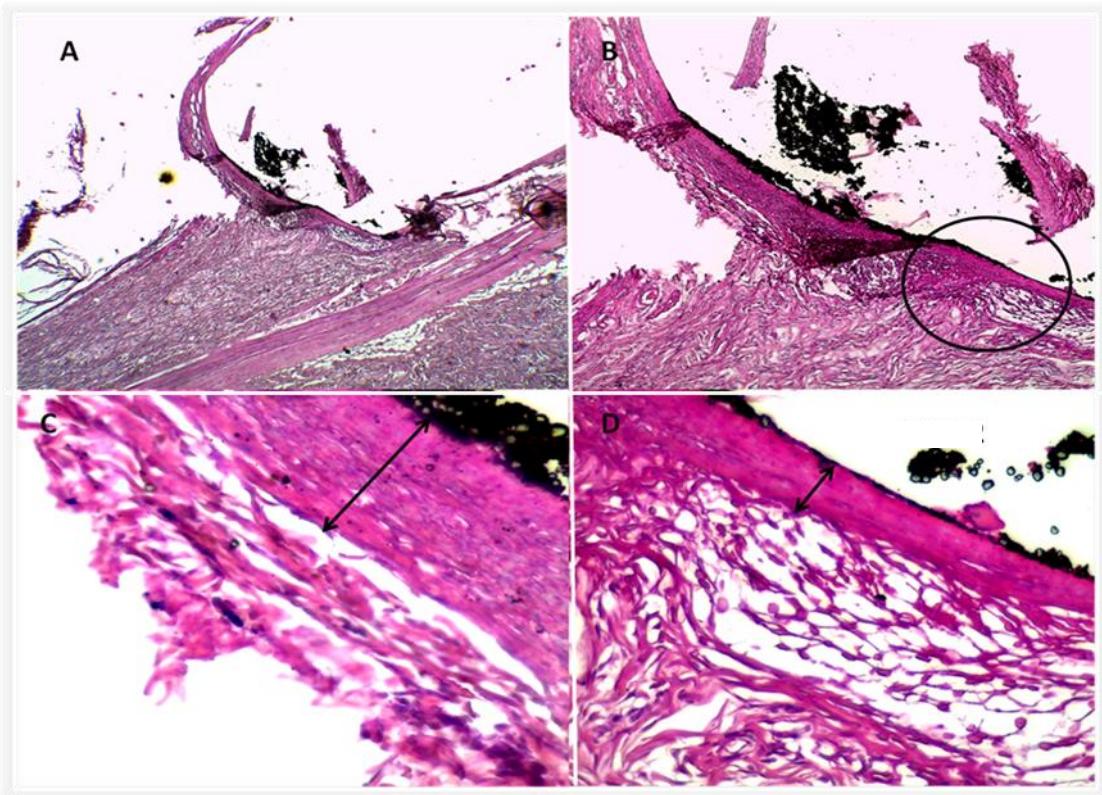


Figura 20. AH Plus® – 21 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Maior aumento da região em contato com o cimento 10X. **C.** Formação cápsula espessa. Observar maior quantidade de cimento 40X. **D.** Formação da cápsula delgada– Observar menor contato com o cimento 40X.

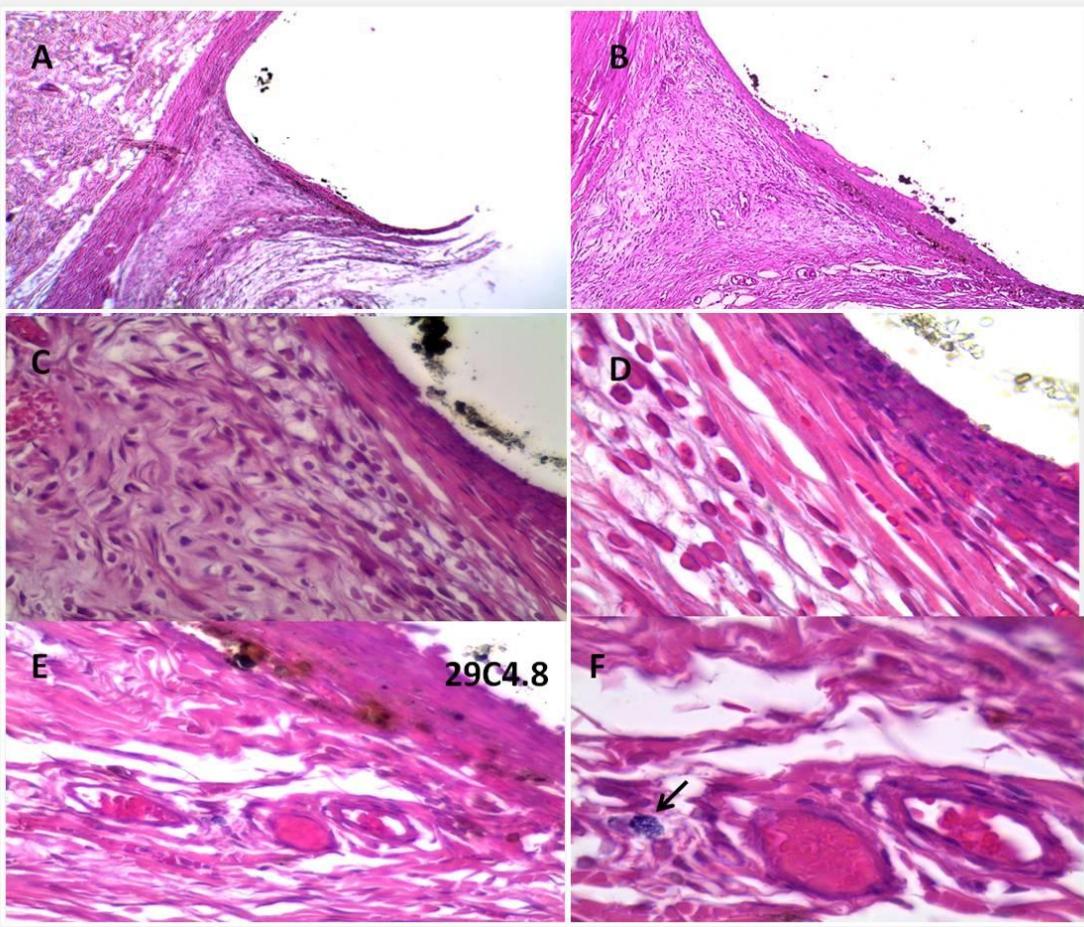


Figura 21. Endofill – 21 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Maior aumento da região em contato com o cimento 10X. **C.** Infiltrado inflamatório e cápsula constituída por muitas células 40X. **D.** Vista aproximada de células do infiltrado (Macrofágos) e da cápsula com presença de vasos sanguíneos 100X. **E.** Presença de vasos congestos e mastócito 40X. **F.** Maior aumento do mastócito 100X.

5.2.4. 42 Dias

Aos 42 dias, o conjuntivo subcutâneo apresentou resposta semelhante ao anterior nos cimentos Sealer 26®, Epiphany® e AH Plus®. Notou-se a formação de tecido conjuntivo denso (cápsula fibrosa) envolvendo o material residual presente e reação inflamatória ausente, apresentando-se em certas regiões de forma discreta, com presença de poucas células inflamatórias

e vasos congestos em regiões de maior contato com o cimento (Figuras 22, 23 e 24). Já com o cimento Endofill, verificou-se ainda a presença de infiltrado linfoplasmocitário e presença de macrófagos, desorganização tecidual e, em alguns casos avaliados, reação inflamatória variando de moderada a intensa (Figura 25).

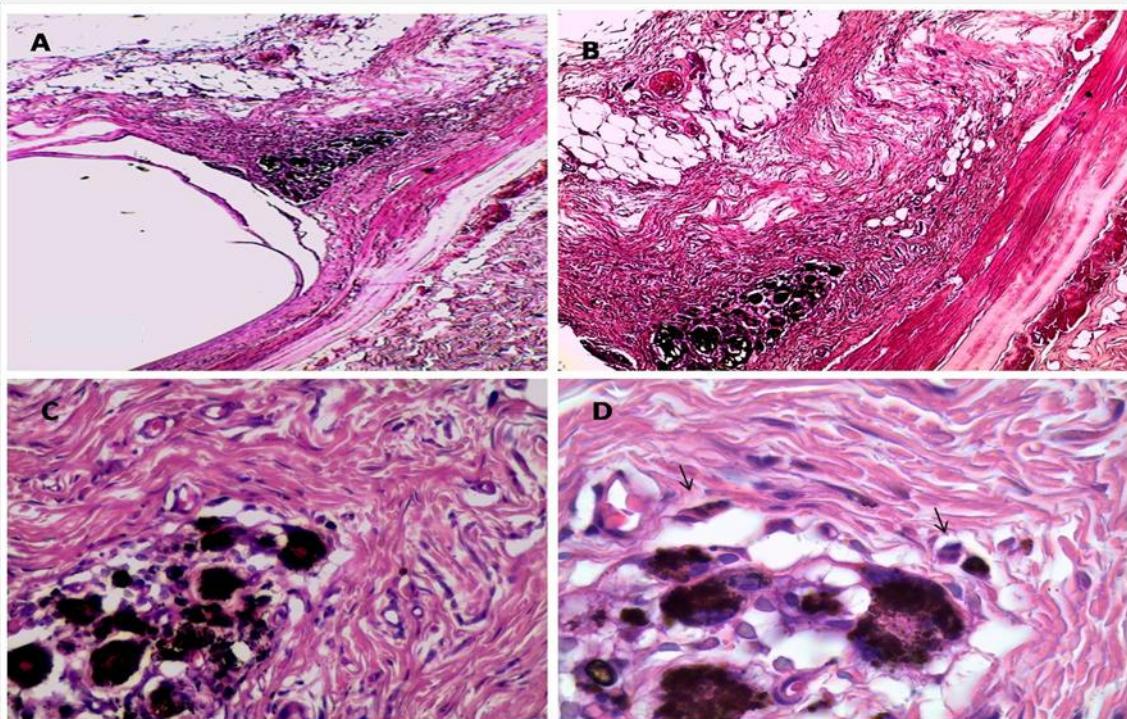


Figura 22. Sealer 26® – 42 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Vista ampliada da região em contato com o cimento 10X. **C.** Presença de cápsula fibrosa envolvendo o cimento 40X. **D.** Notar células inflamatórias apenas focais relacionadas à presença do cimento 100X.

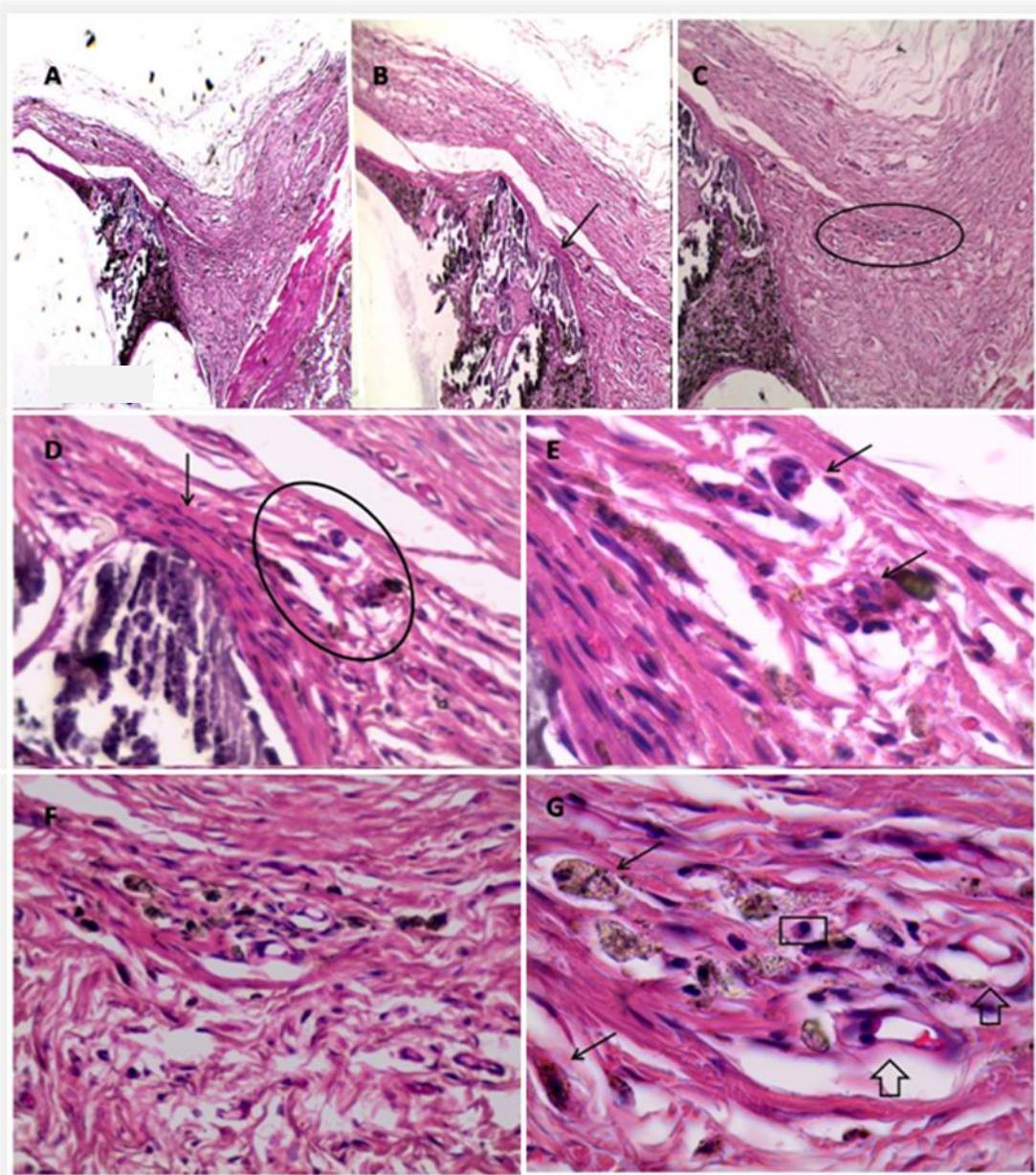


Figura 23. Epiphany® – 42 dias. **A.** Vista Panorâmica 4X. **B.** Maior aumento da região em contato com o cimento 10X. **C.** Maior aumento da região distante do cimento 10X. **D.** Região marcada em B, n presença de cápsula fibrosa pouco condensada e presença de macrófagos e células gigantes 40X. **E.** Maior aumento das células. **F.** Maior aumento da região marcada em C. Presença de macrófagos, vasos sanguíneos e células inflamatórias 40X. **G.** Maior aumento de macrófagos (setas), vasos sanguíneos (setas vazadas) e células inflamatórias (quadrado).

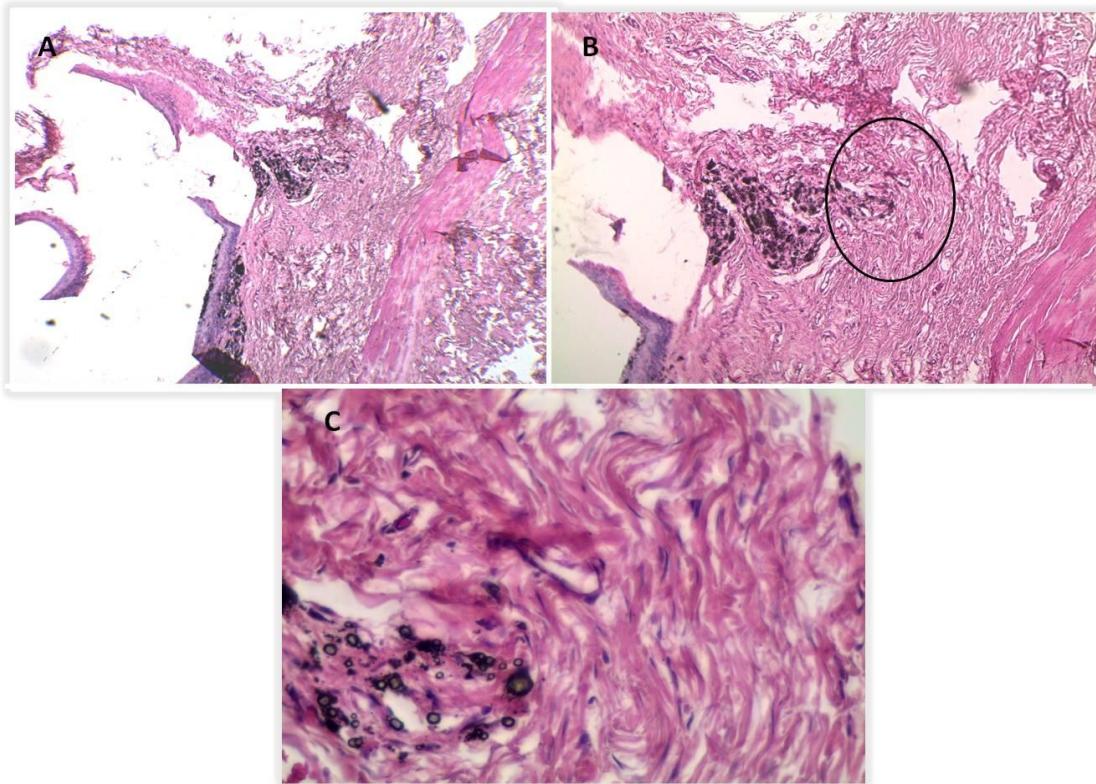


Figura 23. AH Plus® – 42 dias. **A.** Vista Panorâmica 4X. **B.** Maior aumento da região em contato com o cimento 10X. **C.** Maior da região marcada em B. Notar ausência de inflamação e organização da cápsula fibrosa envolvendo o cimento 40X.

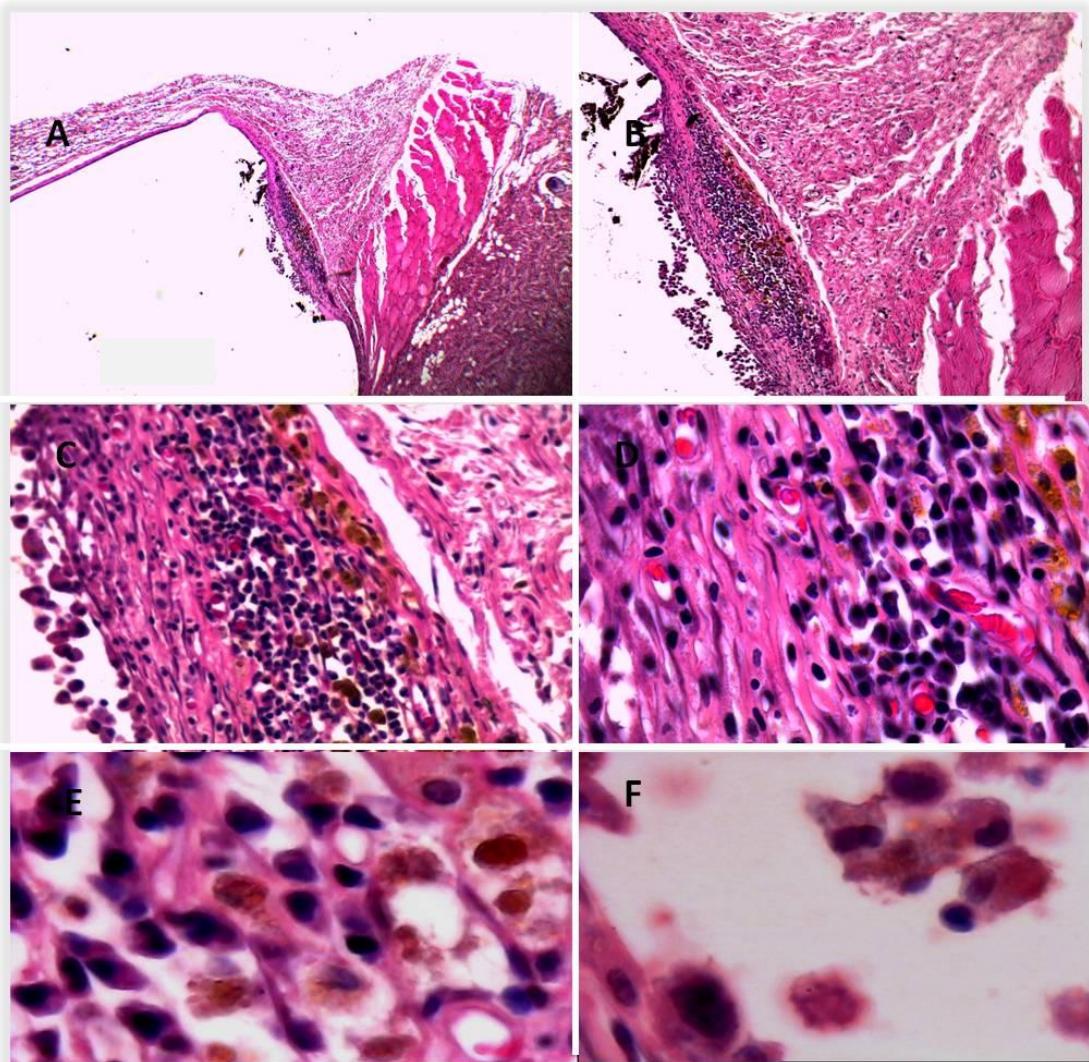


Figura 25. Endofill - 42 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Maior aumento da região em contato com o cimento 10X. **C.** Ampliação do infiltrado linfoplasmocitário 40X. **D.** Células do infiltrado com presença de vasos sanguíneos 40X. **E.** Presença de macrófagos 100X. **F.** Ampliação dos macrófagos 100X.

5.2.5. 60 Dias

Aos 60 dias, nos cimentos Sealer 26, Epiphany e AH Plus observou-se presença de cápsula fibrosa isolando o cimento residual do tecido conjuntivo adjacente. Neste período, notou-se a presença constante de mastócitos (Figuras 26, 27 e 28). A inflamação observada foi discreta e focal,

associada à região onde havia maior quantidade de cimento residual. No caso do cimento Endofill, observou-se reação inflamatória ainda presente, com a cápsula fibrosa formada por muitas células e vasos sanguíneos, e pouca quantidade de colágeno. (Figura 28).

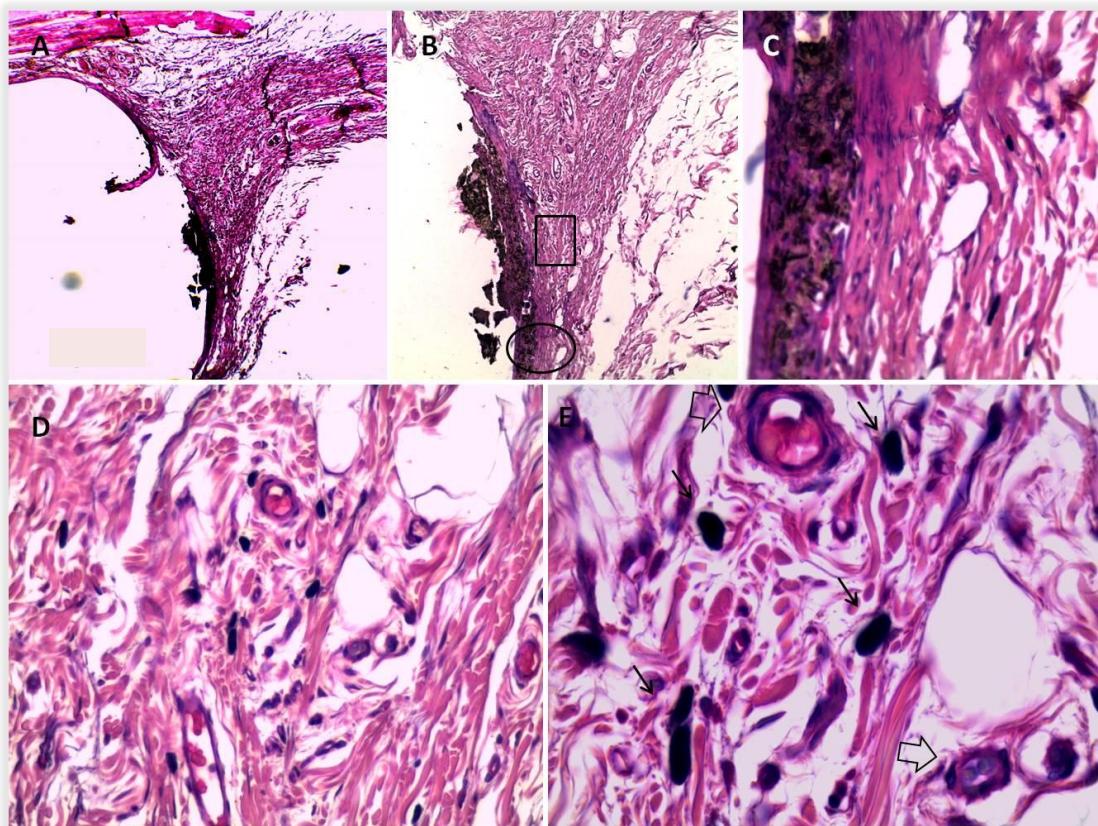


Figura 26. Sealer 26® – 60 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Maior aumento da região em contato com o cimento 10X. **C.** Maior aumento região marcada com quadrado em B. Presença de cápsula fibrosa 40X. **D.** Maior aumento da região circulada em B. Presença de vasos sanguíneos e mastócitos 40X. **E.** Maior aumento de vasos sanguíneos (Setas vazadas) e mastócitos (Setas) 100X.

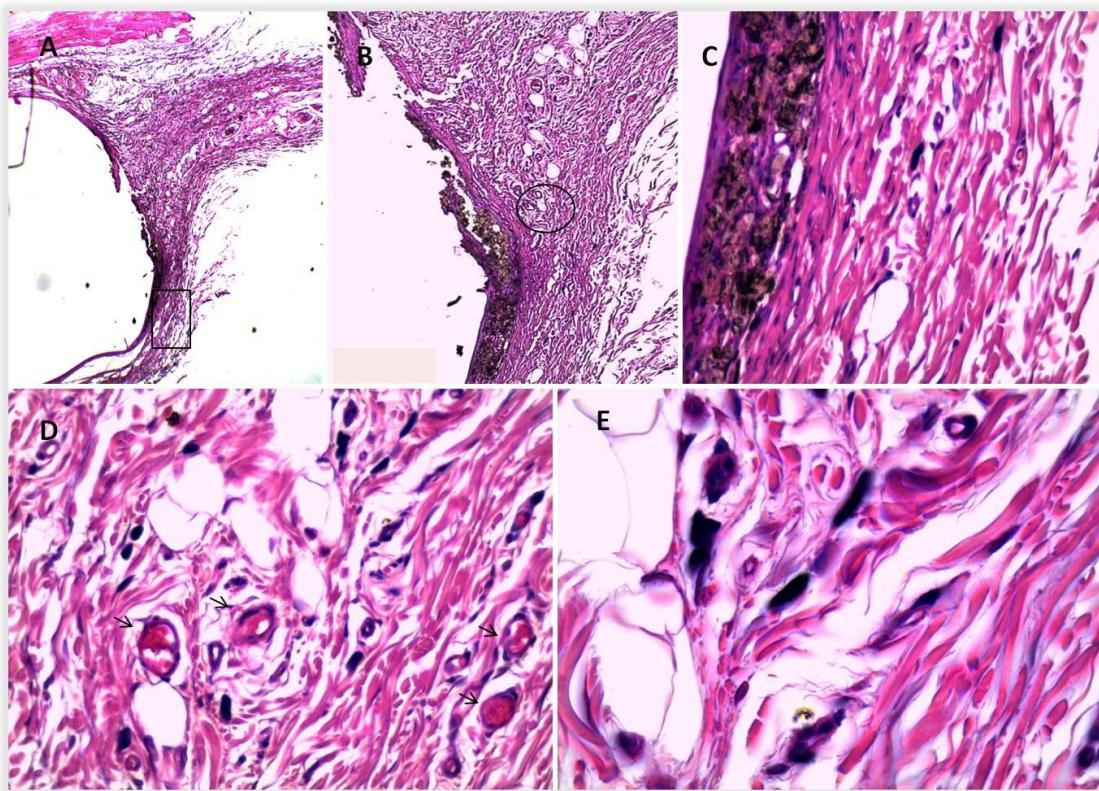


Figura 27. Epiphany® – 60 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Maior aumento da região em contato com o cimento 10X. **C.** Vista ampliada da região marcada em A. Presença de cápsula envolvendo o cimento 40X. **D.** Vista ampliada da região marcada em B. Presença de vasos sanguíneos (Setas) e mastócitos 40X. **E.** Maior aumento de mastócitos 100X.

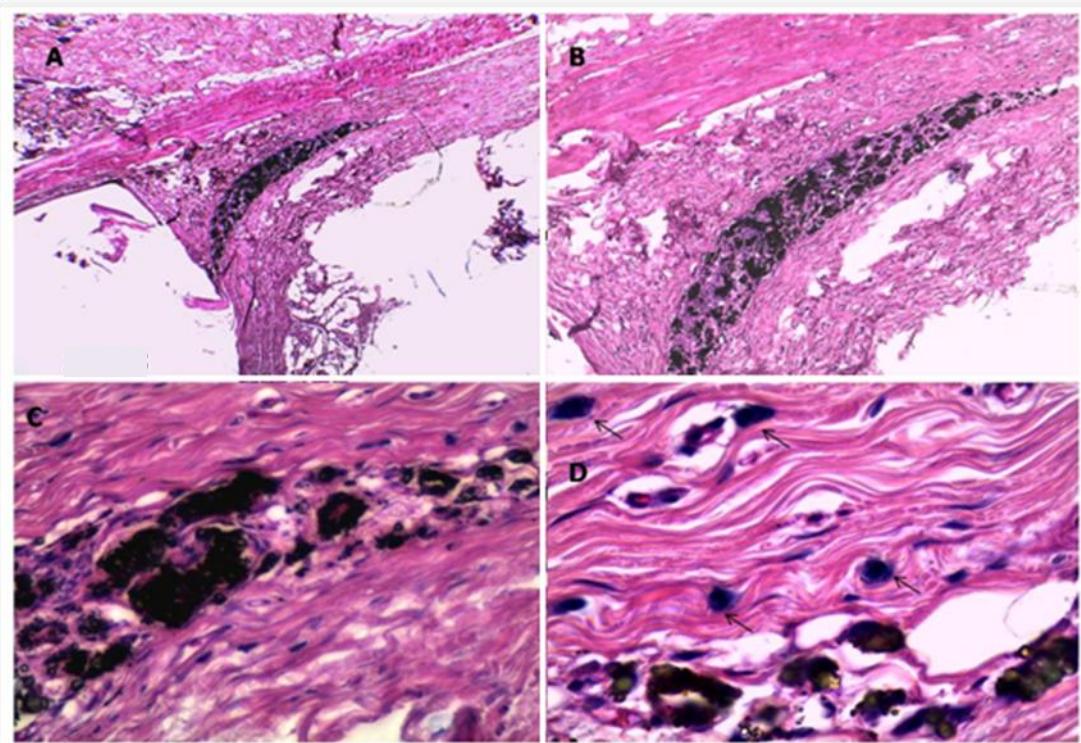


Figura 28. AH Plus® – 60 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Maior aumento da região em contato com o cimento 10X. **C.** Notar cápsula fibrosa envolvendo tecido 40X. **D.** Maior aumento evidenciando presença de mastócitos 100X.

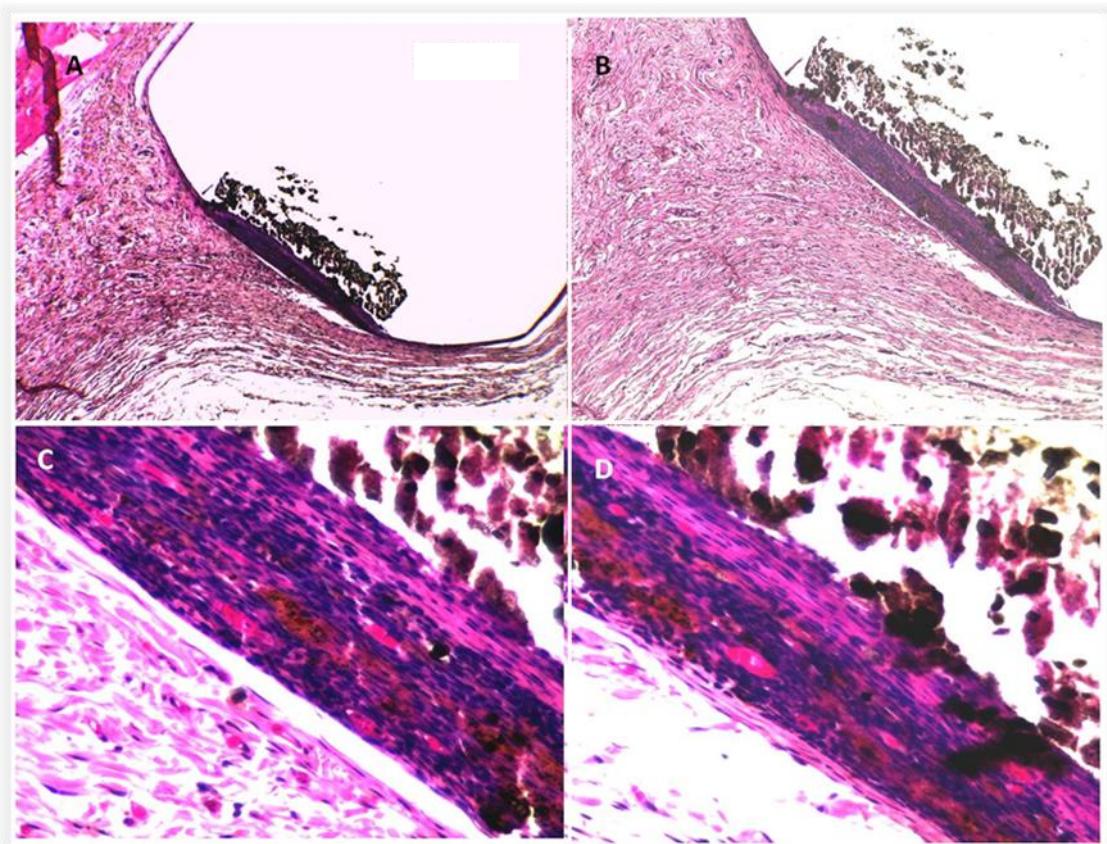


Figura 29. Endofill – 60 dias. **A.** Vista panorâmica 4X. **B.** Maior aumento da região em contato com o cimento 10X. **C e D.** Maior aumento da cápsula. Notar a pouca condensação fibrosa e quantidade de células. Presença de vasos sanguíneos 40X.

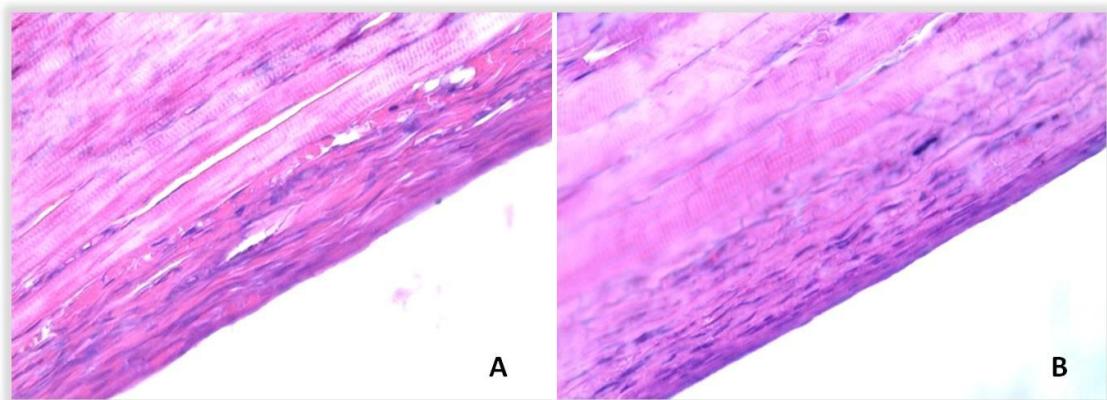


Figura 30. Imagens representativas em HE mostrando ausência de inflamação nas paredes laterais do tubo de polietileno. **A.** Cimento Sealer 26®. **B.** Cimento Epiphany® (40 x).

5.3. Análise quantitativa

5.3.1. Avaliação quantitativa da intensidade da reação inflamatória.

Em sete dias, o tecido conjuntivo subcutâneo de todos os animais apresentou características correspondentes a reação inflamatória severa (Quadro 1,2,3 e 4), não sendo observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p>0.05$). Aos 14 e 21 dias os cimentos Epiphany® e AH Plus® mostraram diferenças estatísticas significantes quanto à intensidade da reação apresentada quando comparados ao cimento Endofill ($p=0.0005$, $p=0.0003$, respectivamente). O cimento endofill manteve-se o mais agressivo aos 42 ($p=0.0203$) e 60 dias ($p=0.0072$) comparado ao cimento Epiphany®.

Quadro 1. Relação dos implantes subcutâneos e a intensidade das respostas inflamatórias observadas para o Sealer 26®, em função do período experimental

Material		Sealer 26®																				
Dias		07							14							21						
Implantes		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Inflamação	Ausente																					
	Leve																		X	X	X	X
	Moderada								X	X	X	X	X	X	X							
	Severa	X	X	X	X	X	X	X														

Material		Sealer 26®													
Dias		42							60						
Implantes		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Inflamação	Ausente			X		X	X		X	X	X		X		X
	Leve	X	X		X			X				X			X
	Moderada														
	Severa														

Quadro 2. Relação dos implantes subcutâneos e a intensidade das respostas inflamatórias observadas para Epiphany®, em função do período experimental

Material	Epiphany®																				
Dias	07							14							21						
Implantes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Inflamação	Ausente														x			x	x	x	x
	Leve							x	x		x	x			x	x					
	Moderada									x											
	Severa	x	x	x	x	x	x														

Material	Epiphany®													
Dias	42							60						
Implantes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Inflamação	Ausente	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	Leve													
	Moderada													
	Severa													

Quadro 3. Relação dos implantes subcutâneos e a intensidade das respostas inflamatórias observadas para AH Plus®, em função do período experimental

Material	AH Plus®																				
Dias	07							14							21						
Implantes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Inflamação	Ausente													x			x			x	x
	Leve							x	x		x	x			x	x		x	x	x	x
	Moderada									x											
	Severa	x	x	x	x	x	x	x	x												

Material	AH Plus®													
Dias	42							60						
Implantes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Inflamação	Ausente	x			x		x	x	x	x		x	x	x
	Leve		x	x		x			x	x				
	Moderada													
	Severa													

Quadro 4. Relação dos implantes subcutâneos e a intensidade das respostas inflamatórias observadas para Endofill, em função do período experimental

Material	Endofill																				
Dias	07							14							21						
Implantes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Inflamação	Ausente																				
	Leve																				x
	Moderada							x	x		x			x	x	x	x	x	x		
	Severa	x	x	x	x	x	x	x	x		x		x	x			x	x		x	x

Material	Endofill													
Dias	42							60						
Implantes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Inflamação	Ausente						x							x
	Leve		x	x		x		x		x			x	
	Moderada	x			x		x		x		x	x		
	Severa													

5.3.2. Avaliação quantitativa da porcentagem de fibras colágenas na cápsula fibrosa.

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nas porcentagens de fibras colágenas na cápsula fibrosa presente na interface cimento/tecido conjuntivo, nos diferentes grupos avaliados, independente do tempo de análise ($p>0.05$). Os valores de p observados nos períodos de 7, 14, 21, 42 e 60 dias encontram-se figura 32.

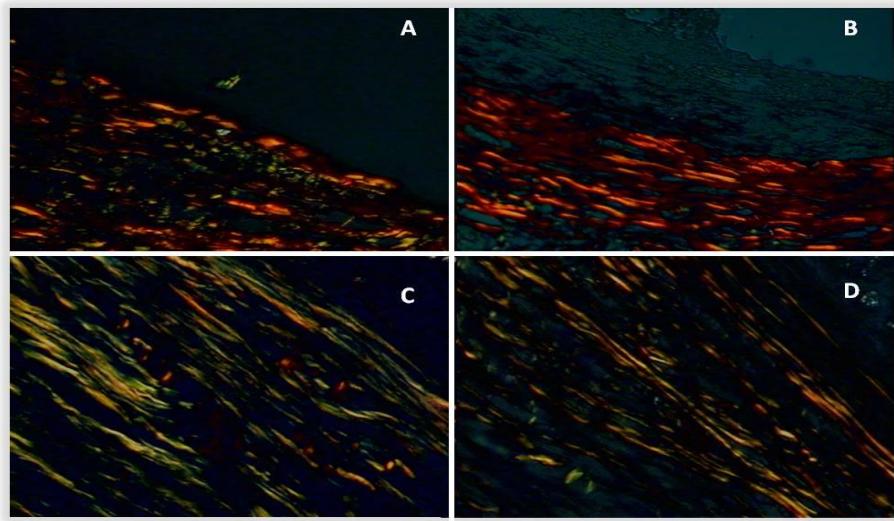


Figura 31. Imagens representativas da organização da cápsula fibrosa corada em Picrosírus. **A.** Cimento Epiphany®, 7 dias (20X). **B.** Endofill, 7 dias (20X). **C.** Sealer®, 14 dias (20X). **D.** Endofill, 14 dias. (20X).

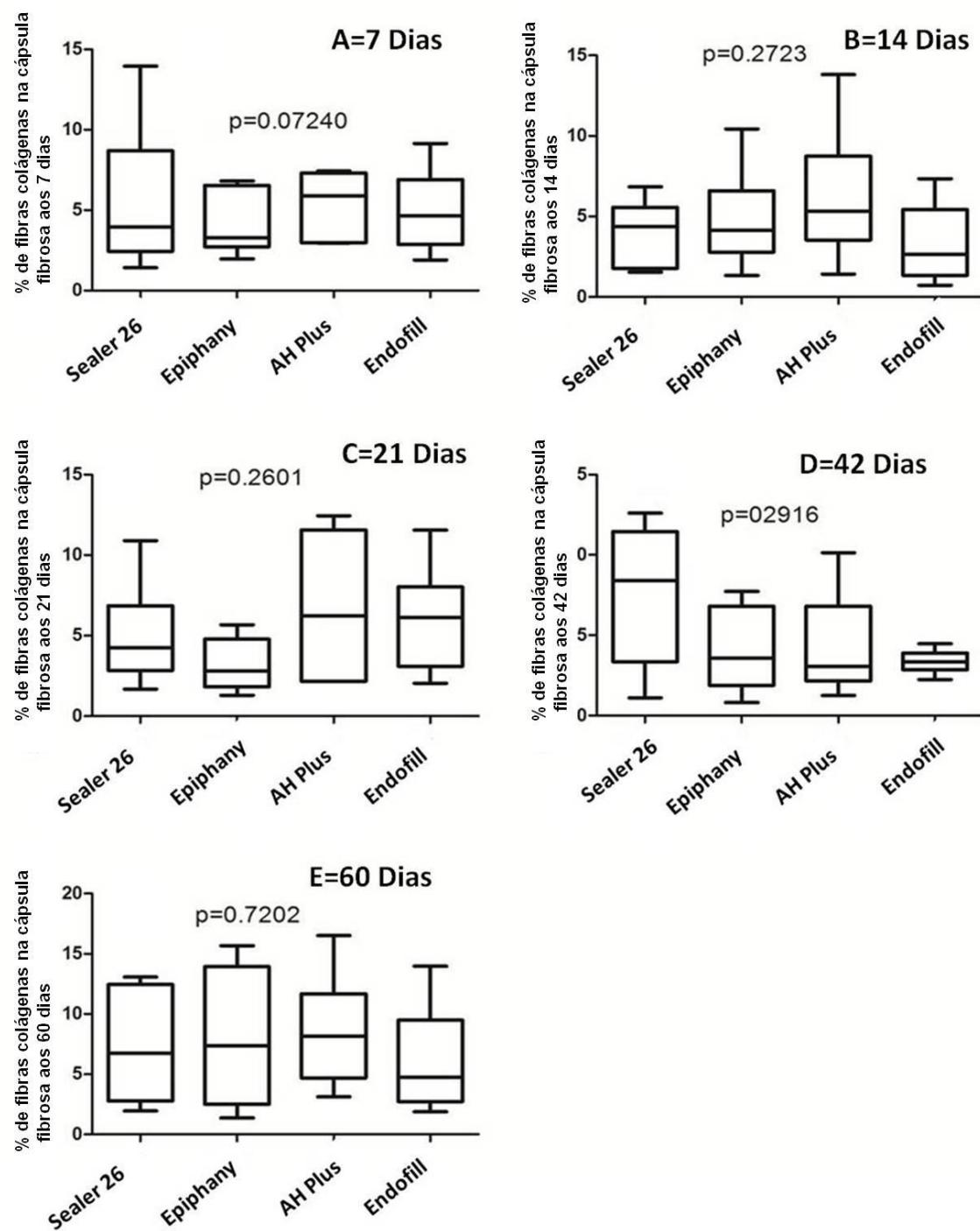


Figura 32. Análise estatística das porcentagens de cápsula fibrosa presente na interface luz do tubo/tecido conjuntivo, nos diferentes grupos de cimentos endodônticos avaliados, observados nos períodos de 7 (A), 14 (B), 21 (C), 42(D) e 60(E) dias.

Discussão

6- Discussão

A necessidade de se conhecer melhor a composição química dos cimentos, bem como suas propriedades físico-químicas e biológicas, para uma correta indicação clínica induz, cada vez mais, ao questionamento desse assunto. Inúmeras pesquisas são realizadas com os vários materiais disponíveis, porém, poucas comparativas considerando os quatro cimentos, com as diferentes composições químicas, utilizados nesta pesquisa.

Vários testes podem ser realizados para se verificar a compatibilidade biológica de um material. Atualmente, existem três etapas recomendadas para essa avaliação: os testes iniciais ou primários que fornecem um perfil geral de toxicidade do material e são realizados *in vitro*, os testes secundários que avaliam a toxicidade local, são realizados *in vivo* e os materiais entram em contato direto com os tecidos e, por fim, a indicação do teste ou testes comprobatórios, dependendo da utilização do material na terapia endodôntica. Os métodos para implantação em tecido subcutâneo de animais são amplamente utilizados para avaliar a resposta biológica macro e microscópica do tecido ao material implantado, sendo considerados testes secundários. A escolha por esse método se deve ao fato que esse processo de determinação de biocompatibilidade permite averiguar o comportamento dos materiais em contato com tecidos semelhantes aos envolvidos na terapia endodôntica, tornando possível dentro de certos limites, a projeção dos possíveis efeitos dos cimentos nos tecidos da região apical e periapical. (Costa *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2003; Ozbas *et al.*, 2003; Zmener *et al.*, 2004; Sousa *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2007; Zafalon *et al.* 2007).

O rato de laboratório *Rattus norvegicus albinos, wistar* foi o animal experimental utilizado neste estudo, sendo segundo Hedrich *et al.* (2000), o espécime que melhor representa o funcionamento do sistema mamífero. Ele oferece um modelo único, com vantagens para se simular as doenças humanas, assim, possibilitando o desenvolvimento de novos agentes

terapêuticos, como também o estudo das respostas aos agentes do meio ambiente.

A reprodução do rato em laboratório permite a eliminação de fatores individuais, como deficiência imune, ou estarem afetados com alguma doença, além de facilitar a obtenção do número maior de amostras. Para o presente estudo foram selecionados ratos machos devido às variações no ciclo hormonal das fêmeas e, padronizados quanto à saúde, idade e peso corporal.

Experimentos com ratos também apresentam a vantagem de constituírem uma técnica bem controlada, padronizada, com pequeno número de variáveis, permitindo a obtenção de resultados em curto espaço tempo. Oferece ainda: 1) uso de limitada área para a manutenção dos animais; 2) facilidade de limpeza e higienização da área reservada à manutenção dos animais no pós-operatório; 3) metodologia de execução relativamente simples, possibilitando o trabalho em vários animais em curto período de tempo; 4) esta metodologia não envolve tecido calcificado, não havendo necessidade de descalcificação dos espécimes, o que acelera o processamento laboratorial; 5) ela oferece a possibilidade de comparar a resposta tecidual no mesmo animal, para diversos materiais experimentais implantados, inclusive como controle; e 6) o custo para o seu desenvolvimento é relativamente baixo (Costa *et al.*, 2001).

O implante de pastas e cimentos em tecidos moles necessita, na maior parte das vezes, de veículos especiais que permitam um controle de sua forma e tamanho. Foram utilizados tubos de polietileno, que não causam irritação aos tecidos circunjacentes, sendo a reação na abertura do tubo relacionada apenas à toxicidade do material. Além disso, eles imitam as condições do canal radicular (o contato da abertura apical com o tecido conjuntivo periapical) (Ozbas *et al.*, 2003), permitem a utilização de materiais recém manipulados (Kolokuris *et al.*, 1996) e, o controle da quantidade de material que ficará em contato com os tecidos. Segundo Batista *et al.* (2007), a intensidade da resposta inflamatória está na dependência do tipo do material, do período de tempo pós-implante e da quantidade de material, sendo maior a intensidade onde houver mais material.

De acordo com as normas da FDI, deve-se utilizar quatro implantes por animal, diminuindo as variáveis do método, sendo que um dos tubos deve servir como controle. Seguindo essas recomendações, realizamos como Gordyusus *et al.*, (1998); Onay *et al.*, (2007); quatro implantes por animal, porém não deixamos um dos tubos vazios. Utilizamos a porção lateral do tubo, (Costa *et al.*, 2001; Zafalon *et al.*, 2007) que não entrou em contato com o material analisado como controle, o que possibilitou também avaliar a severidade do trauma cirúrgico (Olsson *et al.*, 1981).

Embora não haja uma padronização na literatura, torna-se importante considerar o diâmetro interno do tubo utilizado. Optamos pelo diâmetro interno de 0,6mm, por presumir que quanto menor o diâmetro, menor a chance de extravasamento de material para o tecido. Apesar de alguns autores (Valera *et al.*, 2004; de Campos Pinto *et al.*, 2008) preconizarem o fechamento de uma das extremidades, optamos por não realizar tal procedimento, preenchendo todo o tubo, deixando uma delas sobre retração inicial e complementando a outra para que não houvessem espaços vazios. Observamos que apesar das duas extremidades estarem abertas, não houve interferência na avaliação histológica, e recomendamos tal modificação metodológica, pois esse método diminui a necessidade de manipulação demasiada dos corpos de prova e, consequentemente, as chances de contaminação.

A movimentação dos tubos foi outro fator a ser considerado, porém quando se observa a formação de uma cápsula fibrosa ao redor de sua parede lateral pode-se deduzir que houve limitação do movimento, possibilitando o reparo regular. Para maior controle da posição dos implantes foi realizada apenas uma divulsão do tamanho necessário para a implantação.

Outro fator importante foi a escolha do uso de cianocrilato de etila (Super Bonder, Loctite, Itapevi, SP, Brasil) para fechamento das lojas cirúrgicas no dorso dos animais. A realização de suturas, mesmo por equipes experientes, tensiona a pele do rato, podendo interferir nos resultados. O cianocrilato de etila é um material que possui comprovada segurança para ser utilizado em substituição às suturas para fechamento de feridas cirúrgicas

(Bocca *et al.*, 1999; Borba *et al.*, 2000), além de estudos comprovarem sua biocompatibilidade tanto *in vivo* (Bhaskar *et al.*, 1972; Yoshimine *et al.*, 2007), quanto *in vitro* (de Azevedo *et al.*, 2003). Além disso, esse material possui características hemostáticas e antinflamatórias, bem como uma alta capacidade de adesão em ambientes úmidos (Naves, 1999).

Apesar da inclusão realizada com glicolmetacrilato (GMA), permitir melhor definição, resultando na clara distinção de células inflamatórias crônicas e agudas (Gomes-Filho *et al.* 2001) quando comparado com o método de inclusão em parafina, optamos pela utilização desta visto que, os cortes também foram utilizados para coloração em picro sírius, uma vez que a inclusão em GMA permite um limitado número de colorações.

A remoção dos tubos foi realizada somente após a inclusão da peça (Olsson *et al.*, 1981), para não ocorrer a remoção da interface tecidual adjacente ao implante, o que prejudicaria a posterior avaliação deste local considerado de maior importância. Os cortes foram feitos de modo semi-seriados, ao longo eixo do tubo como recomendado pela ADA (1972).

A literatura apresenta uma grande variedade de tempos experimentais, que se baseiam tanto nos critérios definidos pela ISO 10993-6 (1994) e ADA (1972, 1982), como pelos objetivos pretendidos. Quando se pretende avaliar a intensidade dos efeitos relacionados à inflamação aguda, devem ser programados períodos curtos (24-48h). Nas primeiras horas após a agressão, o processo inflamatório é caracterizado pela atuação do sistema complemento, com formação de compostos vasoativos, reconhecimento e fagocitose por macrófagos residentes e liberação de mediadores químicos que levam a alterações vasculares e a migração de células inflamatórias para o local da injúria (especialmente neutrófilos). (Siqueira Jr., 2003 a; Siqueira Jr., 2003 b; Consolaro, 2009).

Apesar de reconhecer a importância de reações teciduais imediatas à presença dos cimentos endodônticos, optamos por não avaliar períodos curtos, visto que análise das características da reação inflamatória poderia ser mascarada pelo efeito do trauma cirúrgico (Xavier *et al.*, 1974).

A ISO 10993-6 (1994) sugere que o período inicial para avaliação histológica seja de, no mínimo, sete dias após o procedimento operatório. Segundo recomendações da ADA (1972, 1982), os períodos podem variar de 7-10, 21-35, 60-80. Porém, não há um consenso na literatura quanto aos tempos utilizados em estudos de biocompatibilidade de materiais em tecidos subcutâneos. Encontra-se avaliações das reações inflamatórias, após períodos de 10, 30, 90 e 120 dias (Zmener *et al.*, 2004); 7 e 30 dias (Holland *et al.*, 2002; Gomes-Filho *et al.*, 2008); 3, 7 e 21 dias (Shahi *et al.*, 2006); 7, 30 e 60 dias (Gomes-Filho *et al.*, 2007; Scarparo *et al.*, 2009); 5, 15, 60 e 120 dias (Kolokouris *et al.*, 1998); 28 e 84 dias (Sousa *et al.*, 2006); 7, 15, 30 e 60 dias (Bodrumlu *et al.*, 2008); 7, 21 e 42 dias (de Campos-Pinto *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2010). Para o presente estudo, optamos pelos períodos de 7, 14, 21, 42 e 60 dias pela possibilidade de acompanhar a evolução da reação inflamatória.

É provável que as diferenças encontradas nos estudos relacionados à biocompatibilidade de cimentos endodônticos estejam relacionadas aos critérios de análises utilizados pelos autores. Em dados revisados na literatura, nota-se a busca por avaliar os graus de reação inflamatória através de fatores como componentes celulares do infiltrado inflamatório, características da cápsula fibrosa, presença ou ausência de abscessos e necroses teciduais. Porém, mesmo havendo sugestões quanto a critérios por normatização da ANSI/ADA (1979) e FDI (1980), percebe-se a falta de padronização nesta metodologia de avaliação. Os critérios utilizados para avaliação histológica desse trabalho basearam-se nas normas da FDI (1980), segundo a qual as reações são consideradas ausentes, leves, moderadas e severas, utilizando-se para tal, de características como proporção de determinados tipos celulares como neutrófilos e macrófagos, e integridade ou necrose da matriz extracelular.

As análises histológicas podem ser feitas por métodos qualitativos ou quantitativos. No presente estudo, optamos pelos dois métodos de análise, porém consideramos a análise qualitativa essencial para a compreensão dos fenômenos observados, visto que a intensidade da reação varia conforme o campo analisado, sobretudo nas regiões de contato direto cimento/tecido, o que poderia mascarar os resultados encontrados. Estudos como os de

Gördusus *et al.* (1998); Koloukris *et al.* (1998); Zafalon *et al.* (2007); de Campos Pinto *et al.* (2008) aproximam da forma da avaliação sugerida e utilizam a análise descritiva dos eventos observados.

A despeito da análise quantitativa realizada, consideramos as reações teciduais como processos tridimensionais, o que torna impossível realizar avaliações precisas de modo quantitativo, pois devemos considerar que a análise deve ser feita camada por camada em secções finas de cortes bidimensionais, o que permite uma interpretação subjetiva.

A quantificação da resposta tecidual, segundo Olsson *et al.* (1981), somente será possível em materiais que apresentem graus de irritabilidade bem distintos, o que não era esperado neste estudo, apesar dos cimentos avaliados possuírem bases distintas. As análises quantitativas não permitem uma observação de cada e todo evento que caracteriza o processo inflamatório, neste tipo de tecido, e esses eventos são considerados essenciais para avaliação dos materiais. Porém a análise descritiva em si não permite uma comparação exata entre os cimentos ou entre os diferentes períodos experimentais para um mesmo material. Segundo Zmener *et al.* (2005), medidas histológicas e histométricas não podem prever o resultado de uma terapia endodôntica, e funcionam apenas como indicadores da biocompatibilidade do material. Diante do exposto, realizamos os dois métodos de análise, de forma complementar.

Embora os cimentos investigados no presente estudo tenham sido avaliados previamente, esse é o primeiro trabalho realizado *in vivo*, comparando os quatro cimentos escolhidos, recém manipulados (antes do período de presa) em que foi avaliada a intensidade da reação inflamatória e formação da cápsula fibrosa.

Apesar de apresentar desempenho satisfatório quanto algumas características físico-químicas; impermeabilidade, constância de volume, adesão (Leal *et al.*, 1975; Benatti *et al.*, 1978) ; os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol apresentam uma vasta literatura que ressalta o seu alto potencial de irritabilidade às células e aos tecidos vitais.

Vários estudos avaliaram cimentos a base de óxido de zinco e eugenol, utilizando testes primários (Hume, 1984; Hume, 1988; Kolokouris *et al.*, 1998; Guigand *et al.*, 1999), testes secundários (Economides *et al.*, 1995; Gorduysus *et al.*, 1998; Figueiredo *et al.*, 2001; Araújo, 2008; Zmener *et al.*, 2010) e testes de aplicação (Bernáth & Szabó., 2003; Borlina *et al.*, 2010) Nesses, foi determinado seu caráter irritante, o qual exerce influência direta sobre o processo de reparo tecidual após o término do tratamento de canais radiculares. Tal característica, reafirmando resultados encontrados por Scarparo *et al.*, 2009; Schwarze *et al.*, 2002; pode ser evidenciada na resposta tecidual a esse material (Endofill) a qual, em nosso trabalho, apontou para a presença de um infiltrado inflamatório crônico que se manteve presente ao longo de todos os períodos avaliados.

Muitos estudos atribuem a intolerância tecidual ao ZOE à liberação lenta e prolongada do eugenol (Economides *et al.*, 1995; Kolokouris *et al.*, 1998; Figueiredo *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2003). Muitas vezes, seu potencial tóxico pode ser neutralizado por ligações com proteínas plasmáticas, como as meteloproteinases, ou pelo cálcio, frequentemente presente nos cimentos (Orstavick, 1988). As metaloproteinases são importantes no processo inflamatório, porém Santos *et al.*, (2004), demonstrou que elas são inibidas pela presença do óxido de zinco, causa secundária da atividade deletéria desse cimento (Economides *et al.*, 1995).

A presença do eugenol que, pode permanecer em sua forma livre por até 10 anos (Queiroz, 2008. Araújo, 2008) interfere no processo de fagocitose, alterando a capacidade de aderência dos macrófagos ao substrato. Ele neutraliza a função antimicrobiana dos neutrófilos influenciando a reação nos tecidos periapicais (Geurtsen, 2001; Chen *et al.* 2008); em altas concentrações, este componente é bactericida, atuando como inibidor da respiração celular (Hume, 1984); e, em baixas concentrações inibe a quimiotaxia de células leucocitárias, a síntese de prostaglandinas e a possui atividade neurotóxica. (Markowitz *et al.*, 1992). Além disso, esse composto apresenta baixa capacidade de ser fagocitado e eliminado, permanecendo

partículas de óxido de zinco e eugenol nos tecidos periapicais, que leva à persistência do processo inflamatório.

A incorporação do hidróxido de cálcio aos cimentos endodônticos foi sugerida com o objetivo de melhorar as propriedades biológicas dos materiais obturadores, adequando as condições bioquímicas do meio a fim de acelerar o processo de recuperação tecidual e reduzir a resposta inflamatória causada por outros componentes do cimento (de Oliveira *et al.*, 2010). Porém, devemos lembrar que este é um produto de pH elevado (Hauman & Love, 2003a) e que o contato direto com o tecido pode levar à necrose.

De acordo com nossos resultados e, como mostrado em prévios estudos (Leonardo *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 1997), o Sealer 26® provocou uma reação inflamatória inicial severa, com presença de necrose que foi, gradativamente, diminuindo no decorrer dos tempos experimentais. Embora não tenha sido possível identificar com precisão o grau de neutrófilia, no presente estudo, devido à imensa destruição da matriz aos 7 dias, a severidade da inflamação inicial foi ponto comum em todos os animais avaliados. Silva *et al.*, 1997, encontrou resultados desfavoráveis semelhantes, em períodos de 2 a 16 dias. Aos 21 dias, alguns focos de desorganização tecidual ainda persistem em áreas onde o material não foi completamente fagocitado. Com 42 e 60 dias, a inflamação se apresentou praticamente inexistente, com poucas áreas de inflamação suave nos casos onde o contato do cimento foi de certa forma exagerado. Figueiredo *et al.*, (2001) relatou que o Sealer 26® causou inflamações leves quando avaliado por longo período de tempo.

O efeito irritante inicial desse cimento se deve às várias substâncias presentes em sua formulação. Alguns autores (Economides *et al.*, 1995) atribuem essa característica ao formaldeído liberado como produto da decomposição da hexametilenotetramina. Por outro lado, outros como Benatti *et al.* (1982) defendem que a parte mais irritante desse material é a resina éter de bisfenol- A- diglicidil.

A análise qualitativa e quantitativa demonstrou similaridade entre o comportamento dos cimentos AH Plus® e Sealer 26®, com uma reação tecidual inflamatória inicial variando de moderada a severa, decrescente ao

longo do experimento. Este fato concorda com pesquisas anteriores que demonstram que o AH Plus® causa um efeito citotóxico inicial *in vitro* somente durante o período inicial pós-implante. (Schwarze *et al.*, 2002). Efeitos como citotoxicidade, genotoxicidade ou mutagenicidade não foram relatados em períodos de análises longos. Embora o período de toxicidade do AH Plus® seja considerado curto, seu comportamento biológico desfavorável é atribuído às pequenas quantidades de formaldeído liberadas, que levam à indução de respostas não-neoplasmáticas tais como degeneração epitelial e agrupamento de células do infiltrado inflamatório, além de reações alérgicas e necrose do tecido conjuntivo (Kaplan *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2006) e as aminas adicionadas à sua composição para acelerar o processo de polimerização (Sousa *et al.*, 2006; Merdad *et al.*, 2007).

Agentes adesivos e cimentos resinosos foram desenvolvidos para a utilização endodôntica como possibilidade de melhorar os materiais obturadores. O sistema Epiphany®/Resilon® (Pentron clinical Technologies, LLC, Wallingford, CT, EUA) utiliza cones de resinas de poliéster associados ao cimento à base de metacrilato com polimerização dual e um adesivo dentinário. Alguns autores atribuem, ao cimento Epiphany®, características como: hidrofilia, maior penetração nos túbulos dentinários (Zmener *et al.*, 2008) e melhor adesividade tanto à dentina radicular, através do uso de primers auto-condicionantes, quanto aos materiais obturadores (Shipper *et al.*, 2004).

Este material pode promover uma hibridização com o substrato da dentina e o adesivo químico com o Resilon®, promovendo resistência à infiltração bacteriana (Shipper *et al.*, 2004, 2005) e à fratura (Teixeira *et al.*, 2004).

Recentemente, alguns autores observaram, em estudo *in vivo*, que o cimento Epiphany® está associado com uma menor prevalência de periodontite apical (Shipper *et al.*, 2005). Esse fato se deve provavelmente à sua maior resistência à infiltração citada anteriormente e ao seu alto índice de liberação de cálcio (Shipper *et al.*, 2004; Versiani *et al.*, 2006). Os íons cálcios liberados tem mostrado favorecer o meio tornando-o mais alcalino, conduzindo a efeitos bioquímicos que culminam na aceleração do processo de reparo (Sousa *et al.*,

2006). Seu efeito citotóxico inicial, de acordo com Merdad *et al.*(2007), poderia estar relacionado aos monômeros constituintes do agente de união dentinária, BIS-GMA e uretano dimetacrilato (UDMA), sendo agravado pelo componente trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA).

Outro aspecto na avaliação da resposta biológica por diversas vezes negligenciado é a formação da cápsula fibrosa. A presença dessa cápsula permite identificar se há limitação do processo já que sua formação restringe a presença do infiltrado inflamatório às áreas em contato próximo com o material. Segundo Valera *et al.* (2004), o fenômeno reparativo, caracterizado pela formação capsular, ocorre paralelo e independente da reação inflamatória causada pelos cimentos. De acordo com Perassi (2004), sua formação também representa uma resposta do tecido imune que torna corpos estranhos inofensivos ao organismo. Autores como Scarparo *et al.* (2009), que utilizam critérios que contemplam a observação da presença e das características de espessura da condensação fibrosa e sua relação com o infiltrado inflamatório consideram sua formação como um critério de aceitabilidade do material. Por outro lado, Podshadley e Harrison (1966) e Alle & Marchesano (1998) afirmam que a espessura da cápsula fibrosa é diretamente proporcional à intensidade da resposta tecidual e, Wolfaardt *et al.* (1992) defendem que sua formação ao redor do material é inaceitável em testes subcutâneos.

O fibrosamento ocorre de forma irregular e pode variar em densidade e organização dependendo do período experimental avaliado, quantidade e base do cimento em contato com o tecido. Baseando-se nessas variáveis, podemos observar tanto em HE quanto na coloração picro Sirius, que ao longo dos períodos experimentais houve um aumento progressivo da espessura do tecido conjuntivo denso, limitando a área de reação inflamatória às zonas mais próximas dos cimentos testados para todos os grupos. De acordo com Nassri *et al.*(2003), a presença do aumento na colagenização concomitante ao aumento dos períodos experimentais, mesmo que em escala sensivelmente menor, e ainda que pela tendência de dispersão do material e a constância na irritação, indica a evolução do processo de reparação.

Quando se compara as características da condensação fibrosa entre os grupos, nota-se a semelhança no desenvolvimento e maturação capsular entre os cimentos Sealer 26® e AH Plus® e certa superioridade do Epiphany®. Entretanto, o cimento Endofill apresentou em todos os tempos avaliados, confirmando resultados obtidos por Scarparo *et al.* (2009), uma condensação fibrosa menos intensa, embora sem diferença estatística significante. Embora os dados quantitativos não tenham demonstrado significância, as observações realizadas na análise qualitativa sugerem relação entre a cápsula fibrosa e o poder de irritabilidade aos tecidos, visto que uma cápsula fibrosa bem organizada limitando a área de inflamação restringe a expansão da reação para regiões distantes da presença do material.

Outro achado adicional no presente estudo foi a presença de mastócitos observada no tecido conjuntivo principalmente nas áreas perivasculares em períodos mais adiantados avaliados dos cimentos Sealer 26®, Epiphany® e AH Plus® sugerindo de acordo com Zafalon *et al.*, (2007) a possível reação de hipersensibilidade tardia. De acordo com Bratel *et al.* (1998), materiais endodônticos podem induzir a essa reação mesmo em concentrações subtóxicas.

Outros estudos, entretanto, relatam a função relevante dos mastócitos na gênese do tecido conjuntivo, incluindo a liberação de mediadores que estimulam a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (Garbuzenko *et al.*, 2002; Pereira *et al.*, 2007). Eles demonstram a relação existente entre a presença de fibrose e o número de mastócitos na pele (Garbuzenko *et al.*, 2002) e língua (Pereira *et al.*, 2007). Porém, não foram encontrados relatos prévios, sobre a analogia do padrão de fibrose com o número de mastócitos na reação com o tecido conjuntivo e cimentos endodônticos. Dessa forma, mais estudos são necessários para verificar a presença dessas células e sua verdadeira atuação frente a esses materiais.

Como previsto, independente do tipo de cimento utilizado, a quantidade de material extravasado no interior do tecido variou de pequena a grande. De modo geral, foi observada uma resposta tecidual mais intensa nas extremidades que continham excesso de cimento, o que coincide com os

achados de outros autores (Bernath & Szabo, 2003; Batista *et al.*, 2007). A presença do material no tecido irá proporcionar uma maior irritação física e química, devido à maior área de contato (Siqueira Jr., 2005). Desta maneira, pode-se supor que haverá uma alta liberação de componentes irritantes, causando inflamação de grande porte, ao contrário de quando o cimento está confinado no diâmetro do tubo (Bernath & Szabo, 2003).

Nossos dados, portanto sugerem que além do tipo de cimento utilizado e o período experimental pós-implante, como descrito por outros autores (Silva *et al.*, 1997; Kolokouris *et al.*, 1998; Schwarze *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2006), a resposta tecidual é mais intensa e o processo de reparo mais lento em regiões onde a quantidade de cimento extravasado é maior.

Conclusões

7- Conclusões

Dentro das condições e limitações desse estudo e a partir da análise dos resultados foi possível concluir que:

- Todos os cimentos testados provocaram uma reação inflamatória inicialmente severa que decresceu ao longo dos períodos avaliados. O cimento Endofill se manteve o mais irritante aos 42 e 60 dias comparado aos demais cimentos avaliados;
- Todos os materiais avaliados foram tolerados pelo tecido conjuntivo em períodos de observação tardios;
- A quantidade de material em contato com o tecido, o tipo de cimento utilizado e o período pós-implante avaliado influenciaram diretamente a resposta tecidual.
- A formação da cápsula fibrosa, presente em todas as interfaces analisadas, se apresentou como uma proteção desenvolvida pelo tecido à presença de um material irritante, sendo mais espessa (maior quantidade de colágeno) em locais onde a quantidade de cimento foi maior e ao longo dos períodos analisados sua presença favoreceu a reparação tecidual.

Referências

* De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

Referências

1. Abbas AK, Lichtman, A.H., Pober, J.S. **Imunologia celular e molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.
2. Alle N, Marchesano LH. [Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (indomethacin, phenylbutazone, sulindac, naproxen, benzydamine and neflumic acid) on rat leukograms with a chronic inflammatory process]. **Rev Odontol Univ São Paulo**. 1988;2(2):120-6.
3. Almeida WA. **Cimentos obturadores de canais radiculares. Avaliação histológica da resposta dos tecidos apicais e periapicais em dentes de cães após biopulpectomia. Estudo da infiltração marginal apical.** (Tese) Araraquara: UEP;1997.
4. Araújo GS. **Avaliação histológica do efeito do laser de baixa intensidade na resposta do tecido conjuntivo ao cimento Endofill.** (Tese) Araraquara: FOA/UNESP; 2008..
5. Batista RFC, Hidalgo MM, Hernandes 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: 171–77.
6. Benatti O, Stolf WL, Ruhnke LA. Verification of the consistency, setting time and dimensional changes of the root canal filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1978;46(1):107-13.
7. Berbert CCV. **Reação dos tecidos periapicais a sobreobturações com diferentes cimentos endodônticos em duas consistências. Histopatologia em dentes de cães.** (Tese) Piracicaba:FOP/UNICAMP;1996.
8. Bernáth M, Szabó J. Tissue reaction initiated by different sealers. **Int Endod J**. 2003; 36: 256-6.
9. Bhaskar SN, Beasley JD, Ward JP, Cutright DE. Human pulp capping with isobutyl cyanoacrylate. **J Dent Res**. 1972;51(1):58-61.
10. Bocca M, Coscia D, Bottalico L, Delpiano IM. [New suture techniques in oral surgery. Description and comparison with traditional sutures]. **Minerva Stomatol**. 1999;48(12):633-7.
11. Bodrumlu E, Muglali M, Sumer M, Guvenc T. The Response of Subcutaneous Connective Tissue to a New Endodontic Filling Material. **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater** 2008;84B: 463–7.

12. Borba CC, Roubaud Neto E; Val RLR, Borba Jr. CO, Soufen MA, Francisco Neto A, et al. Uso do cianoacrilato na síntese de pele de ratos: trabalho de pesquisa experimental. **Acta Cir Bras.** 2000;15(1):48-54.
13. Borlina SC, Souza V, Holland R, Murata SS Gomes-Filho JE, Dezan Júnior E, Marion JJC, Anjos Neto D. Influence of apical forâmen widening and sealer on the healing of chronic periapical lesions induced in dog' teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2010;109:932-40.
14. Bortolo MV. **Análise comparativa da reação tecidual à implantação de tubos de polietileno, bastões de dentina e cápsulas de colágeno. Estudo microscópico em tecido subcutâneo de ratos. Avaliação de um modelo metodológico.** Bauru,SP: Universidade de São Paulo; 2009.
15. Bouillaguet S, Wataba JC, Tay FR, Brachett MG, Lockwood PE. Initial In Vitro Biological Response to Contemporary Endodontic Sealers. **J Endod.** 2006; 32:989-92.
16. Bratel J, Jontell M, Dahlgren U, Bergenholz G. Effects of root canal sealers on immunocompetent cells in vitro and in vivo. **Int Endod J.** 1998;31:178-88.
17. Chen DC, Lee YY, Yeh PY, Lin JC, Chen YL, Hung SL. Eugenol inhibited the antimicrobial functions of neutrophils. **J Endod** 2008;34:176-80.
18. Consolaro A. Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. Maringá: Dental Press 2009.
19. Costa CAS, Marcantonio, R.A.C., Hebling, J., Teixeira, H.M., Kuramae, M. Avaliação da biocompatibilidade do sistema adesivo Prime & Bond 2.0 e do cimento de hidróxido de cálcio Dycal. Análise em microscopia da luz. **Odonto 2000 Odontologia do Século XXI.** 1997;1(2):8-12.
20. Costa CAS, Hebling J, Souza PPC. Testes de biocompatibilidade. In:Estrela, C. **Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia.** São Paulo: Artes Médicas; 2001. Cap. 10, p. 162-94.
21. Costa CAS, Hebling, J, Souza PPC. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: Estrela, C, editor. **Metodologia Científica: ciência, ensino e pesquisa.** 2 ed. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p. 233-71.

22. Cotran RS, Kumar, V., Robbins, C.T. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
23. Cruz CW, Moura PPR, Habitante SM, Zöllner N, Jorge AOC. Avaliação do efeito antimicrobiano *in Vitro* dos cimentos obturadores Rickert, N-Rickert e Sealer 26®. **Rev. biociênc., Taubaté**. 2001;7(1):49-53.
24. de Azevedo CL, Marques MM, Bombana AC. Cytotoxic effects of cyanoacrylates used as retrograde filling materials: an *in vitro* analysis. **Pesqui Odontol Bras**. 2003;17(2):113-8.
25. de Campos-Pinto MMD, de Oliveira DA, Versiani MA, Silva-Sousa YT, de Sousa-Neto MD, da Cruz Perez DE. Assessment of the biocompatibility of Epiphany® root canal sealer in rat subcutaneous tissues. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2008;105(5):e77-81.
26. de Oliveira RL, Oliveira Filho RS, Gomes HC, Franco MF, Enokihara MMSS, Duarte MAH. Influence of calcium hydroxide addition to AH Plus® sealer on its biocompatibility. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod**. 2010;109:e50-e54.
27. Desai S, Chandler N. Calcium Hydroxide-Based Root Canal Sealers: A Review **J Endod**. 2009;35(4):475-480.
28. Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Poulopoulos 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(3):122-7.
29. Ezzie E, Fleury A, Solomon E, Spears R, He J. Efficacy of retreatment techniques for a resin-based root canal obturation material. **J Endod** 2006;32(4):341-44.
30. Figueiredo JAP, 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;34:377-85.
31. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**. 2005;4(3):281-6.
32. Garbuzenko E, Nagler A, Pickholtz D, Gillery P, Reich R, Maquart FX, et al. Human mast cells stimulate fibroblast proliferation, collagen synthesis and lattice contraction: a direct role for mast cells skin fibrosis. **Clin Exp Allergy**. 2002;32:237-46.

33. Garcia Lda F, Marques AA, Roselino Lde M, Pires-de-Souza Fde C, Consani S. Biocompatibility evaluation of Epiphany®/Resilon® root canal filling system in subcutaneous tissue of rats. **J Endod.** 2010;36(1):110-4.
34. Geurtzen W. Biocompatibility of root canal filling materials. **Aust Endod J.** 2001;27:12-21.
35. Gomes-Filho JE, Gomes BPFA, Zaia AA, Novaes PD, Souza-Filho FJ. Glycol methacrylate: na alternative method for embedding subcutaneous implants. **J Endod.** 2001;27(4): 266-8.
36. Gomes-Filho, Gomes BPFA, Zaia AA, Ferraz CR, Souza-Filho FJ. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers using subcutaneos implants. **J Appl Oral Sci.** 2007; 15(3):186-94.
37. Gomes-Filho JE, Bernabe PF, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan-Junior E, de Moraes Costa MM, *et al.* Reaction of rat connective tissue to a new calcium hydroxide-based sealer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2008;106(2):e71-6.
38. Guigand M, Pellen-Mussi P, Le Goff A, Vulcain JM, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. **J Endod.** 1999;25(6):419-23.
39. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. **Dent Mater.** 1996;12(3):186-93.
40. Hassanloo A; Watson P; Finer Y; Friedman S. Retreatment efficacy of the Epiphany® soft resin obturation system. **Int Endod J.** 2007;40(2):633-643.
41. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. **Int Endod J.** 2003; 36:75 -85.
42. Hedrich HJ. History, strains and models. In: Krinke GL. **The laboratory rat.** London, Academic Press; 2000. Cap. 1, p.3-16.
43. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Bernabe FE, Filho JA, Junior ED, *et al.* Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. **J Endod.** 2002;28(3):173-6.
44. Horsted P, Fejerskov O, Johannessen G. A model for experimental endodontics by transplanting human dental roots subcutaneously to rats. **Scand J Dent Res.** 1980;88(5):412-7.

45. Huang FM, Tsai CH, Yang SF, Chang YC. Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. **J Endod.** 2005;31(9):679-83.
46. Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. **Biomaterials** 2002;23:77-83.
47. Hume RW. Na analysis of the release and the diffusion through dentin of eugenol from zinc oxide- eugenol mixtures. **J. Dent. Res.** 1984;63:881-84.
48. Hume RW. In vitro studies on the local pharmacodynamics, pharmacology and toxicology of eugenol and zinc oxide-eugenol . **Int Endod J.** 1988;21(2):130-34.
49. Imai Y, Komabayashi T. Properties of a new injectable type of root canal filling resin with adhesiveness to dentin. **J Endod.** 2003;29(1):20-3.
50. International Organization for standardization. **ISO 7405: dentistry – preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials.** Genève, ISO, 1997.
51. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido conjuntivo. In: Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica.** 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p.92-124.
52. Kaplan AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM. Rhealogical properties and biocompatibility of endodontic sealers. **Int J Endod.** 2003;36:527-32.
53. Kolokouris I, Economides N, Beltes P, Vlemmas I. In Vivo Comparison of the Biocompatibility of Two Root Canal Sealers Implanted into the Subcutaneous Connective Tissue of Rats. **J Endod.** 1998;24(2):82-85.
54. koss LG. Diagnostic Cytology and its histopathology bases. Vol.1. 4^a ed. J.B.Lippincott company, Philadelphia, Pennsylvania. p.105-17. 1992. Apud Zafalon EJ. **Avaliação das propriedades biológicas e físicas dos cimentos Endorez e Endomethasone: Reação do tecido subcutâneo em Calomys callosus e selamento apical em dentes humanos.** (Dissertação) Uberlândia:UFU;2004.
55. Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Beltes P, Geromichalos GD, Kortsaris AH. Citotoxicity of three resin-based root canal sealers: na in vitro evaluation. **Endod Dent Traumatol.** 1998;14:182-5.

56. Leal JM, Simões Filho AP, Leonardo MR. Estudo *in vitro* sobre a infiltração e o comportamento dimensional dos címetos de uso endodôntico: fill canal e trin canal. **Rev Bras Odontol.** 1975;32(194):173-75.
57. Leal JM, Holland R, Esberard RM. Sealapex, C.R.C.S., Fill Canal and N-Rickert, study of biocompatibility in subcutaneous connective tissue of rats. **Odontol Clin.** 1988;2(1):7-14.
58. Leonardo MR; Leal JM. **Endodontia: Tratamento dos canais radiculares.** 3^a edição – São Paulo: ed.Panamericana, 1998.
59. Leonardo MR. **Tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos:** Artes Médicas; 2005.
60. Leonardo MR, Barnett F, Debelian GJ, de Pontes Lima RK, Bezerra da Silva LA. Root canal adhesive filling in dogs' teeth with or without coronal restoration: a histopathological evaluation. **J Endod.** 2007;33(11):1299-303.
61. Leonardo MR, da Silva LA, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. **Endod Dent Traumatol.** 1999;15(1):28-32.
62. Leonardo MR, Flores DS, de Paula ESFW, de Toledo Leonardo R, da Silva LA. A comparison study of periapical repair in dogs' teeth using RoekoSeal and AH Plus® root canal sealers: a histopathological evaluation. **J Endod.** 2008;34(7):822-5.
63. Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS, Assed S, Ether SS. Calcium Hydroxide Root Canal Sealers-Histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. **J Endod.** 1997; 23(7):428-32.
64. Leonardo MR. Endodontia, considerações iniciais, definição, importância. In: Leonardo MR. **Endodontia - tratamento de canais radiculares.** São Paulo: Artes Médicas, 2005; p.1-20.
65. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol.** 2002;23(11):549-55.
66. Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. A clinically oriented review. **Oral Surg Oral Pathol** 1992;73:729-37.

67. Mendonça EF, Estrela C. Reparo após o Tratamento Endodôntico. In: Estrela C, Figueiredo JAP. **Endodontia: Princípios Biológicos e Mecânicos**. São Paulo: Artes Médicas, 2001; p.295-314.
68. Merdad K, Pascon AE, Kulkarni G, Santerre P, Friedman S. Short-term cytotoxicity assessment of components of the Epiphany® resin-percha obturating system by indirect and direct contact Millipore filter assay. *J Endod.* 2007; 33, 24–7.
69. Moraes FG. **Biocompatibilidade dos cimentos Sealer 26® e Óxido de Zinco e Eugenol protegidos ou não com dois diferentes tipos de própolis. Analise em tecido subcutâneo de ratos.** (Tese) Bauru: FOB/USP; 2006.
70. Nassri MRG, Lia RCC, Bombana AC. Analysis of the tissue answer regarding two root canal sealers. *J Appl Oral Sci.* 2003;11(1):9-14.
71. Naves AE. **Estudo comparativo da propriedade seladora do cimento N-Rickert associado ou não ao cianoacrilato de etila nas obturações retógradas.** Alfenas-MG: Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas; 1999.
72. Neves MS. **Resposta dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães aos cimentos Sealapex e AH Plus®, após obturação dos canais radiculares realizadas aquém ou além do forame apical.** (Dissertação) Marília:UNIMAR; 2005.
73. Olsson B, Sliwkowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod.* 1981;7(8):355-67.
74. Onay EO, Ungor M, Ozdemir BH. In vivo evaluation of biocompatibility of a new resin-based obturation system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod.* 2007; 104:e60-e66.
75. Orstavik D. Antibacterian properties of endodontic materials. *Int Endod J.* 1988;1:161-9.
76. 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(4):281-7.
77. Pedroso JA. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de cimentos endodônticos.** (Tese) Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2000.

78. Perassi FT. **Resposta tecidual ao cimento endodôntico resinoso EndoRez e um cimento especial derivado do polímero de mamona comparados ao Endofill e Sealapex. Estudo morfológico.** (Tese) Araraquara:FO/UEP;2004.
79. Pereira SAL, Santos VM, Rodrigues DMR, Cunha-Castro EC, Reis MA, Teixeira VPA. Quantitative analysis of fibrosis and mast cells in the tongue of chronic chagasic patients: autopsy study. **Med Mal Infect.** 2007; 37:229-33.
80. Pertot WJ, Camps J, Remusat M, Proust JP. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the mandibular bone of rabbits. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1992;73(5):613-20.
81. Podshadley AG, Harrison JD. Rat connective tissue response to pontic materials. **J.Prosthet Dent.** 1966;16(1):110-118.
82. Queiroz AM. **Materiais Obturadores de Canais Radiculares de Dentes Descíduos: Avaliação da Atividade Antibacteriana *in vitro* da Compatibilidade tecidual *in vivo*.** (Tese) Ribeirão Preto:FORP/USP;2008.
83. Robbins SL: Cotran RS; Kumar V. **Patologia Estrutural e Funcional.** 4^a. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 766p.
84. Santos MC, de Souza AP, Gerlach RF, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Line SRP. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. **J Oral Rehabil.** 2004;31(7):660-4.
85. Scarparo RK. **Analise da reação tecidual a cimentos endodônticos de óxido de zinco e eugenol, à base de resina epóxica e à base de resina metacrilato: estudo “*in vivo*”.** (Dissertação) Porto Alegre:UFRGS; 2007.
86. Scarparo RK; Grecca FS; Fachin EVF. Analysis of Tissue Reactions to Methacrylate Resin-based, Epoxy Resin-based, and Zinc Oxide-Eugenol Endodontic Sealers. **J Endod.** 2009;35(2):229-32.
87. Schawarze T; Fiedler I; Leyhausen G; Geurtzen W. The Cellular Compatibility of five endodontic sealers during the setting period. **J Endod.** 2002;28(11):784-86.
88. Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari H, Gaderian A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. **J Endod.** 2006;32(8):776-80.

89. Shipper G, Orstavik D, Teixeira FB, Trope M. An evaluation of microbial leakage in roots filled with a thermoplastic synthetic polymer-based root canal filling material (Resilon®). *J Endod.* 2004;30(5):342-7.
90. Shipper G, Teixeira FB, Arnold RR, Trope M. Periapical inflammation after coronal microbial inoculation of dog roots filled with gutta-percha or Resilon®. *J Endod.* 2005;31(2):91-6.
91. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999; 341(10):738-46.
92. Silva LAB, Leonardo MR, Faccioli LH, Figueiredo F. Inflammatory Response to Calcium Hydroxide Based Root Canal Sealers. *J Endod.* 1997; 23(2):86-90.
93. Siqueira Jr. JF; Dantas CJS. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação.** Rio de Janeiro: Médica Científica Ltda. 2000. p.73.
94. Siqueira Jr. JF. Inflamação aguda: resposta vascular e celular. In: Siqueira Jr, JF et al. **Bases moleculares da Inflamação.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003 a.Cap.6, p.73-82.
95. Siqueira Jr. JF. Inflamação aguda: mediadores químicos. In: Siqueira Jr, JF et al. **Bases moleculares da Inflamação.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003b. Cap.7, p.83-103.
96. Siqueira Jr. JF. Reaction of periradicular tissues to root canal treatment: benefits and drawbacks. *Endodontic Topics.* 2005;10(1):123-47.
97. Soares I, Goldberg F, Massone EJ, Soares IM. Periapical tissue response to two calcium hydroxide-containing endodontic sealers. *J Endod.* 1990;16(4):166-9.
98. Sousa CJA. **Avaliação histológica da biocompatibilidade de materiais indicados para retro-obturações em cirurgias parendodônticas, através de implantes intra-ósseo em Guinea pig" segundo critérios estabelecidos pela FDI.** Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2000.
99. Sousa CJA, Montes CRM, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA. Comparison of the Intraosseous Biocompatibility of AH Plus®, EndoREZ, and Epiphany® Root Canal Sealers. *J Endod.* 2006;32:656–662.

100. Tai KW, Huang FM, Chang YC. Cytotoxic evaluation of root canal filling material on primary human oral fibroblast culture and a permanent hamster cell line. **J Endod** 2001;27:571-3.
101. Tanomaru-Filho M, Jorge EG, Tanomaru JM, Goncalves M. Evaluation of the radiopacity of calcium hydroxide- and glass-ionomer-based root canal sealers. **Int Endod J.** 2008;41(1):50-3.
102. Tanomaru-Filho M, Luis MR, Leonardo MR, Tanomaru JM, Silva LA. Evaluation of periapical repair following retrograde filling with different root-end filling materials in dog teeth with periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2006;102(1):127-32.
103. Tanomaru-Filho M, Faleiros FBC, Saçaki JN, Duarte MAH, 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(10):1418-21.
104. Teixeira FB, Teixeira EC, Thompson JY, Trope M. Fracture resistance of roots endodontically treated with a new resin filling material. **J Am Dent Assoc.** 2004;135(5):646-52.
105. Torabinejad M, Hong CU, Lee SJ, Monsef M, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. **J Endod.** 1995;21(12):603-8.
106. Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. **J Endod.** 1997;23(4):225-8.
107. Valera MC, Leonardo MR, Consolaro A, Matuda FS. Biological compatibility of some types of endodontic calcium hydroxide and glass ionomer cements. **J Appl Oral Sci.** 2004; 12(4): 294-300.
108. Veloso HHP, Santos RA, Araújo TP, Leonardi DP, Baratto Filho F. Histological Analysis of the Biocompatibility of three different calcium hydroxide-based root canal sealers. **J Appl Oral Sci.** 2006; 14(5):376-81.
109. Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha MI, Lacey S, Pascon EA, Sousa-Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus® and Epiphany® root canal sealants. **Int Endod J.** 2006;39(6):464-71
110. Wilcox LR, Krell KV, Madison S, Rittman B. Endodontic retreatment: evaluation of gutta-percha and sealer removal and canal reinstrumentation. **J. Endod** 1987; 13(9):453-57.

111. Wolfaardt JF, Cleanton-Jones P, Lownie J, Ackermann G. Biocompatibility testing of a saline maxillofacial prosthetic elastomer: soft tissue study en primates. **J Prosthet Dent.** 1992;68(2):331-8
112. Yoshimine Y, Ono M, Akamine A. In vitro comparison of the biocompatibility of mineral trioxide aggregate, 4META/MMA-TBB resin, and intermediate restorative material as root-end-filling materials. **J Endod.** 2007;33(9):1066-9.
113. Younis O, Hembree JH. Leakage of different root canal sealants. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** 1976; 41(6):777-84.
114. Xavier MJ, Berbert A, Alle N, Bramante CM, Lopes ES. [Histopathological behavior of rat (*Rattus Norvegicus* var. *Albinus*) connective tissue to implants of root canal filling cements: Rickert, AH-26 and Endomethasone (author's transl)]. **Estomatol Cult.** 1974;8(1):61-71.
115. Zafalon EJ, Versiani MA, Souza CJA, Moura CCG, Dechichi P. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2007;103:e88-e94.
116. Zambuzzi WF, Oliveira RC, Alanis D, Menezes R, Letra A, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM. Microscopic analysys of porous microgranular bovine anorganic boné implantes em rat subcutâneos tissue. **J Appl Oral Sci.** 2005;13(4):382-6.
117. Zmener O. Tissue Response to a New Methacrylate-Based Root Canal Sealer: Preliminary Observations in the Subcutaneous Connective Tissue of Rats. **J Endod.** 2004; 30(5):348-51.
118. 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(9):1574-9.

Anexos
