

Daniela Cristina Miyagaki

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE
DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS EM
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS,
E SUA RELAÇÃO COM O SUBTIPO
DE MACRÓFAGO M1**

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

Daniela Cristina Miyagaki

Avaliação da biocompatibilidade de cimentos endodônticos em tecido subcutâneo de rato e sua relação com o subtipo de macrófago M1

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: Profa. Dra. Camilla Christian Gomes Moura

Banca Examinadora:

Prof. Dr. João Carlos Gabrielli Biffi
Profa. Dra. Camilla Christian Gomes Moura
Profa. Dra. Paula Dechichi
Profa. Dra. Izabel Cristina Fröner

Uberlândia
2011

DEDICATÓRIA

Dedico mais esta conquista a meus queridos pais,

Olímpio e Márcia, que com muito carinho

sempre me apoiaram nesta trajetória

e acima de tudo acreditaram em mim.

Muito obrigada !!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“A **DEUS**, que nos presenteou com a liberdade, nos abençoou com a inteligência, nos deu a graça de lutarmos para a conquista de nossas realizações!” Sem Ele nada seria possível!

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia, pois o triunfo pertence a quem mais se atreve.”

Charles Chaplin

Aos meus pais, **MÁRCIA E OLÍMPIO**, que sempre estiveram ao meu lado, apoiando nos momentos difíceis, confortando e guiando meus passos. Se hoje estou aqui é porque nunca mediram esforços para minha formação profissional e educação. Muito obrigada pelo carinho, dedicação e atenção que sempre tiveram comigo! Amo vocês!!!

“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, **GRAZI E ANDRÉ**, obrigada pelo apoio, carinho e incentivo que sempre tiveram comigo.

Ao meu sobrinho **ANDREZINHO**, que mesmo de longe, me faz sorrir e com seu jeitinho doce enche meu coração de alegria.

Aos meus parentes de Uberlândia: **Tia Nê, tia Kaori, tio Márcio e minha prima Fer**, pela inestimável ajuda durante minha estadia em

Uberlândia, obrigada pelos almoços de domingo, pelas risadas, pela companhia!!!

A toda minha **FAMÍLIA**, pelo carinho, amor durante toda vida.

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

Ao **PROF. JOÃO CARLOS GABRIELLI BIFFI**, meu orientador, pela paciência, dedicação e confiança em mim depositadas durante a execução deste trabalho. Um exemplo de competência, profissionalismo e mestre! Levarei seus ensinamentos por toda vida!

À **CAMILLA C. GOMES MOURA**, minha co-orientadora, minha sincera gratidão pela imensa dedicação para concentração deste estudo. Obrigada pelo constante incentivo, por não medir esforços para me ajudar no que fosse preciso, e com quem aprendi muito!

*“Uns são homens;
Alguns são professores;
Poucos são mestres.
Aos primeiros, escuta-se;
Aos segundos, respeita-se;
Aos últimos, segue-se.
Se hoje enxergo longe, é porque fui
colocado em ombros de gigantes!”
Autor desconhecido*

À PROFa. **PAULA DECHICHI**, um exemplo de pessoa, por quem tenho imensa admiração, sempre disposta a apoiar, dar conselhos, ajudar, ensinar, principalmente durante as dificuldades do trabalho! Obrigada por tudo!

Ao **PROF. CARLOS JOSÉ SOARES**, pelo constante estímulo à pesquisa, pela sua competência, dedicação, determinação em busca de seus objetivos. Agradeço pela ajuda no momento que mais precisei!

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

À **Marlete**, pela amizade, companheirismo e pela oportunidade cedida para participar no centrinho de oclusão.

Aos colegas do mestrado **Flaviana, George, Danilo** e as alunas de iniciação **Talita e Carla**, pela valiosa colaboração durante a execução do procedimento cirúrgico.

Aos **amigos do mestrado**: Karla Zancopé, Lucas Dantas, João Paulo Lyra, George Soares, Ana Cristina Campos, Ronaldo Almeida, Maíra, Anísio, Andréia Valdívia, Bruno Reis, Mariana Pereira, Flaviana Rocha, Luciana Zaramela, e, em especial, Renata Gil, Germana Camargos, Marília Cherulli, Marina Roscoe, Érice França e Thaís Cunha que dividiram essa caminhada, compartilhando as dificuldades, e que com certeza deixarão muita saudade!

À **Germana**, que se tornou uma grande amiga e que com certeza continuará durante a realização de mais um sonho, o doutorado. Sua amizade, senso de humor e companheirismo em todos os momentos são incomparáveis!

À **Thaís**, minha companheira de pesquisa, obrigada pelos conselhos, pela ajuda no momento que mais precisei! Espero que a distância não impeça que nossa amizade continue! Sentirei muita saudade de você!

“Depois de algum tempo você aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.”

W. Shakespeare

AGRADECIMENTOS

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

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

Ao Prof. Marcelo Beletti e Prof. Paulo César 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.

Ao departamento de prótese por carinhosamente me acolher durante esses dois anos.

Aos funcionários: Fabrício, Marcelo, Sr. Advaldo e Sr. Hélio, sempre dispostos a ajudar durante a execução da pesquisa.

Às secretárias da pós-graduação Graça e Abigail, pela atenção 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 realização deste trabalho!!!

“A gratidão é uma forma singular de reconhecimento, e o reconhecimento é uma forma sincera de gratidão”

Alan Vaszatte

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

*A certeza de que seremos interrompidos
antes de terminar...*

Portanto, devemos:

Fazer da interrupção, um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	1
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1. Cimentos endodônticos – endodontia contemporânea	10
2.2. Biocompatibilidade	15
2.3. Implante subcutâneo	18
2.4. Tecido conjuntivo normal <i>versus</i> inflamação	20
2.5. Papel dos macrófagos no padrão de resposta- subtipos de macrófago	24
3. PROPOSIÇÃO	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Materiais	31
4.1.1. Animais	31
4.1.2. Cimentos Endodônticos	31
4.1.3. Corpos de prova	32
4.2. Métodos	33
4.2.1. Da implantação subcutânea dos tubos	33
4.2.2. Sacrifício dos animais e remoção das peças cirúrgicas	36
4.2.3. Processamento histológico	37
4.2.4. Análise em HE	38
4.2.5. Avaliação imunohistoquímica dos macrófagos M1	38
4.2.5.1. Análise estatística	39
5. RESULTADOS	41
5.1. Análise histopatológica descritiva	42
5.1.1. Sealer 26 e Epiphany	42
5.2. Análise da imunomarcacão de macrófagos M1	50
6. DISCUSSÃO	56

6.1.	Metodologia	57
6.2.	Períodos experimentais empregados e método de análise dos resultados	61
6.3.	Cimentos utilizados e resultados obtidos	62
6.4.	Relação macrófagos M1 e reação inflamatória	66
7.	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXO	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Por cento
<	Menor
=	Igual
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e Eosina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
LPS	lipopolissacáride
M1	Macrófago do tipo 1
M2	Macrófago do tipo 2
mg/kg	Miligramas por quilo
ML	Microscópio de luz
ml	Mililitro
mm	Milímetro
n°	Número
NO	Óxido nítrico
p	Nível de significância
PBS	Tampão salina-fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
ROIS	Radicais livres de oxigênio
Th	Célula <i>T helper</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
µm	Micrômetro

RESUMO

Considerando que o contato entre componentes tóxicos presentes em alguns cimentos endodônticos e os tecidos perirradiculares podem conduzir a uma reação inflamatória mais prolongada, e assim aumentar o período necessário para cicatrização. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual dos cimentos Sealer 26 e Epiphany, recém-manipulados, em períodos iniciais, após implantação em subcutâneo de ratos e analisar a relação entre macrófagos M1 e reparo tecidual. Tubos de polietileno foram preenchidos com os materiais teste e implantados em duas diferentes lojas cirúrgicas localizadas no dorso de 21 ratos wistar. Após 7, 14 e 21 dias, sete animais foram sacrificados e os implantes removidos. Metade dos cortes foi corada com hematoxilina e eosina e o restante submetido à imunohistoquímica. Para cada período experimental e cimento, a intensidade da resposta inflamatória foi classificada segundo critérios da FDI, e as células positivas para iNOS foram analisadas qualitativa e quantitativamente, e então feita a análise estatística. A resposta tecidual na lateral dos tubos correspondeu ao controle negativo do estudo. Observou-se, para ambos os cimentos, uma reação inflamatória severa, a qual diminuiu com o tempo. A imunomarcagem mostrou uma marcação citoplasmática variável para ambos os cimentos, ao longo do campo e em função do período de análise. Houve diferença estatística significativa entre os cimentos Sealer 26 e Epiphany aos 7 e 14 dias ($p=0.0079$ e $p=0.0115$, respectivamente), mas em 21 dias não houve diferença significativa ($p=0.6545$). Ao longo do tempo, Epiphany mostrou maior número de células positivas para iNOS aos 14 dias, apresentando diferenças significativas quando comparado aos períodos de 7 ($p=0.0246$) e 21 dias ($p=0.5212$). Já o Sealer 26 demonstrou ausência de significância ($p=0.3126$). Foi possível concluir que Sealer 26 e Epiphany apresentaram padrões de aceitabilidade dentro dos períodos iniciais avaliados. Embora a marcação para M1 não possua relação direta com a intensidade da inflamação e velocidade do reparo, sugerimos que a composição dos cimentos resulte em formas diferentes de conduzir ao reparo.

Palavras-chave: Biocompatibilidade, materiais odontológicos, cimentos à base de resina metacrilato, macrófagos, obturação do canal.

ABSTRACT

Considering that the contact between the toxic components present in some endodontic sealers and periradicular tissues can lead to a longer inflammatory reaction, increasing the time required to repair, resulting in postoperative pain and even reactions of delayed type hypersensitivity. The purpose of this study was to evaluate the tissue response of freshly mixed Sealer 26 and Epiphany root canal sealers in early periods after implantation in subcutaneous tissue of rats and analyze the relationship between macrophages M1 and tissue repair. Polyethylene tubes were filled with the test materials and implanted into two different pockets of the dorsum of twenty-one Wistar rats. After 7, 14 and 21 days, seven animals were killed and the implants were removed. Half of the histological sections were processed for hematoxylin and eosin and the rest were stained by means of immunohistochemistry. For each experimental period and sealer, the intensity of inflammatory response was classified according to criteria established by the FDI, and the cells positive for iNOS were analyzed qualitatively and quantitatively, and then subjected to the statistical analysis. The connective tissue response along the lateral wall outside of each tube served as a negative control for the study. A severe inflammatory reaction was observed for both sealers which diminished with time. The immunolabeling showed a variable cytoplasmatic staining for both sealers, along the field and according to the period of analysis. There was a statistically significant difference between Sealer 26 and Epiphany at 7 and 14 days ($p = 0.0079$ and $p = 0.0115$, respectively), but in 21 days no significant difference was found ($p = 0.6545$). Over time, Epiphany showed a greater number of cells positive for iNOS at 14 days, presenting significant differences when compared to periods of 7 ($p = 0.0246$) and 21 days ($p = 0.5212$), while Sealer 26 showed no significance ($p = 0.3126$). It was possible to conclude that Epiphany and Sealer 26 demonstrated patterns of acceptability within the initial periods evaluated. Although the immunolabeling for M1 has no direct relationship with the intensity of inflammation and velocity of repair, we suggest that the composition of the sealers results in different ways of conducting to repair.

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

O sucesso na terapia endodôntica depende de uma adequada limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares, seguido por uma obturação tridimensional (Estrela, 2004; Leonardo, 2005). Para alcançar tal objetivo, os materiais obturadores de canais radiculares devem apresentar propriedades físicas e biológicas adequadas a fim de evitar possíveis irritações aos tecidos perirradiculares (Sousa et al., 2004), propiciando estímulo para o reparo apical e periapical (Leal et al., 1988).

Cimentos endodônticos são utilizados com o propósito de obter um selamento o mais hermético possível por um longo período, impedindo assim, a comunicação tanto da cavidade bucal, quanto da região periapical, com o interior do canal radicular (Hauman & Love, 2003b; Imai & Komabayashi, 2003).

Estão disponíveis no mercado vários cimentos endodônticos com diferentes bases: óxido de zinco e eugenol, hidróxido de cálcio, resinas epóxica ou metacrilato, e ionômero de vidro. Estes devem preencher vários requisitos, afim de que os resultados alcançados ao fim do tratamento sejam satisfatórios, como por exemplo, 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).

No entanto, até o presente momento, ainda não há um cimento que preencha todos esses requisitos, o que vem estimulando o desenvolvimento de novos materiais com o objetivo de aumentar a efetividade de preenchimento do canal radicular (Susini et al., 2006).

Para que um novo material obturador seja introduzido no mercado, suas propriedades devem ser cuidadosamente averiguadas a fim de assegurar clinicamente sua eficácia e indicar seu uso. As metodologias recomendadas pela Federação Dentária Internacional - FDI (1980) e International Standards Organization - ISO (1984) para avaliar a biocompatibilidade dos materiais endodônticos incluem testes iniciais, testes secundários e testes de aplicação. A avaliação por meio de testes iniciais é realizada utilizando ensaios *in vitro*, os

quais analisam o perfil de toxicidade do material; os testes secundários são executados *in vivo*, utilizando animais de laboratório e podem incluir experimentos de implantação; e, por fim, os testes de aplicação são realizados em seres humanos ou primatas (Hauman & Love, 2003a).

Várias pesquisas têm sido realizadas em roedores para verificar a biocompatibilidade de materiais obturadores (Bernath & Szabo, 2003; Sousa et al., 2006; Onay et al., 2007; Zafalon et al., 2007; Gomes-Filho et al., 2008; de Oliveira et al., 2010; Zmener et al., 2010) e retro-obturadores (Holland et al., 1999; Sousa et al., 2004; Shahi et al., 2006).

Na última década, foi introduzido no mercado um sistema obturador modificado chamado Epiphany-Resilon®, com o objetivo de formar um monobloco no interior dos canais radiculares (Teixeira et al., 2004; de Oliveira et al., 2006; Ezzie et al., 2006; Versiani et al., 2006). Epiphany® é um cimento dual cuja matriz é uma mistura de bisfenol A metacrilato glicídico, etoxilato Bis-GMA, resina dimetacrilato uretano e metacrilatos hidrofílicos disfuncionais (Teixeira et al., 2004). Este cimento pode ser utilizado juntamente com os cones sintéticos de polímero de poliéster Resilon® (Research LLC, Madison, CT), os quais interagem quimicamente formando um conjunto, que se adere às paredes do canal radicular (Shipper et al., 2004; Teixeira et al., 2004; Versiani et al., 2006).

Embora vários estudos tenham investigado as propriedades biológicas deste cimento quanto à citotoxicidade (Key et al., 2006; Susini et al., 2006; Eldeniz et al., 2007; Lodiene et al., 2008; Al-Hiyasat et al., 2010) e biocompatibilidade tecidual (Sousa et al., 2006; Onay et al., 2007; de Campos-Pinto et al., 2008; Garcia Lda et al., 2010), até o momento nenhum estudo se propôs analisar a relação entre fenótipo de macrófagos presentes na região de implantação e o padrão de reparo tecidual promovido por este material em subcutâneo de ratos. A importância de se analisar este tipo celular em testes subcutâneos, reside no fato de que os macrófagos predominam no infiltrado inflamatório em resposta à implantação de cimentos endodônticos (de Oliveira Mendes et al., 2003). Estes participam tanto da fase inflamatória, onde predominam atividades inflamatórias e/ou citotóxicas, como na fase tardia em

que predominam atividades anti-inflamatórias e regeneração tecidual (Stout et al., 2005; Rezende et al., 2007; Brown et al., 2009; de Oliveira Mendes et al., 2010).

Na última década, alguns pesquisadores relataram a hipótese de que os macrófagos se desenvolvem em dois grandes subgrupos funcionais, chamados M1 e M2, os quais desempenham padrões inflamatórios *versus* anti-inflamatórios (Stout et al., 2005; Laskin, 2009). Esses subtipos podem ser encontrados simultaneamente no tecido, mas geralmente a predominância de M1 está associada a uma reação inflamatória de maior porte e liberação de mediadores pró-inflamatórios (Rezende et al., 2007), além de participarem da destruição e reorganização da matriz extracelular (Kou & Babensee, 2011). O subtipo M2 tem caráter anti-inflamatório e modulatório participando da remodelação tecidual, angiogênese e reparo (Deonarine et al., 2007).

Apesar da importância da composição dos biomateriais na atividade dos macrófagos (Bhardwaj et al., 1997; Brown et al., 2009) apenas alguns estudos avaliaram *in vitro* os efeitos de cimentos endodônticos sobre a atividade dessas células (de Oliveira Mendes et al., 2003; Rezende et al., 2007; de Oliveira Mendes et al., 2010), já que podem influenciar a magnitude, o tipo e duração da resposta inflamatória imune (Bhardwaj et al., 1997). Além disso, fenótipos funcionais de macrófagos podem ser alterados em consequência da alteração em seu micro-ambiente (Stout et al., 2005; Laskin, 2009), como por exemplo, as propriedades dos materiais (Bhardwaj et al., 1997; de Oliveira Mendes et al., 2003; Rezende et al., 2007; Brown et al., 2009; de Oliveira Mendes et al., 2010).

Diante disso, o presente estudo objetivou avaliar a reação tecidual provocada pelo cimento Epiphany, tendo como padrão de comparação outro cimento resinoso, Sealer 26® (Dentsply Ind. And Com. Ltda,- Petrópolis- RJ, Brasil), o qual é um cimento endodôntico à base de resina epóxica, contendo óxido de bismuto e hidróxido de cálcio (Tanomaru-Filho et al., 2006). Devido à toxicidade inicial que cimentos apresentam antes de tomarem presa, optou-se por avaliar o efeito desses materiais recém-manipulados, analisando também a

presença de macrófagos M1 de acordo com tipo de cimento, e a relação entre subtipo de macrófagos M1 e o reparo tecidual.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cimentos Endodônticos – Endodontia Contemporânea

A terapia endodôntica tem como objetivo realizar a adequada limpeza e modelagem do sistema de canais radiculares, possibilitando assim, uma obturação o mais hermética possível. Para este propósito, têm-se utilizado materiais de preenchimento como cones de guta-percha ou cones de resina sintética termoplástica (Resilon) associados a cimentos endodônticos, os quais devem possuir adequadas propriedades físicas, químicas e biológicas (Leonardo et al., 2008).

Os materiais obturadores endodônticos devem apresentar vários requisitos biológicos, dentre os quais podemos citar: apresentar boa tolerância tecidual, ser reabsorvido no periápice em casos de extravasamentos acidentais, estimular ou permitir a deposição de tecido mineralizado no nível do ápice, ter ação antimicrobiana e não desencadear resposta imune nos tecidos apicais e periapicais (Leonardo, 2005; Bernardes et al., 2010). Já, quanto às propriedades físicas, deve ser de fácil manipulação e inserção, apresentar-se plástico no momento da inserção e tornando-se sólidos posteriormente, possuir bom tempo de trabalho, não deve sofrer contrações e nem ser permeável, deve apresentar bom escoamento, viscosidade e aderência, não ser solubilizado dentro do canal radicular, possuir pH próximo ao neutro, ser radiopaco, não manchar as estruturas dentais, ser passível de esterilização e ser de fácil remoção (Leonardo, 2005; Schwartz, 2006; Desai & Chandler, 2009).

Os cimentos endodônticos mais freqüentemente utilizados na prática clínica são os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, ionômero de vidro, os que contêm hidróxido de cálcio, à base de resina, silicone e, mais recentemente, à base de agregado trióxido mineral (Zmener et al., 2005; Bernardes et al., 2010).

Os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol foram bastante utilizados durante muitas décadas, apesar de não apresentar uma resposta biológica favorável como demonstrado em estudos *in vitro* (Guigand et al.,

1999) e *in vivo* (Barbosa et al., 1993; Mittal & Chandra, 1995; Figueiredo et al., 2001; Zmener et al., 2010). A baixa tolerância tecidual desse cimento provavelmente está relacionada à lenta e prolongada liberação de eugenol (Kolokouris et al., 1998; Hauman & Love, 2003b; Kaplan et al., 2003). O efeito irritante do eugenol pode estar relacionado à sua capacidade de penetração nas células, causando desnaturação protéica, levando a uma subsequente perda da função e desintegração celular (Kozam & Mantell, 1978; Silva et al., 1997). Além disso, os íons zinco parece ser a causa secundária dessa atividade deletéria (Economides et al., 1995).

Na tentativa constante de obter um melhor resultado biológico após o tratamento, cimentos à base de óxido de zinco e eugenol foram substituídos pelos cimentos que continham hidróxido de cálcio (Leonardo et al., 1997; Silva et al., 1997), os quais têm sido amplamente empregados. O hidróxido de cálcio possui inúmeras propriedades entre elas, a atividade antimicrobiana devido ao seu alto pH (Hauman & Love, 2003a) e a capacidade de estimular ou promover reparo através de formação de tecido mineralizado (Seux et al., 1991; Economides et al., 1995). Para que esses cimentos tenham efetividade terapêutica, o hidróxido de cálcio deve ser dissociado em íons Ca^{2+} e OH^- , devendo ser liberados ao longo do tempo (Hauman & Love, 2003b). Porém, essa liberação de 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 entanto, os mecanismos reais pelos quais o hidróxido de cálcio irá agir nos tecidos circundantes ainda não está claro (Economides et al., 1995). No geral, esses cimentos apresentam boa citocompatibilidade (Mittal & Chandra, 1995; Kolokouris et al., 1998; Ersev et al., 1999; Gomes-Filho et al., 2007)

Sealer 26® também é um cimento endodôntico que contém hidróxido de cálcio, porém com base resinosa, cuja modificação em sua fórmula é baseada na substituição da prata da fórmula original (AH 26) pelo hidróxido de cálcio (Batista et al., 2007). Sealer 26 é composto de resina

epóxica, óxido de bismuto e hidróxido de cálcio (Tanomaru-Filho et al., 2006), sendo conhecido por suas excelentes propriedades de selamento, quando usado como material obturador de canais (Siqueira et al., 2001b) ou retro-obturador (Siqueira et al., 2001a). Além disso, possui ótima capacidade de prevenir microinfiltração bacteriana (Siqueira et al., 1999; Siqueira et al., 2001a), boa radiopacidade (Tanomaru-Filho et al., 2008), baixa solubilidade quando comparados ao CRCS e Sealapex (Fidel et al., 1994) e menor capacidade antimicrobiana quando comparado aos cimentos Endomethazone, Endomethazone N, AH Plus e Endofill (Gomes et al., 2004).

Em testes de citotoxicidade, Sealer 26 demonstrou resultados bastante satisfatórios onde foi considerado o menos tóxico entre os materiais testados por não liberar quantidades significantes de substâncias tóxicas (Barbosa et al., 1993).

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.

Além dos cimentos à base de resina epóxica como Sealer 26 e AH Plus, os cimentos resinosos também incluem cimentos à base de metacrilato (Epiphany®), polivinil (Diaket-A®, ESPE-Premier, Norristown, EUA) e polidimetilsiloxano (Roeko-Seal®, Langenau, Germany) (Hauman & Love, 2003b).

Em geral, os cimentos resinosos apresentam adequadas propriedades, como bom escoamento e tempo de presa (Versiani et al., 2006), radiopacidade (Carvalho-Junior et al., 2007), resistência adesiva (Eldeniz et al.,

2005), baixa microinfiltração coronária (Kim et al., 2010) e boa compatibilidade tecidual (Leonardo et al., 1999).

Segundo Kim et al. (2010), os cimentos à base de resinas metacrilato podem ser divididos em 4 gerações: Hydron® (Hydron Technologies, Inc, Pompano Beach, FL) pertence à primeira geração e surgiu em meados da década de 70; EndoRez® (Ultradent Products Inc, South Jordan, UT) que é um cimento hidrofílico dual da segunda geração; FibreFill R.C.S (Pentron Clinical Technologies, Wallingford, CT), Epiphany ou RealSeal (SybronEndo, Orange, CA) os quais são auto-condicionantes da terceira geração; e por fim, os cimentos MetaSeal (Parkell Inc) ou RealSeal SE (SybronEndo) os quais são auto-adesivos.

Entre os cimentos classificados, definidos da terceira geração, podemos citar o Epiphany, que tem ganhado considerável popularidade entre endodontistas e clínicos gerais (Shipper et al., 2004; de Oliveira et al., 2006), devido às suas características hidrofílicas que os possibilitam penetrar nos túbulos dentinários (Zmener et al., 2008), sua adesividade à dentina radicular através do uso de primers auto-condicionantes e aos materiais obturadores (Shipper et al., 2004). Este apresenta uma matriz constituída por uma mistura de bisfenol A metacrilato glicídico, etoxilato Bis-GMA uretano de metacrilato e metacrilatos hidrofílicos (Teixeira et al., 2004). No entanto, alguns estudos demonstraram que alguns destes cimentos à base de resina, apresentaram toxicidade e mutagenicidade (Huang et al., 2002; Hauman & Love, 2003b).

Porém, foi lançado como um sistema formado por um polímero de resina sintética termoplástica (Shipper et al., 2004) denominado Resilon® (Pentron clinical Technologies, LLC, Wallingford, CT, EUA), associado ao cimento polimerização dual e um primer auto-condicionante.

A combinação Resilon-Epiphany forma rapidamente um bloco único ou monobloco no interior do canal radicular (Shipper et al., 2004), interage quimicamente com a dentina formando um monobloco de resina que se adere às paredes do canal radicular por meio de tags intratubulares (Ezzie et al., 2006; Versiani et al., 2006). Quanto às suas propriedades físicas, Souza et al. (2009), constataram que Epiphany apresentou alto escoamento, baixa

resistência adesiva à dentina e maior stress de polimerização que AH Plus. Estudos prévios têm verificado que o monobloco Resilon-Epiphany apresenta significativamente menor microinfiltração que a guta-percha (Shipper et al., 2004; Shipper et al., 2005), além de uma melhor expansão flexural e ser removido por meio de solventes ou calor (Ezzie et al., 2006). Canais obturados com Resilon-Epiphany também têm mostrado serem mais resistentes à fratura quando comparados àqueles obturados com guta-percha (Teixeira et al., 2004). No entanto, outros estudos verificaram que a adesão deste sistema à dentina radicular não foi superior quando comparado a outros tipos de cimentos resinosos (Gesi et al., 2005; Ungor et al., 2006; Ribeiro et al., 2008), além de apresentar baixa resistência adesiva ao Resilon (Hiraishi et al., 2005). Adicionalmente, outros autores concluíram que nenhuma das associações guta-percha com o cimento AH Plus ou Resilon com Epiphany proporcionaram um selamento apical completamente hermético, embora tenham sugerido que uma vantagem do uso de Resilon-Epiphany é o seu imediato selamento coronal, devido à sua característica de polimerização dual (Tay et al., 2005).

Em um estudo recente, Epiphany foi associada a uma menor quantidade de periodontite apical (Shipper et al., 2005; Leonardo et al., 2007), o que pode estar associado à maior resistência à microinfiltração coronária (Shipper et al., 2004). A alta liberação de cálcio pelo Epiphany também pode explicar a redução da periodontite apical observada clinicamente (Shipper et al., 2005). Além disso, a liberação de íons cálcio tem demonstrado favorecer um pH mais alcalino do meio levando a efeitos bioquímicos que culminam na aceleração do processo de reparo (Seux et al., 1991).

Imai & Komabayashi (2003) apontam como uma desvantagem desse sistema a possível dificuldade de retratamento nesses casos, porém outros estudos não apontaram tal dificuldade demonstrando boa efetividade de remoção (de Oliveira et al., 2006; Ezzie et al., 2006).

Mais recentemente, versões auto-adesivas (“self-adhesive”) desses cimentos têm sido introduzidas a fim de eliminar a aplicação do primer (Resende et al., 2009), permitindo facilitar e agilizar o uso.

Em testes iniciais de citotoxicidade, realizados por diversos autores (Key et al., 2006; Eldeniz et al., 2007; Lodiene et al., 2008; Al-Hiyasat et al., 2010), o cimento Epiphany exibiu respostas severas de toxicidade em todos intervalos de tempo, o que pode ser explicado pela liberação de altas quantidades de componentes resinosos para o meio de cultura (Wataha et al., 2003; Eldeniz et al., 2007). No entanto, segundo o fabricante, este cimento não é mutagênico nem citotóxico, é absorvível e conseqüentemente menos irritante que as resinas epóxicas convencionais e cimentos de óxido de zinco e eugenol. Outro fator que poderia contribuir para a alta toxicidade desses cimentos seria a liberação de partículas de carga do cimento resultantes de sua degradação (Versiani 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

O termo biocompatibilidade refere-se ao conjunto de propriedades desejáveis a um material que será inserido em um organismo vivo, como por exemplo, os materiais obturadores e retro-obturadores. A biocompatibilidade abrange vários aspectos do material, incluindo seu potencial citotóxico, alergênico e mutagênico, não devendo apresentar efeitos tóxicos ou causar danos teciduais (Costa, 2001). Está relacionado a vários fatores sendo a composição e estabilidade, de extrema importância.

Os materiais que preenchem os requisitos biológicos são denominados biomateriais, termo que se refere a qualquer substância que possa ser usada por qualquer período de tempo como parte de um sistema e que objetive o tratamento ou a reposição de qualquer tecido, órgão ou função do corpo (Anusavice, 2005). Poucos materiais odontológicos, ou talvez nenhum, são totalmente inertes sob ponto de vista fisiológico, visto que a

grande maioria pode apresentar em sua composição alguns componentes com potenciais tóxicos ou irritantes. Adicionalmente, as reações químicas que ocorrem durante a presa do material podem também produzir efeitos indesejáveis (Anusavice, 2005). Embora esses materiais sejam geralmente referidos como biomateriais, nem sempre apresentam todos os requisitos para essa classificação.

Para a verificação das características citadas anteriormente, os materiais de uso odontológico devem ser submetidos a testes específicos (Schmalz, 2002), os quais se baseiam nas recomendações da *International Organization for Standardization* (ISO) e a *American National Standards Institute/American Dental Association* – ANSI/ADA (1972; 1997). Os testes de biocompatibilidade propostos por estes órgãos reguladores baseiam-se em uma seqüência de protocolos de pesquisa e possuem como objetivo final determinar *in vitro* e *in vivo*, a segurança de aplicação clínica dos materiais teste em seres humanos (Costa, 2001).

Estes testes podem ser de três níveis: testes iniciais, testes secundários e testes de aplicação. Os testes iniciais pertencem ao primeiro nível, e determinam de maneira preliminar, o comportamento biológico de materiais e de seus componentes de modo a simular as reações biológicas desencadeadas pelos materiais quando são colocados em ou dentro dos tecidos do corpo (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 de citotoxicidade são os mais comumente utilizados para esta finalidade e oferecem a oportunidade de estudar a toxicidade promovida pelo material diretamente ou através da liberação de seus componentes (Hauman & Love, 2003a). São considerados rápidos, baratos e reprodutíveis (Rezende et al., 2005).

Existem vários métodos disponíveis para avaliar a citotoxicidade de um material odontológico como, por exemplo, o estudo das reações celulares provocadas por cimentos endodônticos e dos mediadores liberados pelas

células após o contato (Rezende et al., 2005). Estes testes podem ser realizados em células obtidas de linhagem (Susini et al., 2006) ou de cultura primária (Eldeniz et al., 2007), o que inevitavelmente influi nos resultados. Embora sejam testes de extrema importância, auxiliando na determinação da citotoxicidade e compreensão dos mecanismos biológicos desenvolvidos pelos cimentos, seus resultados não podem ser extrapolados para condições clínicas (Costa, 2001).

De acordo com Spangberg & Langeland (1973), quando um material for considerado tóxico *in vitro*, sempre causará irritação tissular, entretanto, uma baixa toxicidade *in vitro* não implica em baixa irritação tecidual *in vivo*, pois há muitos fatores envolvidos como a reabsorbilidade, solubilidade nos tecidos, fragmentação pelos fagócitos ou até reação inflamatória induzida.

Desta forma, é fundamental a execução dos testes secundários os quais são realizados em animais de pequeno porte como roedores. 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, 2005).

No terceiro nível, estão os testes de aplicação que envolve o uso de animais, principalmente cães (Torabinejad et al., 1995; Leonardo et al., 1999) ou macacos (Torabinejad et al., 1997; Bernath & Szabo, 2003), onde os canais radiculares são preenchidos até a junção cimento-dentina ou são deliberadamente extruídos para determinar a reação do tecido periapical (Hauman & Love, 2003a). No entanto, são testes 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, estudos clínicos retrospectivos ou prospectivos controlados (Hauman & Love, 2003a).

Diante do exposto, nota-se a importância dos testes biológicos, visto que um material para ser usado na cavidade oral deve ser atóxico, não absorvível pelo sistema circulatório e não deve provocar danos nos tecidos orais. Materiais não biocompatíveis podem mostrar-se mutagênicos ou ainda influenciar na expressão e secreção de mediadores da inflamação causando reações locais e mesmo sistêmicas (Schmalz, 1997; Geurtsen, 2001; Anusavice, 2005).

No entanto, apesar de a análise da biocompatibilidade ser um pré-requisito para o uso clínico de materiais dentários, ainda não foram realizados testes básicos na maioria dos materiais odontológicos (Sousa et al., 2006). Tendo em vista que os materiais à base de resinas encontram-se em constante desenvolvimento, é crescente a preocupação quanto às suas propriedades biológicas, o que têm estimulado sua avaliação.

2.3 Implante subcutâneo

Os testes secundários avaliam a potencialidade de um material odontológico gerar toxicidade sistêmica e à inalação, irritação e sensibilidade na pele, e reação em tecido conjuntivo subcutâneo (Anusavice, 1998). Dentre estes, os implantes intraósseos ou conjuntivos são os mais utilizados, sendo considerados testes válidos nas etapas preliminares da pesquisa da histocompatibilidade de diversos materiais (ADA, 1972), como os utilizados na obturação dos canais radiculares.

No entanto, diferentes variações metodológicas foram descritas para avaliar a biocompatibilidade dos materiais endodônticos. A injeção do material a ser testado diretamente no tecido subcutâneo (Yesilsoy et al., 1988; Mittal & Chandra, 1995) ou no peritônio de roedores (Silva et al., 1997) é um método reconhecido na avaliação da biocompatibilidade, apresentando inconvenientes como a capacidade de dispersão dos mesmos, gerando respostas mais amplas do que o esperado pelo contato com a região periapical.

O uso de técnicas de implantação *in vivo* permite que sejam consideradas as características físicas do produto, como forma, densidade e

dureza, as quais podem influenciar na caracterização da reação tecidual apresentada (Anusavice, 1998). Desta forma, implantes no conjuntivo subcutâneo realizados com materiais “a fresco”, logo após sua manipulação, podem desencadear respostas diferentes das produzidas pelo material após a presa (Pertot et al., 1992).

Os implantes de materiais contidos no interior 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; Molloy et al., 1992; Costa, 2003; de Campos-Pinto et al., 2008; Scarparo et al., 2009), silicone (Zmener et al., 1990; Zmener et al., 2005; de Oliveira et al., 2010; Zmener et al., 2010), e até mesmo em tubos produzidos a partir de dentina humana (Mauricio, 1980; Gomes-Filho et al., 2008; Garcia Lda et al., 2010) são descritos na literatura. Implantes realizados diretamente no tecido ósseo também são utilizados, principalmente na análise de materiais retro-obturadores (Pertot et al., 1992).

O implante de cápsulas de colágeno contendo o material a ser avaliado (Zambuzzi et al., 2006) 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 (Holland et al., 1999; Holland et al., 2002; Gomes-Filho et al., 2008), utilizados desde 1928, , apresentam boa tolerância tecidual. Este método utiliza raízes dentais humanas autoclavadas (Holland et al., 2002; Gomes-Filho et al., 2008) buscando mimetizar condições clínicas. 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 (Makkes et al., 1977). Segundo Yaltirik et al. (2004), este modelo também permite simular condições clínicas, estabilizar a posição do material e padronizar a interface cimento-tecido. Esta técnica de implantação tem sido usada em inúmeros trabalhos (Leal et al.,

1988; Costa, 1997; Nassri et al., 2003; Onay et al., 2007; Scarparo et al., 2009; Garcia Lda et al., 2010) onde comprovaram que provoca pouca ou nenhuma inflamação tecidual, permitindo avaliar a reação promovida na interface cimento/tecido, a qual é classificada de acordo com a intensidade e duração da inflamação promovida pelos materiais.

A reação aos materiais implantados é classificada como aguda ou crônica, e subdividida em leve, moderada, severa ou ausente. Porém, existe 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 e inflamação

Embora idealmente a obturação deva ficar contida no interior do sistema de canais radiculares, obedecendo aos limites da junção cimento-dentina-canal (Siqueira, 2005), nem sempre se consegue atingir tal objetivo. Ao extravasar ou ultrapassar o limite em um a dois milímetros além do ápice radicular, o material obturador entra em contato com o tecido conjuntivo presente no peridonto (Bernath & Szabo, 2003), local onde reside uma enorme quantidade de fibroblastos e células de defesa (Siqueira, 2005). Os componentes químicos dos cimentos, em contato com o conjuntivo da região periapical desencadeiam o início de uma resposta imunológica inata, caracterizada pela presença de um infiltrado inflamatório geralmente transiente (Sjogren et al., 1997). A persistência da reação inflamatória local é indesejável, podendo ocasionar dor local, edema, desintegração da matriz extracelular e atraso no processo de reparo (Mittal & Chandra, 1995; Huang et al., 2005).

Deste modo, o tecido perirradicular é tal como um tecido conjuntivo que apresenta diversos tipos de células como fibroblastos, macrófagos,

mastócitos, plasmócitos, células adiposas e leucócitos, separadas por um abundante material extracelular na qual se encontram vasos sanguíneos e linfáticos (Junqueira & Carneiro, 2004).

Os fibroblastos sintetizam as fibras colágenas, reticulares e elásticas além das glicoproteínas e proteoglicanas da matriz extracelular (Junqueira & Carneiro, 2004). Porém, também podem participar da resposta imune desencadeada pela presença de um agente estranho como, por exemplo, um cimento endodôntico (Azar et al., 2000).

Os mástocitos são células residentes do tecido conjuntivo, que se caracterizam por apresentar o citoplasma repleto de grânulos que se coram intensamente (Junqueira & Carneiro, 2004), os quais contêm mediadores químicos importantes para o processo inflamatório, como vasodilatadores (Consolaro, 2009). São células que desempenham importante função nas reações inflamatórias agudas e persistentes (Cotran et al., 2000), assim como na hipersensibilidade imediata e nas doenças alérgicas (Abbas et al., 2002). Essas células também participam no processo de reparação de feridas onde estimulam a proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno (Jordana, 1993; Garbuzenko et al., 2002).

Os neutrófilos e macrófagos são células residentes do tecido conjuntivo, embora aí permaneçam em constante vigília para que a resposta imune seja rápida e efetiva ao encontrar o agente agressor (Kou & Babensee, 2011). Ambas provêm da corrente sanguínea, sendo que os macrófagos diferenciam-se a partir dos monócitos. Os neutrófilos fazem parte da primeira linha de defesa, atuando na fagocitose e também na liberação de mediadores quimiotáticos, que irão recrutar mais neutrófilos ou outras células como linfócitos e monócitos para o conjuntivo (Consolaro, 2009; Kou & Babensee, 2011). Os monócitos/macrófagos também são importantes fagócitos presentes no conjuntivo, sendo as células predominantes na interface material/tecido (Kawashima et al., 1996; Bhardwaj et al., 1997), além de desempenharem um papel importante na imunomodulação e apresentação de antígenos a outras células de defesa que migram para a região frente a estímulos (Mantovani et al., 2004; Fujiwara & Kobayashi, 2005).

Alguns estudos mostraram que os macrófagos possuem importante papel no desenvolvimento e reparo das lesões periapicais (Kawashima et al., 1996; Toriya et al., 1997). Segura & Jimenez-Rubio (1998) observaram que o eugenol, liberado por cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, pode inibir a função dos macrófagos além de poder influenciar na reparação inflamatória no tecido periapical. Um estudo realizado recentemente (de Oliveira Mendes et al., 2010), demonstrou que cimentos endodônticos podem afetar negativamente a resposta imune *in vitro*, podendo inibir a atividade de macrófagos (de Oliveira Mendes et al., 2003).

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”. De maneira geral, pode-se definir inflamação como uma reação defensiva, celular e vascular contra elementos estranhos que possam vir a penetrar no tecido conjuntivo ou algum tipo de substância química que possa agredir e irritar este tecido (Junqueira & Carneiro, 2004; Fujiwara & Kobayashi, 2005).

Esta se caracteriza por uma série de reações celulares que levam à coagulação sanguínea, ativação plaquetária, infiltrado celular inflamatório, formação de tecido de granulação, que em fases posteriores apresentará deposição de uma nova matriz extracelular, seguido por contração da ferida e remodelação (Diegelmann & Evans, 2004). Deste modo, a inflamação visa destruir, diluir ou circunscrever o agente agressor, conduzindo ao processo de reparo tecidual (Baumann & Gauldie, 1994). Em situações patológicas, a inflamação pode resultar em destruição tecidual e levar à perda da função (Fujiwara & Kobayashi, 2005).

Sob ponto de vista cronológico, as reações que ocorrem no tecido conjuntivo inflamado são caracterizadas pela chegada de neutrófilos, os quais se tornam predominantes dentro de 24 horas e são responsáveis por remover material estranho, bactérias e matriz danificada (Diegelmann & Evans, 2004). Em até 48 horas, os macrófagos chegam ao local, onde além de produzirem citocinas e fatores de crescimento (Cotran et al., 2000), também possuem

importante papel no desbridamento, atuando como fagócitos para limpar restos da matriz (Fujiwara & Kobayashi, 2005). O final da fase inflamatória e o começo da fase proliferativa é marcada pelo aparecimento dos macrófagos ativados e linfócitos (Deonarine et al., 2007).

Na fase proliferativa há produção de colágeno, proteoglicanas e fibronectina para formar uma nova matriz extracelular, continuar a epitelização e angiogênese. Os fibroblastos são as células predominantes nesta fase onde produzem matriz e colágeno (Deonarine et al., 2007). Finalmente, a remodelação, fase final do reparo, envolve a degradação do colágeno por enzimas proteolíticas produzidas pelos fibroblastos, neutrófilos e macrófagos. Outra característica seria a presença de mastócitos, os quais gerenciam o reparo por meio de uma maior sinalização inflamatória (Diegelmann & Evans, 2004).

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, os quais são mediadores responsáveis pela migração e proliferação de células de reparo como 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).

Cabe ressaltar a presença persistente dos macrófagos nos sítios inflamados, seja na fase aguda ou crônica, e mesmo durante a fase reparatória

(de Oliveira Mendes et al., 2003; Rezende et al., 2007). Tal fato chamou a atenção dos pesquisadores na última década, os quais estabeleceram inicialmente o conceito de macrófagos ativados e não ativados (Celada & Nathan, 1994). Porém, após diversos estudos, foi comprovado que se tratava da mesma célula com um perfil de ativação gênica diferente (Stout et al., 2005). Em outras palavras, o conjunto de genes expressos pelos macrófagos modificava-se em função do ambiente, possuindo características mais inflamatórias, ou relacionadas à liberação de mediadores ligados ao reparo (Stout et al., 2005). Postulou-se então, a existência de dois grandes subgrupos de macrófagos, chamados M1 e M2, sendo os do tipo M1 ligados à fase inflamatória (Stout et al., 2005). Tal conhecimento tem-se refletido na forma de avaliar a biocompatibilidade dos materiais, já que o tipo de macrófago presente está relacionado à manutenção do processo inflamatório ou sua evolução para o reparo (Kou & Babensee, 2011).

2.5 Papel dos macrófagos no padrão de resposta – subtipos de macrófago

Diante de um quadro de inflamação, há intensa migração de monócitos, os quais apresentam um aumento considerável nas primeiras horas, podendo permanecer elevado até a resolução da inflamação (de Oliveira Mendes, 2007). Estes são potentes produtores de citocinas e fatores de crescimento e desempenham importante papel na autoimunidade, defesa contra infecção, câncer, reparo tecidual, remodelação tecidual e angiogênese (Deonarine et al., 2007). Pode-se fazer uma distinção inicial entre macrófagos inflamatórios e macrófagos residentes, baseada no aumento da capacidade fagocítica e aumento da habilidade de gerar metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio (Fujiwara & Kobayashi, 2005).

Porém, os macrófagos ditos inflamatórios são melhor compreendidos pelo termo “macrófagos ativados” o qual descreve o estado em que esta célula sofre uma série de alterações morfológicas e metabólicas,

como aumento da capacidade fagocítica, bactericida e citotóxica, aumento do conteúdo enzimático e secreção de produtos biologicamente ativos (Mosser, 2003; Fujiwara & Kobayashi, 2005), atraindo leucócitos e estimulando a atividade de outras células. Podem se fundir formando as células gigantes multinucleadas (Fujiwara & Kobayashi, 2005). São os maiores constituintes de lesões periapicais e seu estado de ativação pode persistir por longos períodos após a remoção do fator irritante, podendo atrasar a resolução e reparo da lesão (Metzger, 2000; Berbert et al., 2002).

No entanto, esta classificação foi refeita, e hoje se considera não apenas os macrófagos ativados ou não, mas uma subdivisão em função do seu padrão de ativação gênica, dos mecanismos moleculares envolvidos na inflamação e reparo (Mosser, 2003; Rezende et al., 2005; Kou & Babensee, 2011). Trata-se dos macrófagos M1 e M2 (Mantovani et al., 2002; Kou & Babensee, 2011).

Os macrófagos do tipo M1 são fagócitos potentes, considerados importantes na inflamação. Estes são ativados pela via clássica desenvolvida em resposta a $\text{TNF-}\alpha$, juntamente com produtos microbianos como lipopolissacarídeo - LPS (Mosser, 2003), sendo caracterizada pela alta capacidade de apresentar antígenos às células T, alta produção de radicais intermediários de nitrogênio (NO), e oxigênio (ROIs), alta produção de citocinas pró-inflamatórias IL-12 e IL-23 (Verreck et al., 2004; Kou & Babensee, 2011) e capacidade de matar células cancerígenas e microrganismos (Mantovani et al., 2004).

Os macrófagos M1 podem transformar-se em macrófagos M2, o que ocorre por meio de um programa distinto de ativação denominado de “ativação alternativa”(Gordon, 2003), induzidos pelas citocinas IL-4 e IL-13. A exposição a estas citocinas leva a um aumento de IL-10 e fatores de crescimento como $\text{TGF-}\beta$, associada a uma baixa produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL-1, TNF e IL-6 (de Oliveira Mendes, 2007; Kou & Babensee, 2011). Essas mudanças desempenham importante papel na resolução da inflamação, conduzindo a um aumento na síntese de mediadores importantes na remodelação tecidual, angiogênese e reparo (Laskin, 2009). Pode-se dizer que

estas mudanças são controladas pelo micro-ambiente no qual a célula se encontra, e possuem papel importante no restabelecimento da homeostasia (Celada & Nathan, 1994). Porém, é importante enfatizar que M1 e M2 apresentam dois extremos dentro de uma sequência contínua de ativação de genes relacionados à evolução do processo inflamatório (Stout et al., 2005). Dessa forma, dependendo do estímulo local durante o processo de reparo, M1 e M2 respondem diferentemente aos padrões de ativação e expressam programas metabólicos distintos (Mills et al., 2000; Mosser, 2003). Dentre os vários estímulos existentes pode-se citar a degradação de produtos do material, citocinas e agentes microbianos (Brown et al., 2009).

Deonarine et al. (2007), utilizando tecnologia de DNA microarrays, sugeriram que durante a fase inflamatória estão presentes os macrófagos do tipo 1 e 2, os quais sofrem uma alteração na expressão gênica durante a fase de reparo, passando a predominar os macrófagos do tipo 2. Segundo de Oliveira Mendes et al. (2010), M1 e M2 diferem quanto aos receptores de superfície da membrana, tipos de moléculas efetoras e citocinas produzidas. O metabolismo da arginina em macrófagos M1 é caracterizado por altos níveis de óxido nítrico sintase indutível (iNOS) resultando na produção de NO e citrulina. Os macrófagos M2 caracterizam-se pela presença de arginase, levando à produção de ornitina e uréia (Bogdan et al., 1991; Mosser, 2003).

Apesar da importância atribuída a esses subtipos de macrófagos no controle do processo inflamatório, poucos estudos têm avaliado a capacidade dos materiais odontológicos estimularem M1 ou M2, e qual sua relação com processo de reparo.

Na literatura, encontramos vários estudos que avaliaram *in vitro* o perfil de citocinas e viabilidade de macrófagos frente a cimentos endodônticos (de Oliveira Mendes et al., 2003; Perassi et al., 2004; Rezende et al., 2005; Melegari et al., 2006; Rezende et al., 2007), porém há poucos estudos (Rezende et al., 2005; Rezende et al., 2007; de Oliveira Mendes et al., 2010) que se propuseram avaliar o padrão de resposta de acordo com subtipo de macrófago e até o momento foi encontrado somente um relato (Brown et al., 2009) na literatura deste tipo de estudo *in vivo*, porém com outro tipo de

material. Dessa forma, avaliando a presença de macrófagos pró-inflamatórios e sua associação com a manutenção do processo ou reparo, podem contribuir na avaliação de cimentos endodônticos, constituindo um parâmetro adicional a ser avaliado ao se classificar a biocompatibilidade desses materiais.

PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivos:

- Avaliar histologicamente o padrão de resposta inflamatória aos cimentos Sealer 26 e Epiphany, recém-manipulados, nos períodos de 7, 14 e 21 dias.
- Analisar a presença do subtipo de macrófagos M1, de acordo com tipo de cimento e período experimental.
- Analisar a relação entre macrófagos M1 e reparo tecidual.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1 Animais

Foram utilizados neste estudo 21 ratos Wistar machos (*Rattus Norvegicus*), da mesma linhagem, adultos-jovens, pesando de 300 a 400 g, provenientes do Biotério Central da Unicamp. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas, devidamente identificadas, e foram alimentados com ração sólida comercial balanceada e água *ad libitum*. 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.

4.1.2 Cimentos Endodônticos

Os cimentos endodônticos analisados encontram-se na Tabela 1 e Figura 1.

Tabela 1. Composição dos cimentos endodônticos.

Cimentos Endodônticos	Composição química
Epiphany® –Soft Resin Endodontic Obturation System – (Pentron Clinical Technologies, Wallingford, USA)	Pasta- resinas UDMA (uretano de metacrilato), PEGMADMA, EBPADMA, BIS-GMA (bisfenol glicidilmetacrilato), sulfato de bário, sílica, hidróxido de cálcio, bismuto, aminas, peróxidos, fotoiniciados e pigmentos. Resilon primer- canforoquinona, água, AMPS, HEMA (hidroximetilmetacrilato), monômeros resinosos.
Sealer 26® (Dentsply Ind. And Com. Ltda,- Petrópolis- RJ, Brasil)	Hidróxido de cálcio, óxido de bismuto, dióxido de titânio, resina epóxica bisfenol, hexametileno tetraminico



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

Os cimentos foram manipulados de acordo com as recomendações de cada fabricante, utilizando placa de vidro e espátula estéreis. Porém, para o Epiphany, o primer não foi utilizado. Os cimentos endodônticos teste foram dispostos nas lojas cirúrgicas, de acordo com o esquema a seguir:

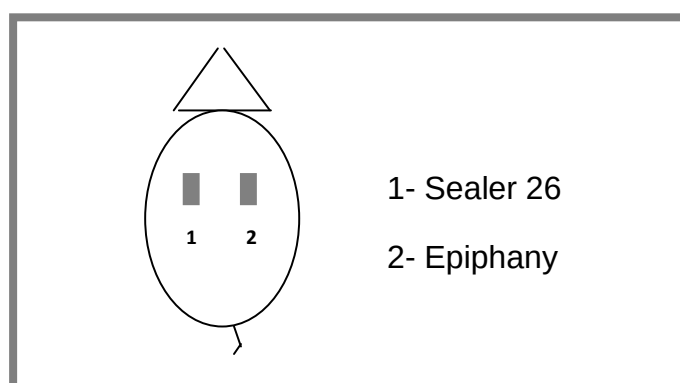


Figura 2. Demonstração da disposição dos cimentos nas lojas cirúrgicas

4.1.3 Corpos de Prova

Foram confeccionados 42 corpos de prova com dimensões de 0,6mm de diâmetro interno e 10 mm de comprimento, a partir de uma sonda uretral estéril (Embramed Ind. Com. Ltda- São Paulo-SP, Brasil). Os cimentos foram injetados no interior das sondas, com auxílio de uma seringa descartável de 5 ml para então serem cortados com uma lâmina de bisturi estéril nº 15

(Lamedid Ltda, Tamboré-SP, Brasil). As extremidades dos tubos permaneceram abertas, sendo que em uma das pontas, no momento da inserção dos corpos de prova em suas respectivas lojas cirúrgicas, completou-se com cimento, local em que estará em íntimo contato com o tecido adjacente e onde será observada a reação tecidual (figura 3). A lateral do tubo serviu como controle negativo do estudo. Os tubos foram posicionados de modo que a extremidade que continha a complementação era voltada para a cabeça do animal, permanecendo assim no lado oposto da incisão, para que a reação inflamatória formada na área da incisão não interferisse na análise microscópica da região onde foi colocado o cimento.

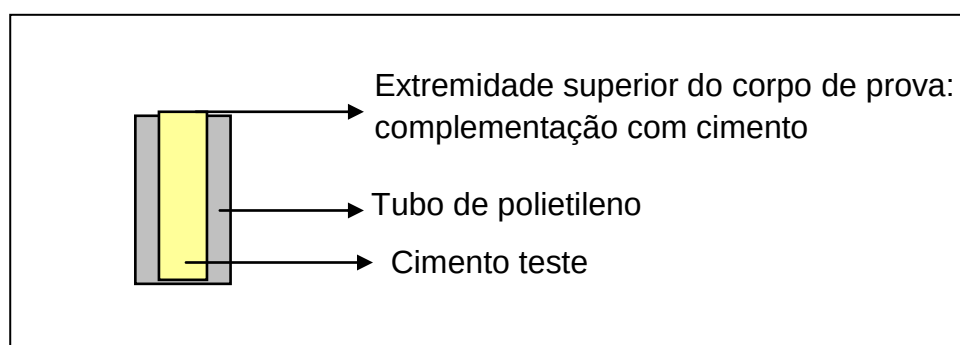


Figura 3. Esquema mostrando preenchimento dos tubos com os cimentos

4.2 Métodos

4.2.1 Da implantação subcutânea dos tubos

Foi realizada anestesia geral, via intra-peritoneal, com auxílio de seringas descartáveis de insulina de 1ml (BD Plastipak®, Becton Dickinson Ind. Cirúr. Ltda, Curitiba, Brasil). Utilizou-se o anestésico Cloridrato de Cetamina 10% (Cetamin®- Rhobifarma indústria farmacêutica Ltda), na dosagem 0,1ml/100gr/rato, associado ao cloridrato de xilazina 2% (Anasedan®- Vetbrands Saúde Animal) na dosagem 0,07ml/100gr/rato, o qual é um agente sedativo, relaxante muscular e analgésico. Após a administração anestésica, os animais foram mantidos em suas respectivas gaiolas individuais até que os mesmos estivessem devidamente sedados. Quando necessário,

complementou-se a anestesia. A demonstração da sequência cirúrgica encontra-se na figura 5.

Posteriormente, foi realizada a tricotomia manual na região dorsal dos animais a fim de evitar a penetração de pêlos nas lojas cirúrgicas e antissepsia do local com gaze embebida em digluconato de clorexidina 0,5%. Procedeu-se ao posicionamento do gabarito (figura 4) no dorso dos animais e foram feitas as marcações dos locais das duas incisões. Após, foram realizadas duas incisões escapulares de 1 cm de largura em cada animal com auxílio de uma tesoura romba, seguida por uma pequena divulsão com uma pinça hemostática reta, aprofundando-se 2 cm acima da linha da incisão, para confecção de 2 lojas cirúrgicas. Os corpos de prova, contendo os cimentos teste, foram inseridos cuidadosamente nas devidas lojas cirúrgicas, de acordo com a ordem estabelecida. Para esta finalidade, utilizou-se um porta-amálgama para que o corpo de prova fosse devidamente protegido durante sua inserção, evitando assim, quaisquer possíveis contaminações nas paredes laterais.

Todos os procedimentos foram realizados sob rigorosas condições de assepsia. As bordas da ferida foram fechadas com cianoacrilato de etila (Super Bonder, Loctite, Itapevi, SP, Brasil). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas individuais para que a ferida cirúrgica pudesse cicatrizar adequadamente. Além disso, os animais permaneceram sob constante observação diária, quanto à intercorrências que pudessem vir a acontecer, comprometendo assim, o experimento. Os animais não receberam medicação pós-operatória com o objetivo de não provocar possíveis alterações nos resultados.

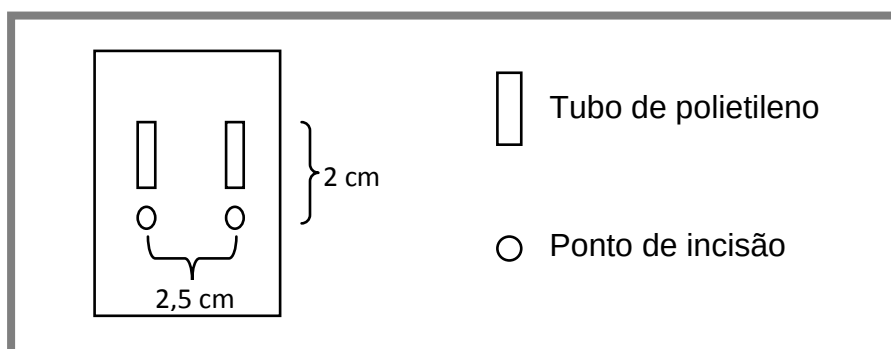


Figura 4. Gabarito contendo posicionamento exato das incisões

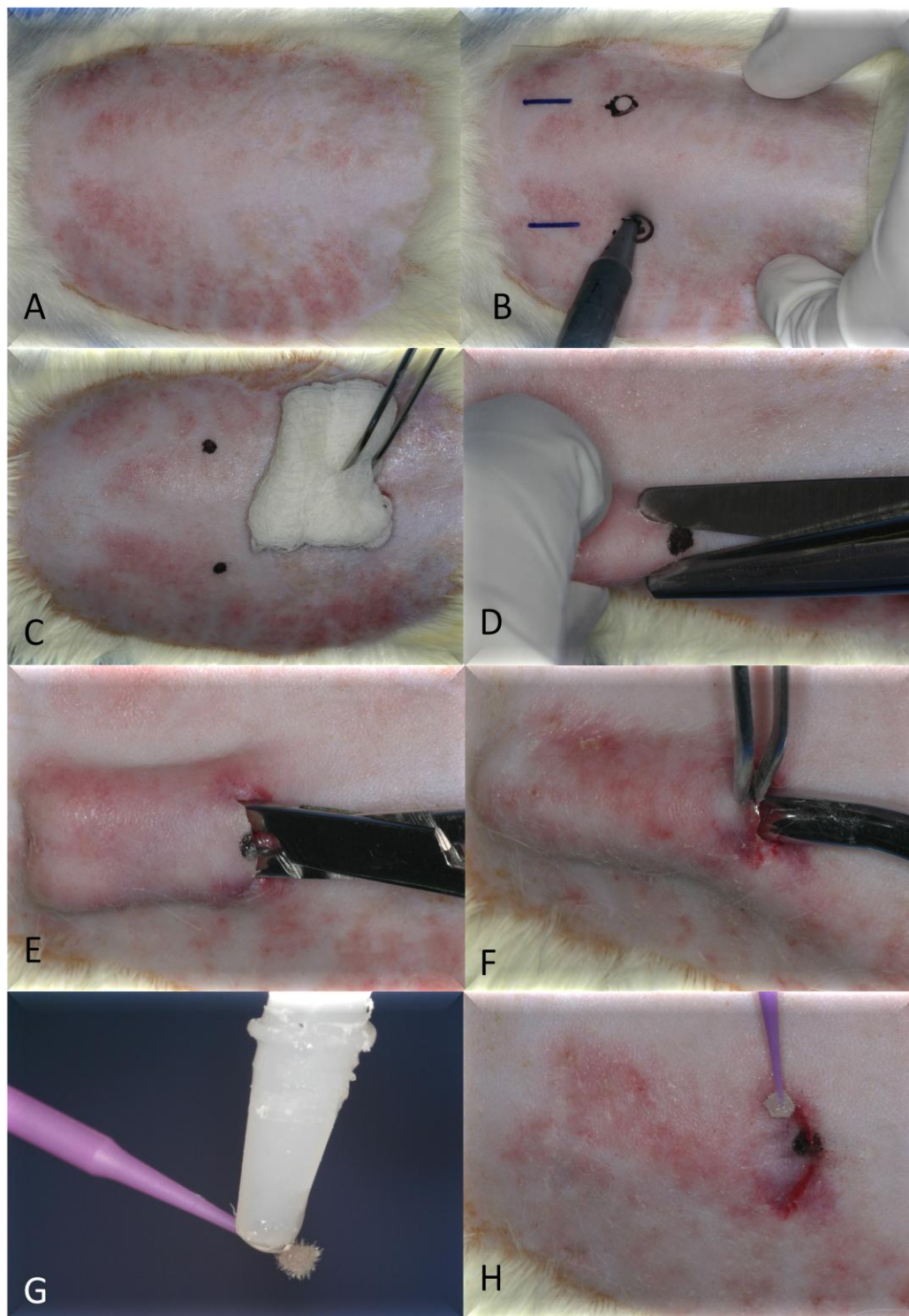


Figura 5. Sequência do procedimento cirúrgico. **A.** Tricotomia da região dorsal; **B.** Marcação das incisões; **C.** Antissepsia da área cirúrgica; **D.** Incisão; **E.** Divulsão; **F.** Inserção dos corpos de prova; **G.** Cianoacrilato de etila; **H.** Fechamento das bordas da ferida com cianoacrilato de etila

4.2.2. Sacrifício dos animais e remoção das peças cirúrgicas

Após os períodos de 7, 14 e 21 dias de implantação, foram sacrificados sete ratos, escolhidos aleatoriamente, para cada período, para que fossem feitas as análises. Para o sacrifício, os animais foram adequadamente pré-medicados e, em seguida, administrado uma overdose de tiopental de sódio (150 mg /kg).

A localização dos corpos de prova foi feita por meio de palpação e uma nova tricotomia foi realizada. As peças cirúrgicas foram removidas cuidadosamente, de tal modo que abrangesse tecido normal adjacente além da área a ser estudada (figura 6). Em seguida, foram fixadas com alfinete em placas de parafina para que a peça ficasse distendida facilitando assim, o processo de fixação.

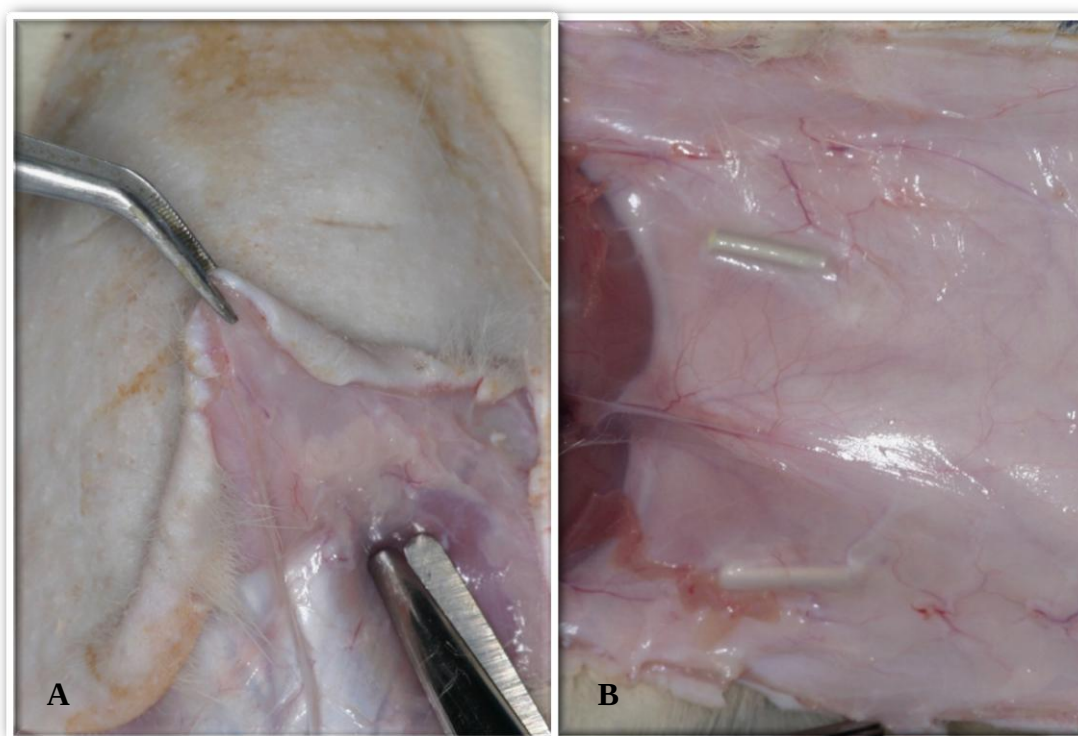


Figura 6. Remoção da peça cirúrgica. **A.** Dissecação do tecido para obtenção das peças cirúrgicas. **B.** Visualização dos corpos de prova

4.2.3. Processamento histológico

Os espécimes foram fixados em formol a 10% em PBS 0,1M, durante 48 horas, em seguida, o excesso de tecido foi removido, mantendo-se cerca de 3 mm em torno do implante. As amostras devidamente identificadas foram acondicionadas em grades para realização do processamento histológico em que foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. O espécime foi posicionado de forma que a face de corte do bloco ficasse paralelo ao longo eixo do implante (figura 7 A). Os cortes até a região do tubo de polietileno foram descartados, e, em seguida, o tubo foi cuidadosamente removido e o espaço por ele ocupado foi preenchido com parafina líquida. Após 24 horas, a microtomia (Micrótomo Leica RM 2145, Leica microsystems, Wetzlar, Germany) foi realizada, obtendo-se 20 cortes com 5µm de espessura, longitudinais à região do tubo, passando pela interface cimento endodôntico/tecido conjuntivo. Metade dos cortes foi corada em Hematoxilina e eosina (figura 7 B), para análise qualitativa ao microscópio de luz (ML- Olympus Optical Co. LTD, Brasil), segundo critérios apresentados a seguir. E a outra metade foi processada para imunohistoquímica.

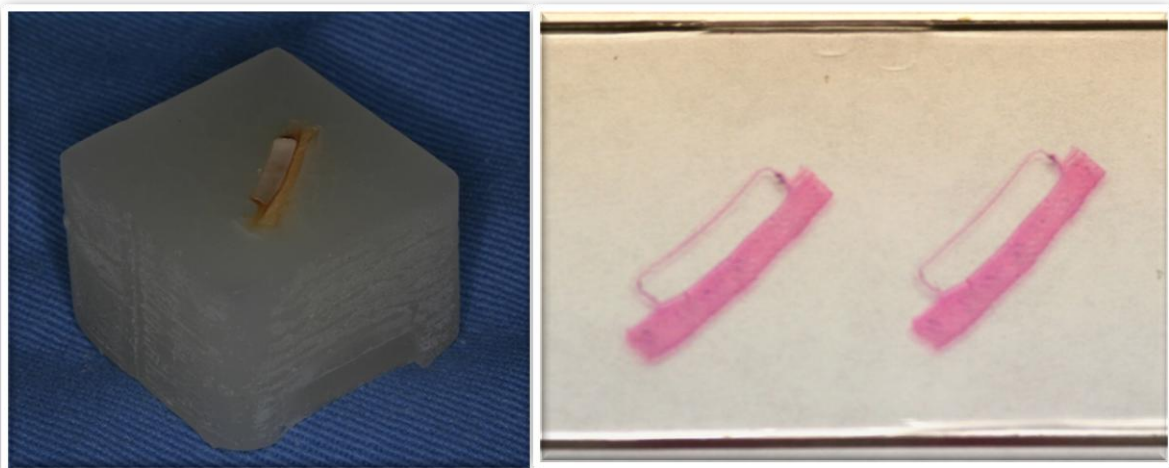


Figura 7. Demonstração inclusão das amostras em parafina e lâmina contendo cortes corados em HE.

4.2.4. Análise em HE

De acordo com as respostas teciduais observadas pelos cimentos testados, foram realizadas análises microscópicas das amostras, comparando-as entre si. Para a avaliação histopatológica, foi utilizado microscópio óptico, com conjunto ótico para aumentos de 20, 40, 100, 400 e 1000X. Para cada espécime, foram analisadas três lâminas histológicas, na interface cimento/tecido conjuntivo.

Foram avaliados, por meio de análise histopatológica descritiva, diferentes eventos microscópicos, tais como:

1. Tipo do infiltrado inflamatório.
2. Atividade fagocitária (macrófago e células gigantes multinucleadas).
3. Presença de necrose.
4. Material residual.
5. Presença de fibroblastos no local, compondo um tecido conjuntivo fibroso.

A intensidade da reação inflamatória foi estabelecida seguindo os critérios (FDI) descritos a seguir. E a partir destes, escores também foram atribuídos:

- 1- Ausente: Ausência de reação inflamatória.
- 2- Leve: Escassas células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo.
- 3- Moderada: Grande quantidade de células inflamatórias dispostas focalmente.
- 4- Severa: Grande quantidade de células inflamatórias difusas no tecido conjuntivo adjacente.

4.2.5 Avaliação Imunohistoquímica dos Macrófagos M1

As lâminas foram previamente silanizadas para realização da imunohistoquímica. A reação foi feita em cinco cortes de cada espécime, a fim de avaliar a presença de macrófagos iNOS positivos, fenótipo M1, em torno da interface implante/tecido conjuntivo de cada cimento avaliado. Estas foram desparafinizadas em xilol, re-hidratadas em álcool etílico, lavadas em PBS (pH 7,2), seguido por resgate antigênico, utilizando tripsina de pâncreas suína

0,25% (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e então, realizou-se a incubação em solução de H_2O_2 3% em metanol durante 1 hora em temperatura ambiente, para extinguir a atividade da peroxidase endógena. As lâminas foram lavadas novamente em PBS e incubadas com o Rodent Block R (Biocare Medical, Concord, CA, EUA) por 30 minutos para bloquear a ligação inespecífica do anticorpo primário, seguido por aplicação de uma mistura de XR Factor (Biocare) e anticorpo primário para M1 anti-iNOS, produzido em coelho na diluição de 1:80 (Neomarkers, Fremont, CA, EUA) por 1 hora. As lâminas foram visualizadas com cromógeno DAB (DAKO, Carpenter, Califórnia, EUA), contrastadas com hematoxilina, e montadas em Ervmount[®] (Erviagas, São Paulo, Brasil). Os controles negativos foram preparados pela substituição do anticorpo primário pelo PBS (figura 13 A, C)

A análise imunohistoquímica qualitativa e quantitativa foi realizada qualitativamente por um investigador experiente considerando-se o padrão de marcação para os macrófagos M1, e a quantidade de células marcadas por campo, para cada cimento e período experimental. Em cada corte foram capturadas imagens de cinco campo, utilizando um microscópio Nikon Eclipse E200 (Nikon Instruments Inc. New York, USA) conectado a uma câmera Evolution MP Color Camera (Media Cybernetics Inc. Bethesda, MD, USA) fazendo uso do programa Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics Inc. Bethesda, MD, USA). A quantidade de células imunopositivas (citoplasma corado com anticorpo primário anti-iNOS) foi analisada próxima à interface cimento/tecido conjuntivo, no aumento de 400 x, e contadas com auxílio do programa gratuito de análise de imagens ImageJ (desenvolvido por Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, Bethesda, EUA). A partir desses dados foi realizada a análise estatística do número de células iNOS positivas.

4.2.5.1 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5[®] (Graphpad software, LaJolla, CA, EUA). A normalidade da amostra foi testada por meio do teste D'Agostino e Pearson. Uma vez comprovada a ausência de

distribuição normal foi aplicado o teste não paramétrico de Mann Whitney, sendo $p < 0.05$ considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS



5. RESULTADOS

A análise macroscópica das peças cirúrgicas revelou que houve uma cicatrização satisfatória da ferida em todos os espécimes, com ausência de exsudato, mostrando aspecto de normalidade do tecido circundante ao tubo.

5.1. Análise histopatológica descritiva (HE)

A análise microscópica de todas as amostras mostrou ausência de inflamação na lateral do tubo (interface tubo polietileno/tecido conjuntivo), a partir de 14 dias, local considerado como controle negativo do estudo. Observou-se formação de uma cápsula fibrosa em toda sua extensão, de variadas espessuras, com ausência de reação inflamatória tanto em HE (figura 8A, C) como na imunohistoquímica (figura 8B, D), para os dois cimentos.

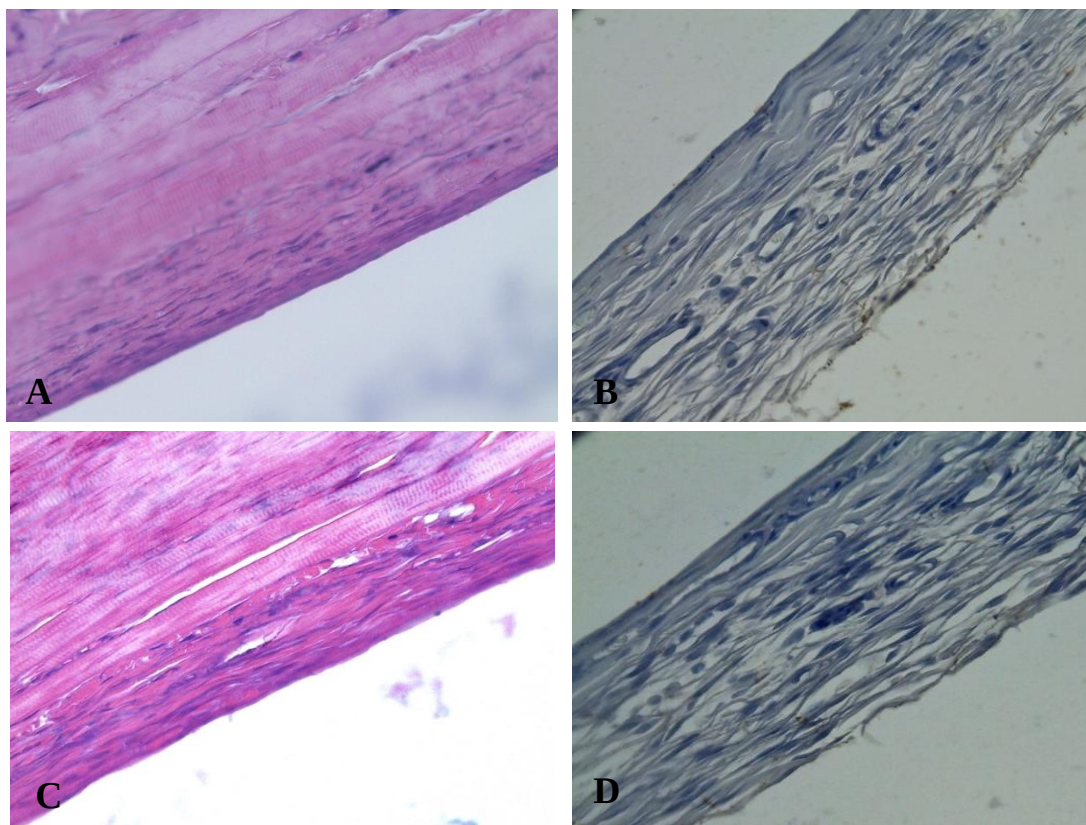


Figura 8. Imagens representativas em HE e imunohistoquímica mostrando ausência de marcação na parede lateral do tubo (400 x aumento), no Sealer 26 (A,B) e Epiphany (C,D)

5.1.1. Sealer 26 e Epiphany

Nas tabelas 2 e 3 encontram-se os achados da intensidade da resposta inflamatória observada de acordo com os implantes e tempo de observação, para cada cimento.

Tabela 2. 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	X	X	X
	Moderada								X	X	X	X	X	X	X							
	Severa	X	X	X	X	X	X	X														

Tabela 3. 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	X	X
	Leve								X	X		X	X		X	X						
	Moderada										X											
	Severa	X	X	X	X	X	X	X														

7 dias

Neste primeiro período de observação, percebe-se uma inflamação severa, dependendo da quantidade do material residual e pode-se também observar focos de necrose (figuras 9A e B). Nota-se a presença das células do infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos e macrófagos (figuras 9F e 10C, D), podendo também verificar, em alguns campos, células gigantes multinucleadas de corpo estranho. Havia material residual em todas as amostras. O controle lateral apresentou ausência de inflamação e em alguns campos inflamação leve, mas já fica nítida a presença de uma organização do tecido junto à parede lateral do tubo.

14 dias

Observa-se uma inflamação desde suave a moderada, porém ainda a quantidade de resíduos em contato com o tecido vai delimitar focos maiores ou menores de reação inflamatória. Já se percebe a tentativa do organismo em isolar o contato com o material residual com o resto do tecido, formando uma faixa de tecido conjuntivo fibroso. Nota-se uma resposta melhor com relação ao cimento Epiphany, já neste período, verificou-se em um caso a ausência de inflamação e formação de barreira separando o cimento residual do tecido (figura 12E e F), resposta semelhante ao controle lateral. O controle, a partir desse período de observação, apresentou-se sem inflamação, caracterizada por uma faixa de tecido conjuntivo fibroso, e ausência de células inflamatórias.

21 dias

Aos 21 dias, observou-se desde inflamação crônica suave a moderada até ausência de inflamação. Porém nesta fase, já se verifica a barreira de tecido conjuntivo fibroso isolando o material residual. No caso do Sealer 26, fica evidente que a intensidade da inflamação estava relacionada mais à quantidade do cimento residual (figura 13), pois, no mesmo campo, fica explícita uma melhor reparação tecidual em áreas com menos material residual. Já com Epiphany, em algumas regiões é nítida a presença da cápsula fibrosa livre de inflamação. O controle lateral se mantém sem inflamação.

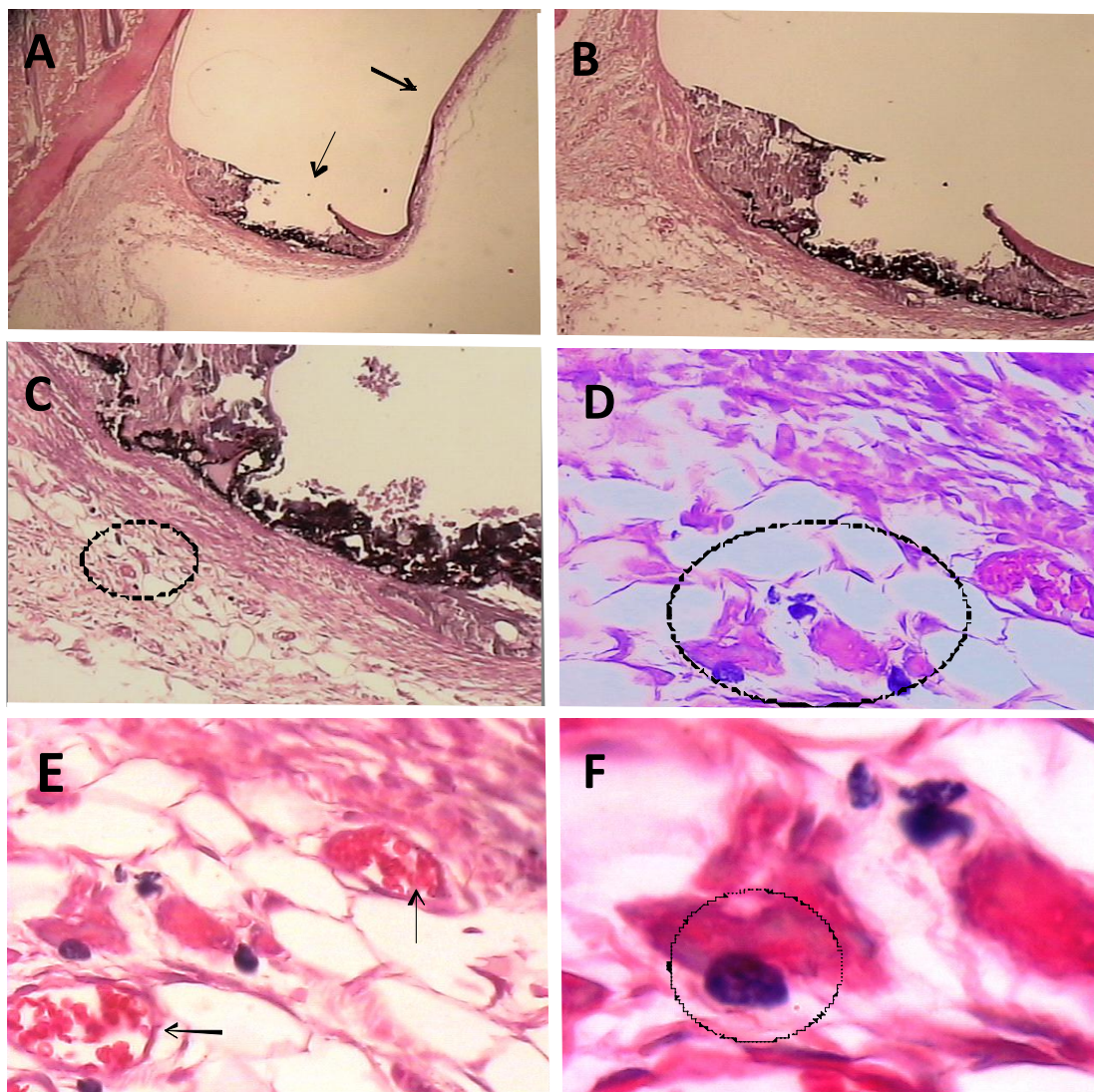


Figura 9. Cimento Sealer 26 aos 7 dias. **A.** Vista panorâmica evidenciando o espaço ocupado pelo corpo de prova caracterizando as laterais do tubo (seta lateral) utilizado como controle do experimento, e a área de contato do cimento com o tecido subcutâneo (seta inferior) 20X; **B.** Maior aumento de A, focos de necrose associados ao cimento residual 40X; **C e D.** Reação inflamatória severa evidenciando células do infiltrado inflamatório 100X e 400X; **E** Vasos sanguíneos dilatados (setas) e presença de células do infiltrado inflamatório 400X; **F.** Maior aumento de E destacando a presença de um macrófago 1000X.

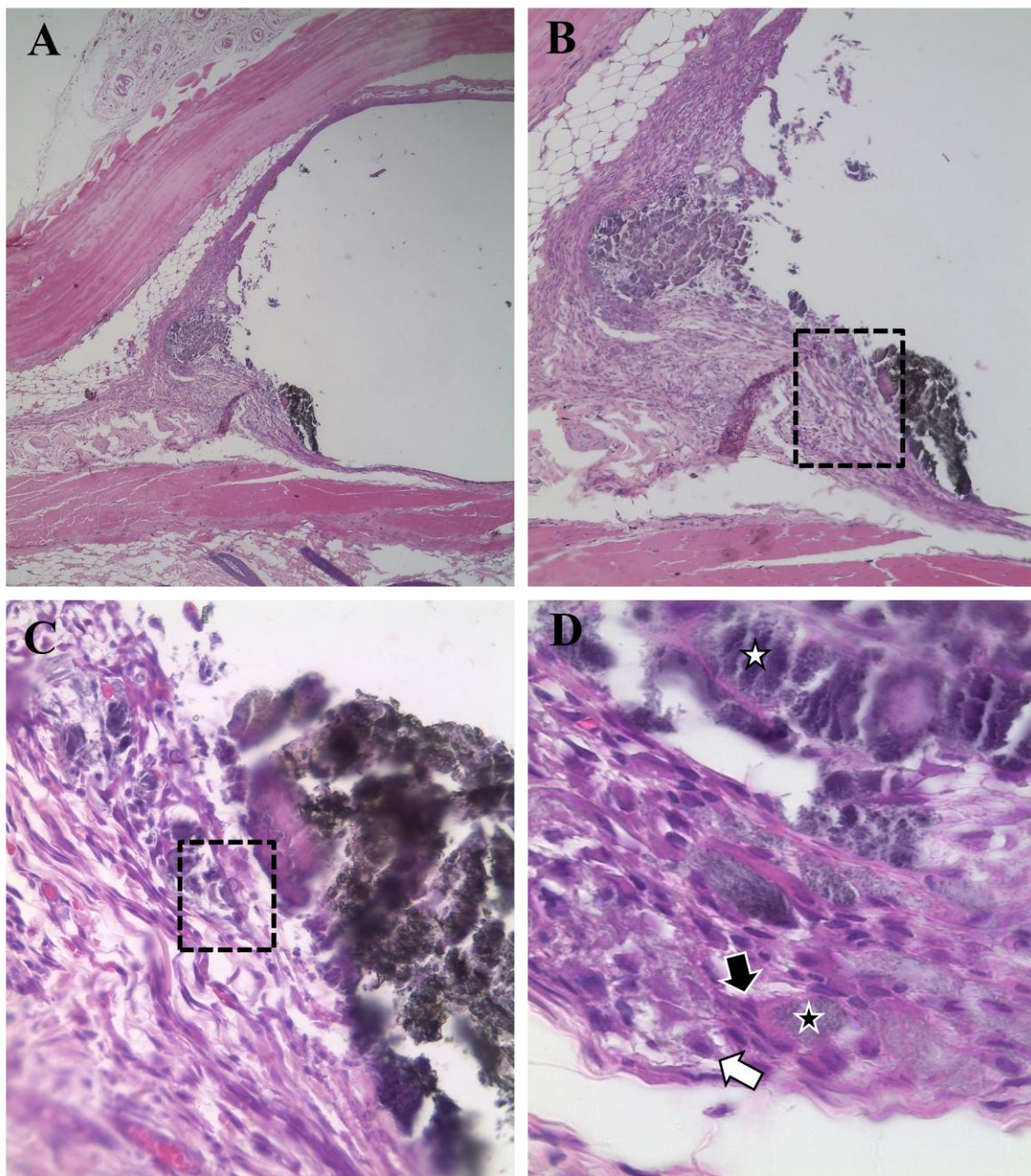


Figura 10. Epiphany – 7 dias. **A.** Vista panorâmica (20X) evidenciando o contato do material residual, **B.** Maior aumento de A, 40X. **C.** Presença de células do infiltrado inflamatório 400X; **D.** Maior aumento de C 1000X, mostrando material mineralizado (estrela branca) densamente permeado por infiltrado de células mononucleares, por vezes com morfologia compatível com macrófagos (seta branca), inclusive com formações sinciciais (seta preta) compatíveis com células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho contendo partículas do material em seu interior (estrela preta).

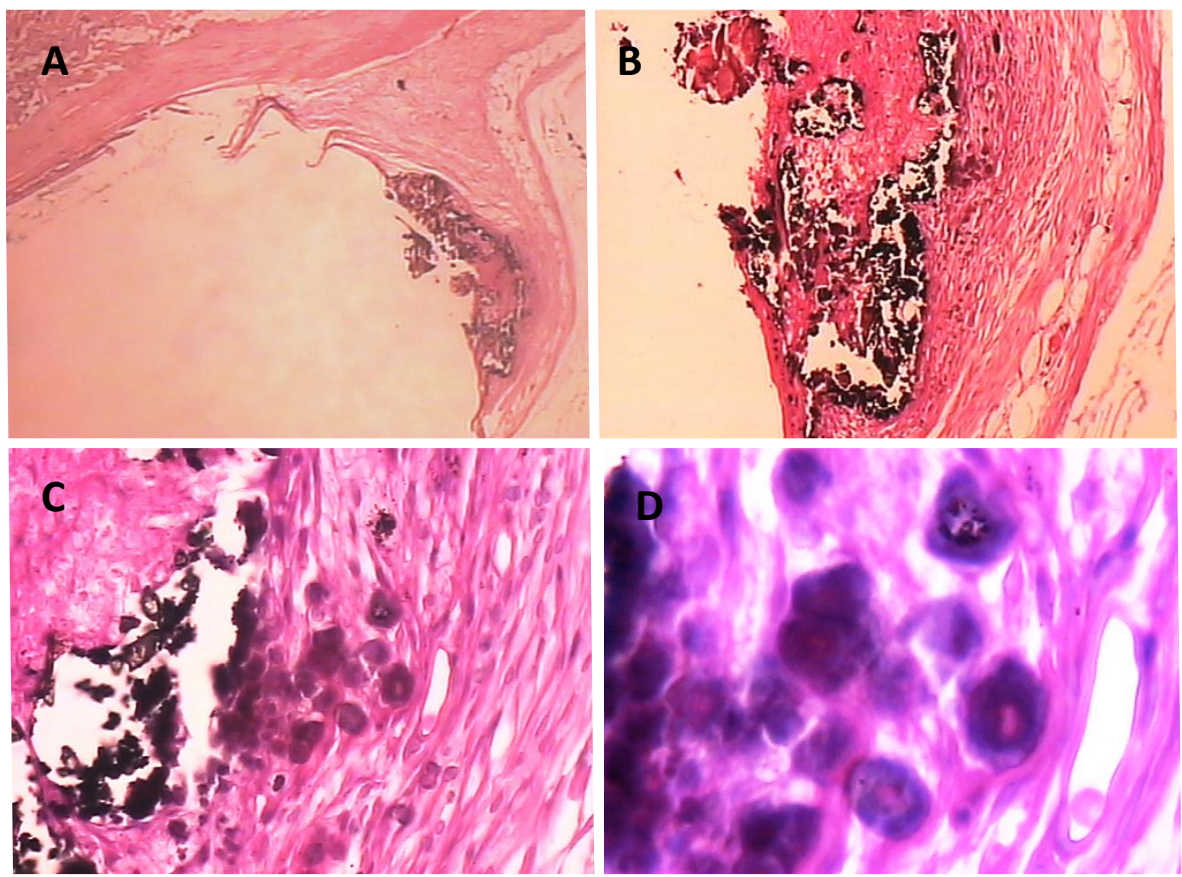


Figura 11. Sealer 26 – 14 dias. Em **A.** vista panorâmica do material residual em contato com o tecido 20X; em **B.** Maior aumento de A, caracterizando uma inflamação moderada 100X; **C.** Presença moderada de células inflamatórias dispostas focalmente 400X; **D.** Maior aumento de C, evidenciando calcificações distróficas 1000X.

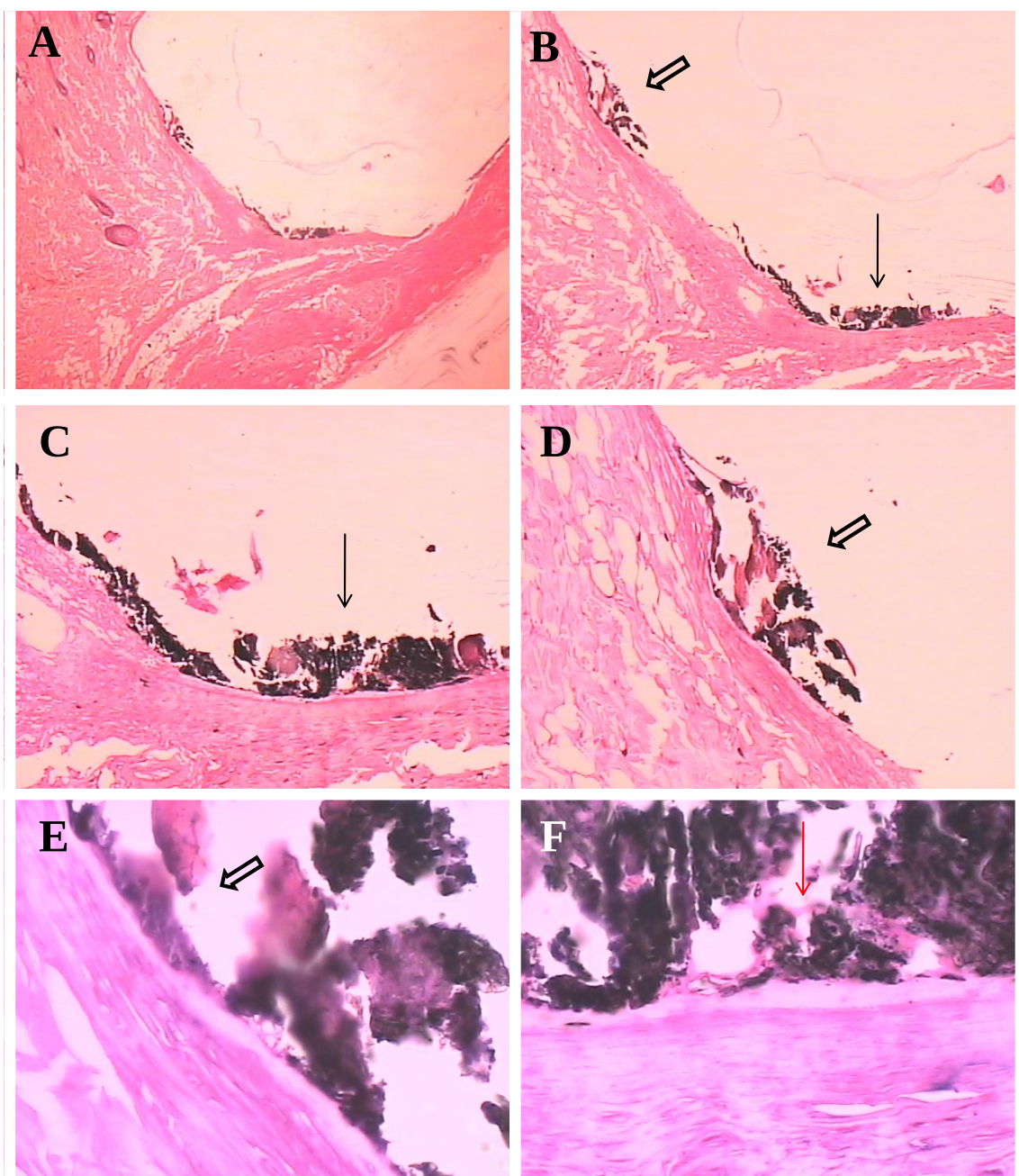


Figura 12. Epiphany – 14 dias. **A.** Vista panorâmica 20X. **B.** Maior aumento de A destacando o contato do material residual com o tecido 40X; **C.** Maior aumento de B (seta fina), **D.** (seta vazada) chamando a atenção para a formação da cápsula fibrosa, em condição igual ao controle 100X; **E,F.** Destacando, em maior aumento, a presença do material residual em um tecido livre de inflamação 400X.

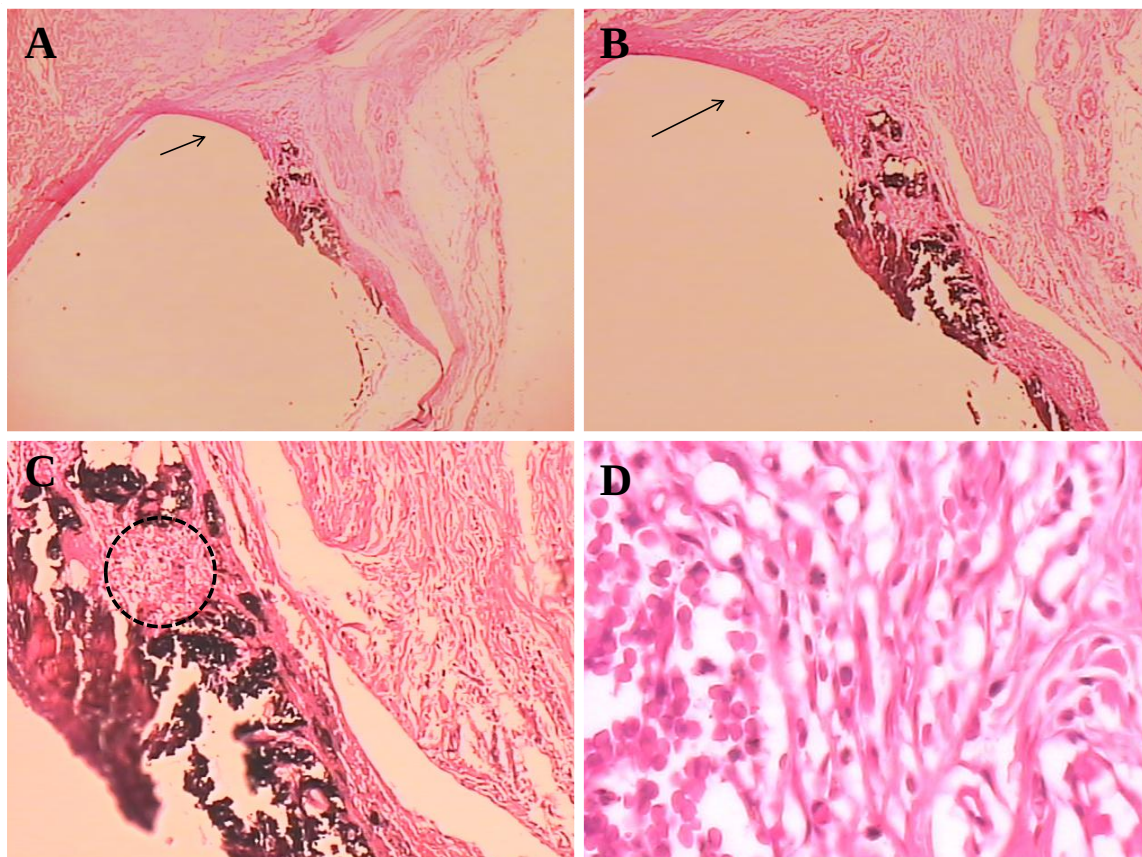


Figura 13. Sealer 26 – 21 dias. **A.** Vista panorâmica 20X. **B.** Maior aumento da área de contato do corpo de prova com o tecido, caracterizando uma área sem contato com o material residual e a sua organização tecidual adiantada (seta) 40X; **C.** Presença de células inflamatórias dispostas focalmente relacionadas com a quantidade do material residual 100X. **D.** Maior aumento de C, evidenciando infiltrado inflamatório da região (círculo) 400X.

5.2 Análise da imunomarcção de macrófagos M1

A avaliação qualitativa das células positivas para iNOS reflete o número de macrófagos designados como M1. No geral, observou-se uma marcação citoplasmática de intensidade variável ao longo do campo e em função do período de análise, para ambos os cimentos Sealer 26 e Epiphany.

A análise estatística do número de células positivas para iNOS em 7 e 14 dias mostrou diferença estatística significativa entre Sealer 26 e Epiphany ($p=0.0079$ e $p=0.0115$, respectivamente, Figuras 14A e 15A). Já em 21 dias, não houve diferença significativa entre os dois cimentos avaliados ($p=0.6545$, Figura 16A). A análise de cada cimento, ao longo do tempo demonstrou ausência de significância para o cimento Sealer 26 ($p=0.3126$, Figura 17A). O cimento Epiphany (Figura 17B) apresentou maior número de células iNOS positivas em 14 dias, com diferenças significativas, quando comparado ao período de 7 dias ($p=0.0246$) e 21 dias ($p=0.5212$).

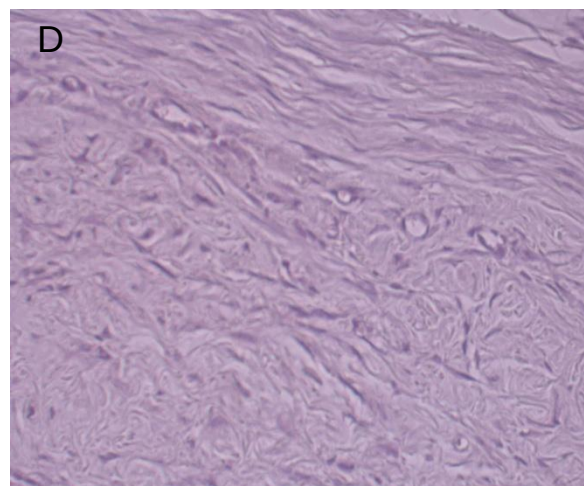
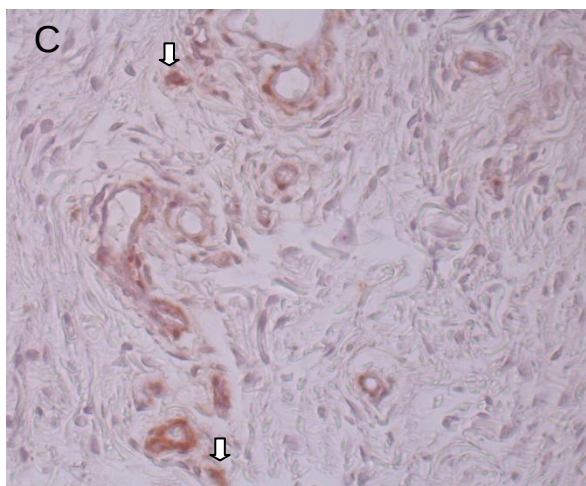
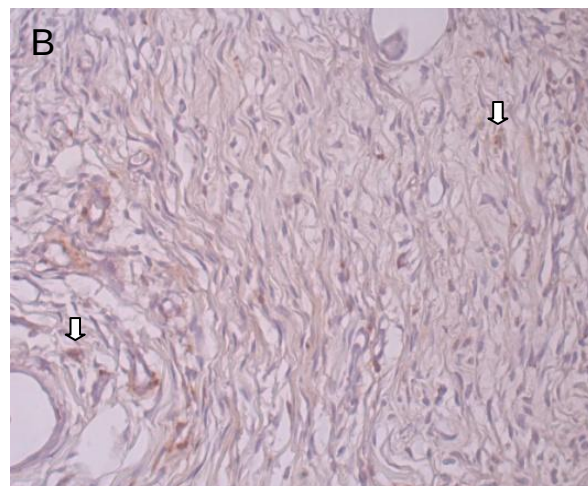
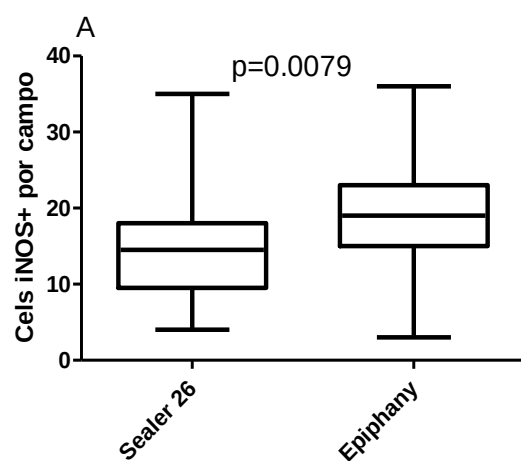


Figura 14. A. Número de células positivas para iNOS por campo em 7 dias; B,C. Imagem imunohistoquímica ilustrativa das células marcadas (seta branca) no grupo Sealer 26 (B) e Epiphany (C), $p=0.0079$; D. Controle negativo.

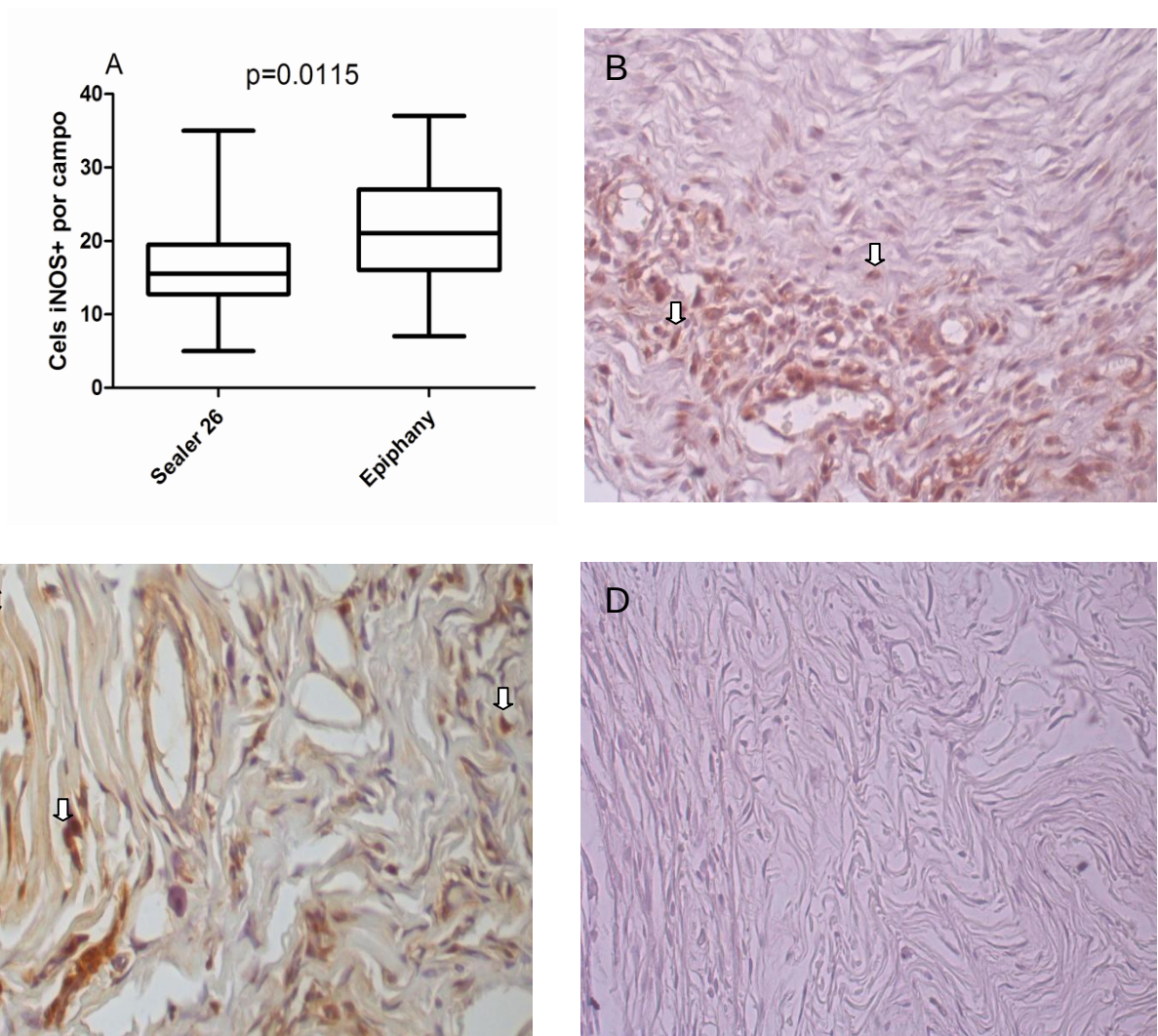


Figura 15. **A.** Número de células positivas para iNOS por campo em 14 dias. **B,C.** Imagem imunohistoquímica ilustrativa das células marcadas (seta branca) no grupo Sealer 26 (B) e Epiphany (C), $p=0.0115$. **D.** controle negativo.

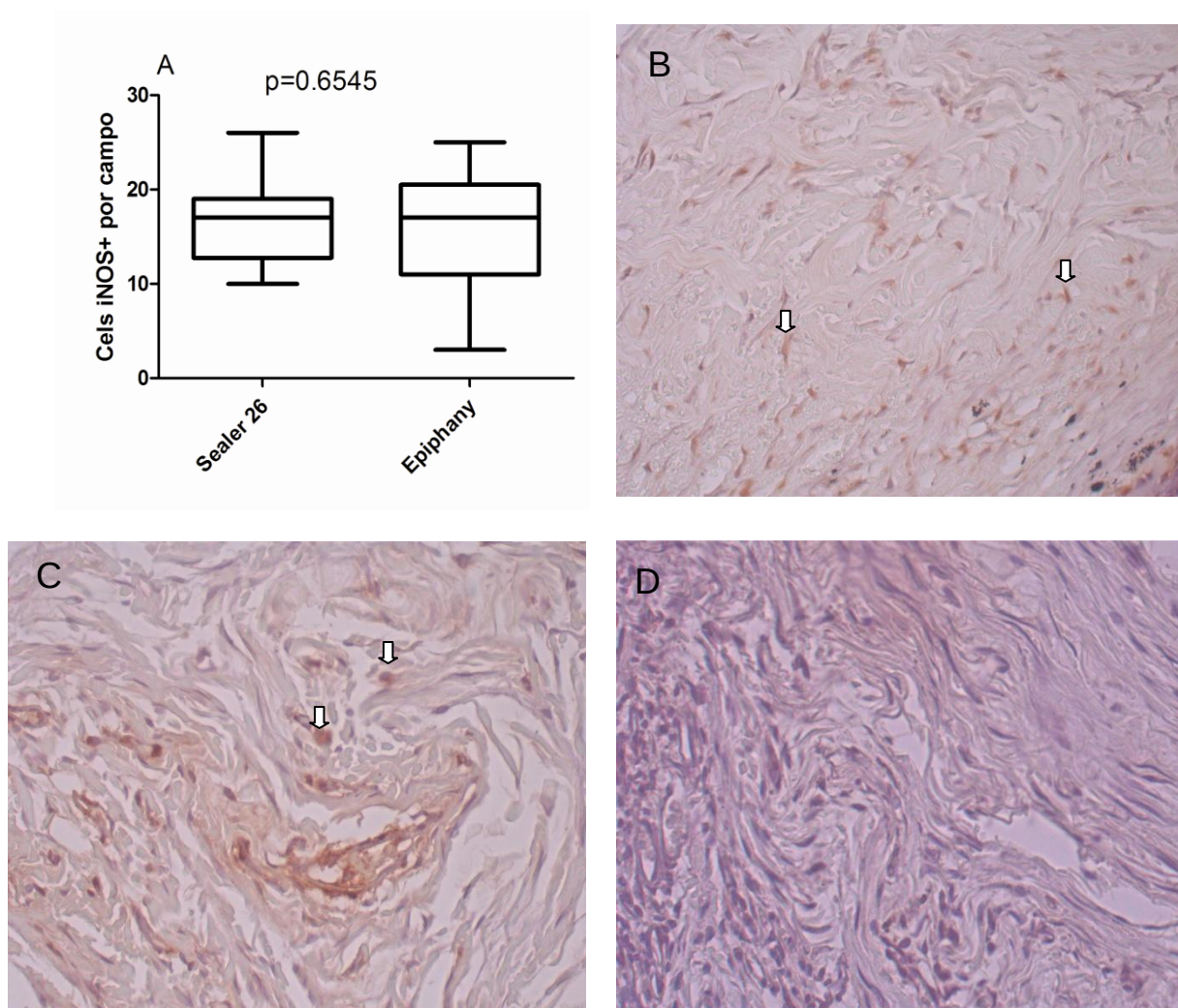


Figura 16. A. Número de células positivas para iNOS por campo em 21 dias (seta branca). B,C. Imagem imunohistoquímica ilustrativa das células marcadas no grupo Sealer 26 (B) e Epiphany (C), $p=0.6545$. D. controle negativo.

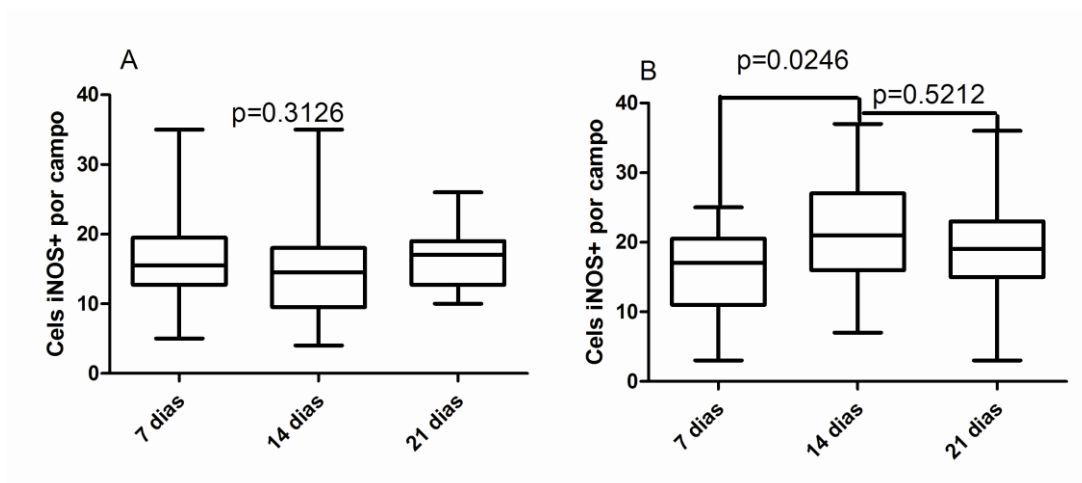


Figura 17. Análise estatística de cada cimento avaliado ao longo do tempo. **A.** Sealer 26 ($p=0.3126$); **B.** Epiphany ($p=0.0246$ e $p=0.5212$).

DISCUSSÃO



6. DISCUSSÃO

6.1 Metodologia

Neste estudo, foram utilizados implantes subcutâneos de polietileno para avaliação da biocompatibilidade dos cimentos Sealer 26 e Epiphany, a qual é recomendada por órgãos como a FDI (1980) e ADA (1972). Embora os materiais utilizados no presente estudo tenham sido previamente avaliados quanto as suas propriedades físicas, químicas e biológicas, os resultados são controversos. Tendo em vista a ausência de consenso quanto à irritabilidade promovida por ambos, decidiu-se avaliar os mesmos recém-manipulados, sem a administração conjunta do primer e cone de resilon, no caso do cimento Epiphany. Desta forma isolou-se uma variável: efeitos dos componentes químicos dos cimentos recém-manipulados sobre o perfil de resposta inflamatória promovida por ambos.

Segundo Browne (1994), o uso de animais para avaliação da biocompatibilidade de materiais odontológicos apresenta resultados controversos em razão da grande variedade de metodologias adotadas por diferentes pesquisadores, não standardizadas, o que dificulta a interpretação dos resultados de estudos *in vivo* realizados em diferentes laboratórios. Contudo, esta ainda é uma metodologia amplamente difundida e aceita pela comunidade científica, embora outros métodos mais sofisticados de análise tenham sido introduzidos na última década, como a utilização de microsondas de DNA (DNA Microarray) para verificação do perfil da resposta imunológica produzida (Deonarine et al., 2007) ou a reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR).

Os testes *in vivo* para avaliação da biocompatibilidade podem ser realizados em vários animais, como cães (Tanomaru-Filho et al., 2006; Leonardo et al., 2007; Leonardo et al., 2008), carneiros (Gosain et al., 2002), porcos da Índia (Yesilsoy et al., 1988; Sousa et al., 2004; Sousa et al., 2006), macacos (Bernath & Szabo, 2003) e ratos de laboratório (Zmener et al., 2005; Onay et al., 2007; Garcia Lda et al., 2010).

Dentre esses animais, o rato (*Rattus norvegicus*) é frequentemente utilizado, sendo o animal de escolha neste estudo. Além de ser um modelo experimental que representa satisfatoriamente o organismo de um mamífero, ele apresenta dimensões adequadas proporcionando um manejo fácil e seguro, e também apresenta um metabolismo mais acelerado, quando comparado a outros animais, o que permite a obtenção de resultados relevantes em um curto período de tempo (Rodrigues Sosa, 2004). Adicionalmente, possuem ciclo vital relativamente pequeno, além de se conhecer bem a anatomia, bem como suas variações genéticas e fisiológicas (Ribeiro et al., 1995).

Segundo Costa (2001), os testes de implantação em subcutâneo de ratos apresentam vantagens como o uso de área limitada para manutenção dos animais; facilidade de limpeza e higienização da área reservada à manutenção dos animais no pós-operatório; metodologia de execução relativamente simples possibilitando o trabalho em vários animais em curto período de tempo; dispensa a descalcificação dos espécimes, o que acelera o processamento laboratorial; possibilita comparar a resposta tecidual num mesmo animal, para diversos materiais experimentais inclusive os materiais usados como controle.

Um dos dispositivos mais comumente utilizados para este propósito é o tubo de polietileno, que possui a vantagem de imitar as condições do canal radicular uma vez que o material entra em contato com o tecido apenas nas porções terminais do tubo (Friend & Browne, 1968; Zmener et al., 1988). Esse é considerado um material atóxico, não provoca danos teciduais, além dos introduzidos pelo próprio ato cirúrgico (Stanford, 1980; Standardization, 1997), como foi comprovado no presente estudo pela ausência de reação inflamatória na lateral do tubo de polietileno em todos os tempos de observação. Além disso, a parede lateral do tubo serve como parâmetro básico de modelo evolutivo reacional ideal (Costa, 2001) e controle para avaliação da severidade do trauma cirúrgico (Olsson et al., 1981), permitindo comparar com segurança os padrões de reação tecidual, de acordo com tipo de cimento empregado.

Os tubos de polietileno são considerados apropriados para manter os materiais teste em contato com tecido conjuntivo, embora cuidados

adicionais devam ser tomados para evitar o extravasamento, uma vez que este apresenta ambas as extremidades abertas. Para evitar que o material teste escape em direção ao tecido adjacente em diferentes graus, gerando resposta inflamatória na área, pode-se fechar uma das extremidades do tubo com calor ou esperar a presa dos cimentos. No entanto, ao esperar a presa dos cimentos, elimina-se a avaliação da toxicidade transitória, que acontece com a maioria dos materiais endodônticos “a fresco” (Olsson et al., 1981; Hauman & Love, 2003b). Diante disso, os cimentos endodônticos foram implantados imediatamente após a manipulação, seguindo as recomendações do fabricante, o que pode mimetizar as condições clínicas que ocorrem durante a obturação do canal.

Outro fator a ser considerado é o diâmetro interno do tubo, embora não haja uma padronização na literatura, pode-se presumir que quanto menor o diâmetro, menor a chance de extravasar para o tecido, por isso optamos pelo diâmetro interno de 0,6mm. Apesar de alguns autores preconizarem o fechamento de uma das extremidades para evitar extravasamentos, optamos por preencher todo o tubo, deixando uma delas sobre retração inicial e complementando a outra para que não ficasse espaço vazio. Observamos que apesar das duas extremidades estarem abertas, não houve correlação com maior ou menor extravasamento do material, e recomendamos tal modificação metodológica.

Apesar da ampla literatura apresentada sobre os implantes subcutâneos em teste de compatibilidade, existem poucos relatos sobre as dificuldades técnicas (Torneck, 1961; Makkes et al., 1977). Tal metodologia deve ser criteriosamente definida antes da sua realização, como verificado em nosso estudo piloto. Neste, foi realizada uma única incisão, duas divulsões laterais no tecido, uma de cada lado, para implantação de dois tubos contendo cimento, porém constatou-se a proximidade dos tubos e o deslocamento dos mesmos, o que interferiria nos resultados. Diante disso, decidimos realizar duas incisões e duas divulsões mínimas, apenas o suficiente para acomodação dos tubos, com o propósito de tentar minimizar a movimentação dos mesmos no interior do tecido, reduzindo a possibilidade de ocorrer uma resposta

inflamatória devido a essa movimentação. Além disso, a opção pela implantação na região escapular se deve ao fato de que na região pélvica há maior quantidade de tecido adiposo, o que poderia aumentar a tendência de deslocamento do corpo de prova (Makkes et al., 1977). A formação de cápsula fibrosa envolvendo toda a lateral do tubo confirma que houve limitação do movimento (Olsson et al., 1981).

Adicionalmente, a experiência obtida no experimento piloto também foi importante para que escolhêssemos o 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. Sabe-se que o cianocrilato de etila é um material que possui comprovada segurança para ser utilizado em suturas (Bocca et al., 1999; Borba et al., 2000), além de estudos comprovarem sua biocompatibilidade tanto *in vivo* (Bhaskar et al., 1972), quanto *in vitro* (de Azevedo et al., 2003). Além disso, recomenda-se seu uso devido as suas características hemostáticas e antiinflamatórias, assim como também sua alta capacidade de adesão em ambientes úmidos (Naves, 1999).

Como já recomendado previamente por outros autores (Olsson et al., 1981), a remoção dos tubos foi realizada somente após a inclusão da peça em parafina, já que relatam que os tubos, contendo o material, devem ser cortados *in situ* pois, se os mesmos forem removidos antes de serem feitos os cortes histológicos, há possibilidade de removermos a 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).

Apesar de amplamente utilizadas na análise de biocompatibilidade, é importante ressaltar que os resultados obtidos nesse tipo de estudo não podem ser diretamente extrapolados para a prática clínica, especificamente para o que ocorre nos tecidos humanos periapicais.

6.2 Períodos experimentais empregados e método de análise dos resultados

A literatura apresenta uma enorme variedade de tempos experimentais, os quais se baseiam tanto nos critérios definidos pela ISO 10993-6 (1994) e ADA (1972, 1982), como pelos objetivos pretendidos.

A ISO 10993-6 (1994) recomenda que o período inicial para avaliação histológica seja de, no mínimo, 7 dias pós-cirurgia para que a análise dos resultados não fique prejudicada devido ao efeito do trauma operatório (Xavier et al., 1974). Já as recomendações da ADA (1972, 1982) sugerem que esses períodos podem variar entre 7-10, 21-35, 60-80 dias. Porém, encontra-se na literatura avaliações das reações inflamatórias, após períodos de 10, 30 e 90 dias (Zmener et al., 2010); 7 e 30 dias (Holland et al., 1999; 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); 7, 21 e 42 dias (Garcia Lda et al., 2010). Observa-se que não há um consenso na literatura quanto aos tempos de avaliação utilizados em estudos de biocompatibilidade de materiais em tecido subcutâneo de ratos.

Para o presente estudo, optamos pelos períodos de 7, 14 e 21 dias pela possibilidade de acompanhar, tanto em HE como na avaliação imunohistoquímica, a evolução da reação inflamatória, a qual era particularmente interessante nos períodos sabidamente anteriores ao completo reparo, fase inflamatória, a fim de podermos avaliar também o número de macrófagos M1, no decorrer do experimento. A técnica de imunohistoquímica foi introduzida como ferramenta complementar de análise, objetivando refinar achados histológicos, como o número de macrófagos presentes no campo. Esta permite identificar se os mesmos são células com caráter pró-inflamatório.

As análises histológicas podem ser feitas por métodos qualitativos ou quantitativos. Em nosso estudo, a análise dos resultados em HE não considerou a contagem celular já que, como afirmado por Sousa (2000), o objetivo da análise microscópica é qualificar a reação tecidual em contato com

o material implantado. Além disso, levando em consideração que as reações teciduais são processos tridimensionais, seria 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. Estudos recentes têm avaliado as reações morfometricamente, no entanto, resulta em dados subjetivos, já que dependem da interpretação dos tipos celulares observados.

Olsson et al. (1981) relataram que a quantificação da resposta tecidual somente será possível em materiais que apresentem graus de irritabilidade bem distintos, o que não era esperado neste estudo, já que ambos são cimentos resinosos, embora com 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, são apenas indicadores da biocompatibilidade do material.

Os critérios utilizados para avaliação histológica basearam-se nas normas da FDI (1980), segundo a qual as reações são consideradas 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. Já as análises imunohistoquímicas foram realizadas de maneira qualitativa e quantitativa, por meio da contagem de células marcadas por campo, já que apenas um tipo de célula estava sendo avaliada.

6.3 Cimentos endodônticos utilizados e resultados obtidos

Apesar de não existir um único cimento que reúna todas as propriedades consideradas ideais, os cimentos resinosos apresentam

vantagens quanto as suas propriedades físicas, como maior estabilidade, fácil manipulação, bom escoamento e baixa infiltração. Tanto o Sealer 26, quanto o cimento Epiphany apresentam extensa literatura, no entanto, a utilização de ambos, recém-manipulados, no mesmo animal (controle intrínscio) não foi reportada nas bases de dados pesquisadas em nosso estudo.

O cimento Epiphany é um cimento relativamente novo, desenvolvido para utilização em associação com adesivo dentinário e um tipo especial de cone denominado Resilon® (Pentron clinical Technologies, LLC, Wallingford, CT, EUA). Alguns trabalhos atribuem, ao cimento Epiphany, características como: hidrofília, que permite penetrar nos túbulos dentinários (Zmener et al., 2008) e adesividade tanto à dentina radicular, através do uso de primers auto-condicionantes como aos materiais obturadores (Shipper et al., 2004).

No entanto, a avaliação das propriedades biológicas do cimento Epiphany *in vivo* apresenta resultados dicotômicos (Sousa et al., 2006; Onay et al., 2007; de Campos-Pinto et al., 2008; Garcia Lda et al., 2010). Shipper et al. (2005) observaram clinicamente uma menor quantidade de periodontite apical observada neste cimento, o que pode estar associado à maior resistência à microinfiltração coronária e à alta liberação de cálcio. Esta liberação de íons cálcio favorece um pH mais alcalino do meio levando a efeitos bioquímicos que culminam na aceleração do processo de reparo (Seux et al., 1991).

Por outro lado, Garcia et al. (2010) mostraram que a resposta biológica foi menos favorável no grupo Epiphany-Resilon sem primer auto-condicionante, quando comparado ao grupo com aplicação de primer. Isso poderia ser explicado pela capacidade de selamento proporcionado pelo primer na superfície dentinária, prevenindo contato de monômeros não reagidos com o tecido conjuntivo (Zmener, 2004; Versiani et al., 2006). Esses resultados sugerem que, quando o primer não é usado, os produtos tóxicos liberados promovem uma resposta biológica menos favorável, porém transitória, já que no 42º dia observou-se uma leve reação inflamatória crônica (de Campos-Pinto et al., 2008).

Em nosso estudo, ambos os cimentos apresentaram reação inflamatória severa no período inicial, de 7 dias, a qual reduziu gradativamente

em 14 dias, com inflamação moderada a suave no período de 21 dias, o que confirma uma toxicidade transitória e focal destes cimentos, como apresentado por outros estudos (Sousa et al., 2006; Onay et al., 2007; de Campos-Pinto et al., 2008; Garcia Lda et al., 2010).

Em relação ao cimento Sealer 26, a destruição tecidual provocada pelo contato deste, nas áreas de extravasamento, demonstra que “a fresco” este material é potencialmente irritante, já que aos 21 dias persistem alguns focos de desorganização tecidual em áreas onde o material não foi completamente fagocitado. Embora a adição do hidróxido de cálcio nas formulações dos cimentos endodônticos objetivem melhorar as propriedades biológicas dos materiais obturadores, 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.

Estudos apresentando diferentes resultados quanto a avaliação da resposta ao cimento Sealer 26 não podem ser comparados, devido à utilização de modelos biológicos completamente distintos, como implantes subcutâneos e avaliação da resposta no tecido conjuntivo periapical pós obturação retrógada (Barbosa et al., 2003; Tanomaru-Filho et al., 2006). Porém, independente da metodologia empregada, um fator a ser considerado é o maior proporcionamento de pó durante o preparo do material (Tanomaru-Filho et al., 2006), o que pode diminuir a fluidez do cimento e influenciar a compatibilidade do mesmo.

Embora não tenha sido possível identificar com precisão o grau de neutrofilia, no presente estudo, devido à imensa destruição da matriz aos 7 dias, a severidade da inflamação inicial é ponto comum em todos os animais avaliados no presente estudo.

Cabe ressaltar que, tanto o Sealer 26, como com Epiphany atuaram como corpo estranho nas áreas extravasadas, nas quais observamos a presença de macrófagos, linfócitos e células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, o que caracteriza o estágio final da resposta inflamatória e reparo (Kou & Babensee, 2011). Além disso, ambos induziram o desenvolvimento de cápsula fibrosa, indicando que o organismo foi capaz de

isolar o material dos outros tecidos, devido à presença e persistência local do agente agressor. Segundo St John (2007), a presença de cápsula fibrosa, que se espessa gradualmente, sugere que o organismo está continuando a produzir tecido fibroso em resposta a um irritante contínuo que ainda não foi minimizado pela formação da cápsula. Embora não tenha sido realizada a mensuração da cápsula, foi evidente sua maior organização ao longo dos períodos experimentais. Há autores que afirmam que a espessura da cápsula fibrosa é diretamente proporcional à intensidade da resposta inflamatória (Alle & Marchesano, 1988), e a presença de uma cápsula fibrosa mais organizada limitando a área da inflamação previne que a reação inflamatória se estenda para regiões distantes da área em contato com o material (Scarparo et al., 2009) .

Aos 21 dias, embora não seja possível identificar um completo reparo da área, os dois grupos experimentais caminharam neste sentido. O grupo implantado com o cimento Epiphany parece estar ligeiramente adiantado, com maior organização da matriz neoformada, que já inicia essa diferenciação aos 14 dias.

Como previsto, a quantidade de material extravasado para interior do tecido foi variável, desde pouco a muito, independente do tipo de cimento utilizado. De modo geral, foi observada uma resposta tecidual mais intensa nas extremidades que continham maior quantidade de cimento extravasado, o que coincide com os achados de outros autores (Bernath & Szabo, 2003; Batista et al., 2007). Um maior extravasamento do material para o interior do tecido irá proporcionar uma maior irritação física e química, devido ao aumento da extensão do contato do cimento com o tecido (Siqueira, 2005). Desta maneira, pode-se supor que componentes irritantes podem ser liberados em maior quantidade, causando inflamação de maior porte, ao contrário de quando o cimento está confinado no diâmetro do tubo (Bernath & Szabo, 2003).

6.4 Relação macrófagos M1 e reação inflamatória

Como mencionado na revisão da literatura, os macrófagos são células do tecido conjuntivo com papel fundamental na evolução do processo inflamatório e estabelecimento do reparo. Embora durante muitos anos esses tenham sido vistos como células estritamente ligadas ao perfil Th 1, ou seja, a destruição de microorganismos, eliminação de agentes estranhos, como biomateriais e liberação de mediadores pró-inflamatórios, hoje, sabe-se que essa é uma célula com múltiplas funções (Kou & Babensee, 2011).

Devido a sua plasticidade funcional, os macrófagos foram divididos em diferentes subtipos, identificados com base nas suas propriedades funcionais distintas, marcadores de superfície e perfil de citocinas liberadas no microambiente onde vivem (Mills et al., 2000; Mantovani et al., 2004; Kou & Babensee, 2011). Esses são de dois tipos principais, macrófagos M1, pró-inflamatórios, e macrófagos M2, anti-inflamatórios, moduladores e reparadores. Hoje se sabe que essa divisão em extremos é falha, já que um tipo transforma-se em outro, ou seja, é um processo dinâmico em que sofrem uma adaptação funcional influenciados pelas mudanças no micro-ambiente (Stout et al., 2005), além de existirem fases intermediárias, durante a evolução do processo inflamatório até o reparo.

Em nosso estudo, optamos por avaliar os macrófagos do subtipo M1, os quais apresentam elevada capacidade de processar antígenos, além de serem essenciais na destruição da matriz e reorganização tecidual em tecidos que sofreram agressão (Kou e Babensee, 2011). Considerando que este estudo foi conduzido apenas nas fases iniciais pós-implantação, período no qual os componentes presentes no cimento podem ser responsáveis por uma toxicidade transitória, a quantificação do subtipo M1 visa auxiliar o método histopatológico na análise da compatibilidade dos cimentos. Isso não quer dizer que não haja macrófagos do subtipo M2 na região analisada, porém optamos por não avaliá-los, tendo em vista que o reparo inevitavelmente ocorrerá como verificado previamente no experimento piloto, em períodos de 42 e 60 dias. Dessa forma, a persistência dos macrófagos M1 é o fator de interesse em

nosso estudo, já que levantamos a hipótese de que a persistência desta célula poderia estar relacionada à manutenção do processo inflamatório, com características mais ou menos severas nos grupos estudados.

Os resultados de nosso estudo surpreendem quanto ao padrão de imunomarcacão. O grupo Epiphany apresentou um maior número de células positivas para iNOS, marcador do subtipo M1, em 7 e 14 dias, quando comparado ao cimento Sealer 26. No entanto, este grupo apresentou na avaliação histopatológica uma melhor organizaçã da matriz e menor destruiçã tecidual, sobretudo em 14 dias. Tais resultados podem estar ligados ao papel dessas células na liberaçã de enzimas relacionadas à destruiçã da matriz, como collagenases e metaloproteinases (Metzger, 2000; Kou & Babensee, 2011), e seu influxo para as regiões inflamadas, visando à limpeza de debris (Laskin, 2009; Kou & Babensee, 2011). Portanto, um aumento destas células possibilitou um rápido remodelamento e remoçã dos restos de cimento, o que poderia estar relacionado a uma reorganizaçã tecidual mais rápida nos cortes corados em HE. Porém devemos lembrar que essa classificaçã em M1 e M2 representa dois extremos dentro de funções contínuas desempenhadas pelos macrófagos (Kou & Babensee, 2011). Em outras palavras, mais células M1 no grupo Epiphany não significa necessariamente que estas estejam produzindo os mesmos mediadores que as células M1, no grupo Sealer 26. Podemos especular que o excesso de debris e tecido necrótico no grupo Sealer 26 poderia ter levado a uma dificuldade de essas células limparem a área, o que prolonga a ativaçã dos macrófagos, liberando mediadores pró-inflamatórios e retardando o reparo.

Um dado interessante foi observado aos 21 dias, período no qual os dois grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas quanto à marcaçã imunohistoquímica e quanto à intensidade da reaçã inflamatória, sendo ambos classificados como suave a moderada.

Quando avaliados ao longo do tempo, o grupo Epiphany apresentou maior quantidade de macrófagos em 14 dias, período mais favorável para o mesmo na avaliaçã histopatológica. Este dado reforça a hipótese de que o subtipo M1, apesar de essencialmente pró-inflamatório, é essencial para que

ocorra o processo de reparo. Já o cimento Sealer 26 não apresentou diferenças significativas no número de macrófagos M1, ao longo do tempo, demonstrando que este equilíbrio pode ter prejudicado o reparo nas fases iniciais.

No entanto, diante dos múltiplos papéis dos macrófagos durante a inflamação e da variedade de mediadores que esta célula pode liberar, mais estudos são necessários para compreender a relação entre macrófagos M1 e a evolução do processo de reparo em estudos, envolvendo cimentos endodônticos. Este é um campo de estudos relativamente novo na área de biomateriais, o qual precisa ser mais explorado. Embora a quantificação de macrófagos M1 não seja uma ferramenta complementar na análise da biocompatibilidade, avaliações imunohistoquímicas podem ajudar a entender como se processam as pequenas diferenças observadas em avaliações de biocompatibilidade dos cimentos.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Diante da metodologia empregada e dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- A intensidade da reação inflamatória dos materiais testados diminuiu ao longo dos períodos avaliados.
- Todos os cimentos testados resultaram em uma resposta inflamatória em tecido subcutâneo de ratos, mesmo que suave.
- A intensidade da resposta inflamatória pode estar relacionada ao tipo de cimento endodôntico utilizado, à quantidade de material extruído e ao período de análise.
- Os materiais testados apresentaram padrões de aceitabilidade biológica.
- Embora a marcação para M1 não possua relação direta com a intensidade da inflamação e velocidade do reparo, sugerimos que a composição dos cimentos resulte em formas diferentes de conduzir ao reparo.

REFERÊNCIAS

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

REFERÊNCIAS

1. Biological testing of dental materials and devices, (1994).
2. Dentistry- preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry - test methods for dental materials, (1997).
3. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **J Am Dent Assoc.** 1972;84(2):382-7.
4. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. **Int Dent J.** 1980;30(2):140-88.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Imunologia celular e molecular. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.
6. Al-Hiyasat AS, Tayyar M, Darmani H. Cytotoxicity evaluation of various resin based root canal sealers. **Int Endod J.** 2010;43(2):148-53.
7. 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 Sao Paulo.** 1988;2(2):120-6.
8. Anusavice KJ. Biocompatibilidade dos materiais dentários. In: Anusavice, KJ, editor. Phillips – materiais dentários. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p. 44-7.
9. Anusavice KJ. Phillips Materiais Dentários. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
10. Azar NG, Heidari M, Bahrami ZS, Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. **J Endod.** 2000;26(8):462-5.
11. Barbosa HG, Holland R, de Souza V, Dezan EJ, Bernabe PF, Otoboni JA, et al. Healing process of dog teeth after post space preparation and exposition of the filling material to the oral environment. **Braz Dent J.** 2003;14(2):103-8.
12. Barbosa SV, Araki K, Spangberg LS. Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1993;75(3):357-61.

13. Batista RF, Hidalgo MM, Hernandez L, Consolaro A, Velloso TR, Cuman RK, et al. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. **J Biomed Mater Res A**. 2007;81(1):171-7.
14. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. **Immunol Today**. 1994;15(2):74-80.
15. Berbert FL, Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru Filho M, Bramante CM. Influence of root canal dressings and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2002;93(2):184-9.
16. Bernardes RA, de Amorim Campelo A, Junior DS, Pereira LO, Duarte MA, Moraes IG, et al. Evaluation of the flow rate of 3 endodontic sealers: Sealer 26, AH Plus, and MTA Obtura. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2010;109(1):e47-9.
17. Bernath M, Szabo J. Tissue reaction initiated by different sealers. **Int Endod J**. 2003;36(4):256-61.
18. Bhardwaj RS, Henze U, Klein B, Zwadlo-Klarwasser G, Klinge U, Mittermayer C, et al. Monocyte-biomaterial interaction inducing phenotypic dynamics of monocytes: a possible role of monocyte subsets in biocompatibility. **J Mater Sci Mater Med**. 1997;8(12):737-42.
19. Bhaskar SN, Beasley JD, Ward JP, Cutright DE. Human pulp capping with isobutyl cyanoacrylate. **J Dent Res**. 1972;51(1):58-61.
20. 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.
21. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J Exp Med**. 1991;174(6):1549-55.
22. Borba CC, Roubaud Neto E, Val RLR, Borba Jr CO, Soufen MA, Francisco Neto A. Uso do cianoacrilato na síntese de pele de ratos: trabalho de pesquisa experimental. **Acta Cir Bras**. 2000;15(1):48-54.
23. 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.

24. Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, Badylak SF. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. **Biomaterials**. 2009;30(8):1482-91.

25. Browne RM. Animal tests for biocompatibility of dental materials--relevance, advantages and limitations. **J Dent**. 1994;22 Suppl 2(S21-4.

26. Carvalho-Junior JR, Correr-Sobrinho L, Correr AB, Sinhoreti MA, Consani S, Sousa-Neto MD. Radiopacity of root filling materials using digital radiography. **Int Endod J**. 2007;40(7):514-20.

27. Celada A, Nathan C. Macrophage activation revisited. **Immunol Today**. 1994;15(3):100-2.

28. Consolaro A. Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. Maringá: Dental Press 2009.

29. Costa CAS. Testes de citotoxicidade em culturas de células. In: Estrela, C, editor. Metodologia Científica Ensino e Pesquisa em Odontologia. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p. 147-60.

30. Costa CAS, Bacalhau, J.T., Hebling, J. . Estudo preliminar da biocompatibilidade de diferentes ciemtnos utilizados na terapia pulpar. **Rev Pos Grad São José dos Campos**. 2003;10(1):25-36.

31. Costa CAS, Hebling, J., Souza, P.P.C. 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.

32. Costa CAS, Marcantonio, R.A.C., Hebing, 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.

33. Cotran RS, Kumar V, Robbins CT. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

34. 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.
35. de Campos-Pinto MM, 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.
36. de Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. Comparison between gutta-percha and resilon removal using two different techniques in endodontic retreatment. **J Endod.** 2006;32(4):362-4.
37. de Oliveira Mendes ST. Efeito de cimentos obturadores endodônticos sobre a atividade de macrófagos M1 e M2. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
38. de Oliveira Mendes ST, de Brito LC, Rezende TM, de Oliveira Reis R, Cardoso FP, Vieira LQ, et al. A decrease in the innate immune response to infection in the presence of root canal sealers. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2010;109(2):315-23.
39. de Oliveira Mendes ST, Ribeiro Sobrinho AP, de Carvalho AT, de Souza Cortes MI, Vieira LQ. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. **J Endod.** 2003;29(2):95-9.
40. de Oliveira RL, Oliveira Filho RS, Gomes Hde C, de Franco MF, Enokihara MM, Duarte MA. Influence of calcium hydroxide addition to AH Plus sealer on its biocompatibility. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2010;109(1):e50-4.
41. Deonaraine K, Panelli MC, Stashower ME, Jin P, Smith K, Slade HB, et al. Gene expression profiling of cutaneous wound healing. **J Transl Med.** 2007;5(11):
42. Desai S, Chandler N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. **J Endod.** 2009;35(4):475-80.
43. Diegelmann RF, Evans MC. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Front Biosci.** 2004;9(283-9).

44. Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. **J Endod.** 1995;21(3):122-7.
45. Eldeniz AU, Erdemir A, Belli S. Shear bond strength of three resin based sealers to dentin with and without the smear layer. **J Endod.** 2005;31(4):293-6.
46. Eldeniz AU, Mustafa K, Orstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of new resin-, calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. **Int Endod J.** 2007;40(5):329-37.
47. Ersev H, Schmalz G, Bayirli G, Schweikl H. Cytotoxic and mutagenic potencies of various root canal filling materials in eukaryotic and prokaryotic cells in vitro. **J Endod.** 1999;25(5):359-63.
48. Estrela C. Ciências Endodônticas. São Paulo: Artes Médicas; 2004.
49. 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):341-4.
50. Fidel RA, Sousa Neto MD, Spano JC, Barbin EL, Pecora JD. Adhesion of calcium hydroxide-containing root canal sealers. **Braz Dent J.** 1994;5(1):53-7.
51. Figueiredo JA, Pesce HF, Gioso MA, Figueiredo MA. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. **Int Endod J.** 2001;34(5):377-85.
52. Friend LA, Browne RM. Tissue reactions to some root filling materials. **Br Dent J.** 1968;125(7):291-8.
53. Fujiwara N, Kobayashi K. Macrophages in inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy.** 2005;4(3):281-6.
54. 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 in skin fibrosis. **Clin Exp Allergy.** 2002;32(2):237-46.
55. 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.

56. Gesi A, Raffaelli O, Goracci C, Pashley DH, Tay FR, Ferrari M. Interfacial strength of Resilon and gutta-percha to intraradicular dentin. **J Endod.** 2005;31(11):809-13.
57. Geurtsen W. Biocompatibility of root canal filling materials. **Aust Endod J.** 2001;27(1):12-21.
58. 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.
59. Gomes-Filho JE, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CR, Souza-Filho FJ. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers using subcutaneous implants. **J Appl Oral Sci.** 2007;15(3):186-94.
60. Gomes BP, Pedroso JA, Jacinto RC, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. **Braz Dent J.** 2004;15(1):30-5.
61. Gordon S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol.** 2003;3(1):23-35.
62. Gosain AK, Song L, Riordan P, Amarante MT, Nagy PG, Wilson CR, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. **Plast Reconstr Surg.** 2002;109(2):619-30.
63. 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.
64. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. **Dent Mater.** 1996;12(3):186-93.
65. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. **Int Endod J.** 2003a;36(2):75-85.
66. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. **Int Endod J.** 2003b;36(3):147-60.

67. Hiraishi N, Papacchini F, Loushine RJ, Weller RN, Ferrari M, Pashley DH, et al. Shear bond strength of Resilon to a methacrylate-based root canal sealer. **Int Endod J.** 2005;38(10):753-63.
68. 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.
69. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabe PF, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **J Endod.** 1999;25(3):161-6.
70. Horsted P, Fejerskov O, Johannesen G. A model for experimental endodontics by transplanting human dental roots subcutaneously to rats. **Scand J Dent Res.** 1980;88(5):412-7.
71. 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.
72. Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. **Biomaterials.** 2002;23(1):77-83.
73. 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.
74. Jordana M. Mast cells and fibrosis--who's on first? **Am J Respir Cell Mol Biol.** 1993;8(1):7-8.
75. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido conjuntivo. In: Junqueira, LC, Carneiro, J., editor. *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. p. 92-124.
76. Kaplan AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. **Int Endod J.** 2003;36(8):527-32.
77. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. **J Endod.** 1996;22(6):311-6.

78. Key JE, Rahemtulla FG, Eleazer PD. Cytotoxicity of a new root canal filling material on human gingival fibroblasts. **J Endod.** 2006;32(8):756-8.
79. Kim YK, Grandini S, Ames JM, Gu LS, Kim SK, Pashley DH, et al. Critical review on methacrylate resin-based root canal sealers. **J Endod.** 2010;36(3):383-99.
80. 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):82-5.
81. Kou PM, Babensee JE. Macrophage and dendritic cell phenotypic diversity in the context of biomaterials. **J Biomed Mater Res A.** 2011;96(1):239-60.
82. Kozam G, Mantell GM. The effect of eugenol on oral mucous membranes. **J Dent Res.** 1978;57(11-12):954-7.
83. Laskin DL. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. **Chem Res Toxicol.** 2009;22(8):1376-85.
84. 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.
85. Leonardo MR. Tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos: Artes Médicas; 2005.
86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. Leonardo MR, Silva LA, 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.

90. Lodiene G, Morisbak E, Bruzell E, Orstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. **Int Endod J**. 2008;41(1):72-7.
91. Makkes PC, van Velzen SK, Wesselink PR, de Greeve PC. Polyethylene tubes as a model for the root canal. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1977;44(2):293-300.
92. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol**. 2004;25(12):677-86.
93. 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.
94. Mauricio CV. Estudo histomorfológico do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao implante de pastas à base de hidróxido de cálcio, contidas em tubos de dentina humana. Araraquara: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 1980.
95. Melegari KK, Botero TM, Holland GR. Prostaglandin E production and viability of cells cultured in contact with freshly mixed endodontic materials. **Int Endod J**. 2006;39(5):357-62.
96. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. **Endod Dent Traumatol**. 2000;16(1):1-8.
97. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **J Immunol**. 2000;164(12):6166-73.
98. Mittal M, Chandra S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. **J Endod**. 1995;21(12):622-4.
99. Molloy D, Goldman M, White RR, Kabani S. Comparative tissue tolerance of a new endodontic sealer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1992;73(4):490-3.
100. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. **J Leukoc Biol**. 2003;73(2):209-12.
101. 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.

102. 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.
103. Olsson B, Sliwkowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. **J Endod.** 1981;7(8):355-67.
104. Onay EO, Ungor M, Ozdemir BH. In vivo evaluation of the biocompatibility of a new resin-based obturation system. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2007;104(3):e60-6.
105. Perassi FT, Filho IB, Berbert FL, Carlos IZ, de Toledo Leonardo R. Secretion of tumor necrosis factor-alpha by mouse peritoneal macrophages in the presence of dental sealers, sealapex and endomethasone. **J Endod.** 2004;30(7):534-7.
106. 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.
107. Resende LM, Rached-Junior FJ, Versiani MA, Souza-Gabriel AE, Miranda CE, Silva-Sousa YT, et al. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. **Int Endod J.** 2009;42(9):785-93.
108. Rezende TM, Vargas DL, Cardoso FP, Sobrinho AP, Vieira LQ. Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. **Int Endod J.** 2005;38(12):896-903.
109. Rezende TM, Vieira LQ, Cardoso FP, Oliveira RR, de Oliveira Mendes ST, Jorge ML, et al. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. **Int Endod J.** 2007;40(8):603-11.
110. Ribeiro FC, Souza-Gabriel AE, Marchesan MA, Alfredo E, Silva-Sousa YT, Sousa-Neto MD. Influence of different endodontic filling materials on root fracture susceptibility. **J Dent.** 2008;36(1):69-73.
111. Ribeiro SML, Campos P, Tirapegui J. O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso. **Rev Farm Bioq Univ S Paulo.** 1995;31(21-8).

112. Rodrigues Sosa SA. Reação histopatológica do tecido conjuntivo do dorso de ratos irradiados com laser de CO₂ ou de Er:YAG. Araraquara: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2004.
113. Scarparo RK, Grecca FS, Fachin EV. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. **J Endod.** 2009;35(2):229-32.
114. Schmalz G. Concepts in biocompatibility testing of dental restorative materials. **Clin Oral Investig.** 1997;1(4):154-62.
115. Schmalz G. Materials science: biological aspects. **J Dent Res.** 2002;81(10):660-3.
116. Schwartz RS. Adhesive dentistry and endodontics. Part 2: bonding in the root canal system-the promise and the problems: a review. **J Endod.** 2006;32(12):1125-34.
117. Segura JJ, Jimenez-Rubio A. Effect of eugenol on macrophage adhesion in vitro to plastic surfaces. **Endod Dent Traumatol.** 1998;14(2):72-4.
118. Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. **Arch Oral Biol.** 1991;36(2):117-28.
119. 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.
120. 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.
121. 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.
122. Silva LA, Leonardo MR, Faccioli LH, Figueiredo F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. **J Endod.** 1997;23(2):86-90.
123. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med.** 1999;341(10):738-46.

124. Siqueira JF. Reaction of periradicular tissues to root canal treatment: benefits and drawbacks. **Endodontic Topics**. 2005;10(1):123-47.
125. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Abad EC, Castro AJ, Gahyva SM, Favieri A. Ability of three root-end filling materials to prevent bacterial leakage. **J Endod**. 2001a;27(11):673-5.
126. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Lopes HP, de Uzeda M. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. **J Endod**. 1999;25(1):14-6.
127. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Valois CR. Apical sealing ability of five endodontic sealers. **Aust Endod J**. 2001b;27(1):33-5.
128. Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**. 1997;30(5):297-306.
129. 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.
130. Sousa CJ, Loyola AM, Versiani MA, Biffi JC, Oliveira RP, Pascon EA. A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. **Int Endod J**. 2004;37(11):738-48.
131. Sousa CJ, Montes CR, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers. **J Endod**. 2006;32(7):656-62.
132. 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.
133. Souza SF, Bombana AC, Francci C, Goncalves F, Castellan C, Braga RR. Polymerization stress, flow and dentine bond strength of two resin-based root canal sealers. **Int Endod J**. 2009;42(10):867-73.
134. Spangberg L, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 1. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1973;35(3):402-14.

135. St John KR. Biocompatibility of dental materials. **Dent Clin North Am.** 2007;51(3):747-60, viii.
136. Standardization IOF. Dentistry-Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry-Test methods for dental materials. Genève, Switzerland 1997.
137. Stanford JW. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International, Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. **Int Dent J.** 1980;30(2):140-88.
138. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **J Immunol.** 2005;175(1):342-9.
139. Susini G, About I, Tran-Hung L, Camps J. Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with a root model. **Int Endod J.** 2006;39(12):940-4.
140. 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.
141. 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.
142. Tay FR, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough WF, Pashley DH, Mak YF, et al. Ultrastructural evaluation of the apical seal in roots filled with a polycaprolactone-based root canal filling material. **J Endod.** 2005;31(7):514-9.
143. 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.
144. 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.

145. 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.
146. Toriya Y, Hashiguchi I, Maeda K. Immunohistochemical examination of the distribution of macrophages and CGRP-immunoreactive nerve fibers in induced rat periapical lesions. **Endod Dent Traumatol.** 1997;13(1):6-12.
147. Torneck CD. Reaction of hamster tissue to drugs used in sterilization of the root canal. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1961;14(730-47.
148. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. I. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1966;21(3):379-87.
149. Ungor M, Onay EO, Orucoglu H. Push-out bond strengths: the Epiphany-Resilon endodontic obturation system compared with different pairings of Epiphany, Resilon, AH Plus and gutta-percha. **Int Endod J.** 2006;39(8):643-7.
150. Veloso HH, do Santos RA, de Araujo 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.
151. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, et al. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2004;101(13):4560-5.
152. 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.
153. Wataha JC, Lockwood PE, Bouillaguet S, Noda M. In vitro biological response to core and flowable dental restorative materials. **Dent Mater.** 2003;19(1):25-31.
154. 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.
155. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. **J Endod.** 2004;30(2):95-9.

156. Yesilsoy C, Koren LZ, Morse DR, Kobayashi C. A comparative tissue toxicity evaluation of established and newer root canal sealers. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1988;65(4):459-67.
157. Zafalon EJ, Versiani MA, de Souza CJ, Moura CC, 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(5):e88-94.
158. Zambuzzi WF, Oliveira RC, Pereira FL, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM. Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. **Braz Dent J.** 2006;17(4):274-8.
159. 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.
160. Zmener O, Banegas G, Pameijer CH. Bone tissue response to a methacrylate-based endodontic sealer: a histological and histometric study. **J Endod.** 2005;31(6):457-9.
161. Zmener O, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biocompatibility of two calcium hydroxide-based endodontic sealers: a quantitative study in the subcutaneous connective tissue of the rat. **J Endod.** 1988;14(5):229-35.
162. Zmener O, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Tissue response to an experimental calcium hydroxide-based endodontic sealer: a quantitative study in subcutaneous connective tissue of the rat. **Endod Dent Traumatol.** 1990;6(2):66-72.
163. 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.
164. Zmener O, Pameijer CH, Serrano SA, Vidueira M, Macchi RL. Significance of moist root canal dentin with the use of methacrylate-based endodontic sealers: an in vitro coronal dye leakage study. **J Endod.** 2008;34(1):76-9.

ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531/4173; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 016/09 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Projeto Pesquisa: **"Avaliação in vitro in vivo do padrão de resposta produzida pelo sistema obturador Ephiphany - Resilon".**

Pesquisador Responsável: João Carlos Gabrielli Biffi

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO,

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 21 de janeiro de 2009.

Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella
Coordenadora do CEUA/UFU