

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
ENDODONTIA

ROBERTA KOCHENBORGER SCARPARO

ANÁLISE DA REAÇÃO TECIDUAL A CIMENTOS ENDODÔNTICOS DE ÓXIDO
DE ZINCO E EUGENOL, À BASE DE RESINA EPÓXICA E À BASE DE RESINA
METACRILATO: ESTUDO “*IN VIVO*”.

Dissertação apresentada a Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Odontologia
– Endodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Vianna Freitas Fachin

Porto Alegre

2007

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

S286a

Scarparo, Roberta Kochenborger

Análise da reação tecidual a cimentos endodônticos de óxido de zinco e eugenol, à base de resina epóxica e à base de resina metacrilato: estudo “in vivo” / Roberta Kochenborger Scarparo. - 2007.

123 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Clínica Odontológica (Endodontia), Porto Alegre, 2007.

Orientadora: Elaine Vianna Freitas Fachin.

1. Endodontia 2. Obturação do canal radicular 3. Materiais biocompatíveis 4. Cimentos dentários I. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia II. Título.

CDU 616.314.18

De tudo ficam 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

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nos dar a coragem necessária para que a cada dia possamos utilizar nossa capacidade para superar desafios e conduzir caminhos que nos levem ao crescimento.

A minha família, meus irmãos Eduardo e Marcelo, meu pai Paulo Sergio, minha mãe Helena e minha avó Lacy. Agradeço imensamente pelo amor dedicado e pela presença ao meu lado me apoiando a superar obstáculos e a seguir em frente.

À querida “dindinha” Letícia Spano, pela amizade e companheirismo que marcam nossa convivência. Pelo exemplo de integridade e pelo carinho.

A Eva Maria dos Santos Fortunato, minha querida amiga. Pelo apoio e dedicação demonstrados a cada dia.

A minha Orientadora Elaine Vianna Freitas Fachin por oportunizar a realização de um objetivo, pelo incentivo e pela confiança sempre expressos em seus atos.

Aos alunos do Curso de Especialização em Endodontia do Hospital de Aeronáutica de Canoas e do Curso de Graduação da Faculdade de Odontologia da UFRGS por permitirem meu aprendizado e conseqüente crescimento pessoal e profissional. Pela excelente convivência sempre pautada por respeito e amizade.

Ao professor Nicolau Milano por ser um exemplo de dedicação ao ensino e à Odontologia. Pelos ensinamentos e pelo carinho.

A querida amiga e mestre Fabiana Soares Grecca pela competência, disponibilidade e carinho com os quais me auxiliou nesse estudo.

Aos meus mestres, amigos e colegas professores, Régis Burmeister dos Santos e João Ferlini Filho pelo exemplo e pelo carinho. Pela dedicação e apoio que me incentivam a seguir rumos semelhantes aos seus.

A amiga e colega, profa. Liliane Inês Sachet Massoni pelo companheirismo e cumplicidade. Por dividir sonhos e buscar novas conquistas.

A Reinaldo Benfica Neto pelo carinho e pelo exemplo de coragem e determinação.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação por dividirem dificuldades, tornando o caminho mais leve e permitindo a troca de experiências.

Ao professor Manoel Sant'Anna Filho pela dedicação e ajuda durante o desenvolvimento desse estudo.

A Isabel da Silva Lauxen e Luciana Adolfo Ferreira, pela competência e disponibilidade durante o preparo das lâminas histológicas.

Aos funcionários do Biotério da UFRGS, pelo imprescindível apoio oferecido.

A Gabriela Bagatini Bassegio, pela dedicação e ajuda dispendidas durante o período experimental desse estudo.

Enfim, a todos que estiveram presentes ao longo desses anos me incentivando e me ajudando a enfrentar dificuldades sem desviar de objetivos, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O presente estudo objetivou comparar histologicamente, nos períodos de 7, 30 e 60 dias, as reações ocorridas no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos a três cimentos endodônticos. Foi realizada a implantação de tubos de polietileno contendo um cimento endodôntico de óxido de zinco e eugenol (EndoFill), um cimento à base de resina epóxica (AH Plus), um cimento à base de resina metacrilato (EndoRez) e tubos vazios (grupo controle). Observou-se as características do componente celular inflamatório - atentando para a presença de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, macrófagos e células gigantes - da condensação fibrosa e da formação de abscesso. Foi realizada análise estatística entre os grupos realizada por meio do teste de Friedman, complementado pelo teste de Wilcoxon. Já as comparações entre os períodos de 7, 30 e 60 dias foram realizadas pelo teste de Kruskal Wallis complementado pelo teste U de Mann-Whitney.

Os resultados apontaram para maior intensidade da reação inflamatória promovida pelos cimentos EndoFill e EndoRez, especialmente no que se refere às características do infiltrado linfoplasmocitário e à presença de macrófagos, os quais se apresentaram em número estatisticamente superior aos demais grupos. A condensação fibrosa foi menos intensa nas amostras do cimento EndoFill, e a indução de abscesso foi bastante reduzida nos quatro grupos de estudo, não sendo observadas diferenças significativas.

O AH Plus apresentou uma tendência à redução das características da reação inflamatória, ainda que estatisticamente não tenham sido observadas diferenças entre os períodos avaliados (7,30 e 60 dias). Já os cimentos EndoFill e EndoRez apresentaram uma tendência à manutenção da reação inflamatória por períodos mais longos. Apenas no grupo controle houve redução significativa das características da reação inflamatória ao longo dos três períodos experimentais. Tais observações tornam evidente a ausência, entre os materiais testados, de um cimento com características ideais de biocompatibilidade.

Palavras-chave: endodontia, obturação do canal radicular, materiais biocompatíveis, cimentos dentários

ABSTRACT

The purpose of this study was to make a histological comparison, over 7- 30- and 60-day periods, of subcutaneous conjunctive tissue reactions to three endodontic sealers in rats. Polyethylene tubes containing a zinc-oxide and eugenol sealer (EndoFill), an epoxy-resin-based sealer (AH Plus), a methacrylate-resin-based sealer (EndoRez), together with empty tubes (control group) were implanted. The characteristics of the inflammatory cell component were observed for the presence of neutrophils, lymphocytes, plasmocytes, eosinophils, macrophages and giant cells, together with fibrous condensation and formation of tissue abscesses.

The results indicated a greater intensity of inflammatory reaction caused by the EndoFill and EndoRez sealers, particularly in relation to the characteristics of lymphoplasmocytic infiltration, and the presence of macrophages, which were statistically more evident than in the other groups. Fibrous condensation was less intense in the EndoFill samples, and abscess induction was considerably reduced in the four study groups, with no significant differences observed.

AH Plus presented a tendency for reducing the characteristics of the inflammatory reaction, although no statistical differences were noticed between the periods assessed (7, 30 and 60 days). The EndoFill and EndoRez sealers display a tendency for maintaining the inflammatory reaction for longer periods. Only the control group displayed a significant reduction in the characteristics of the inflammatory reaction over the three experimental periods. These observations demonstrate the absence of a sealer with ideal biocompatibility characteristics among the materials tested.

Keywords: endodontics, root canal obturation, biocompatible materials, dental cements

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

ADA - American Dental Association

ISO - International Standard Organization

ASTM - American Society for Testing and Materials

FDI – Fédération Dentaire Internationale

h – hora

CFU – unidades formadoras de colônias

ADA/ANSI – American Dental Association/ American National Standards Institute

ISO/FDI – international Standards Institute / Fédération Dentaire Internationale

mm – milímetro

PVC - poli cloreto de vinila

mg/kg – miligrama por quilograma

cm – centímetro

µm – micrômetro

ml – mililitro

l – litro

GI – Grupo I

GII – Grupo II

GIII – Grupo III

GIV – Grupo IV

GPPG/HCPA – Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE – Hematoxilina de Harris e Eosina

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LP- Infiltrado linfoplasmocitário

CP- Cápsula fibrosa

MC- Macrófagos

HM-Hemosiderina

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparação entre os grupos: 7 dias.	66
Gráfico 2. Comparação entre os grupos: 30 dias.	71
Gráfico 3. Comparação entre os grupos: 60 dias.	77
Gráfico 4. Comparação entre os tempos: Grupo I.	78
Gráfico 5. Comparação entre os tempos: Grupo II.	79
Gráfico 6. Comparação entre os tempos: Grupo III.	80
Gráfico 7. Comparação entre os tempos: Grupo IV.	81

LISTA DE SUBSTÂNCIAS CITADAS

Cimentos à base de resina epóxica

AH 26

AH Plus

Sealer Plus

Diaket

RC Sealer

Cimentos de óxido de zinco e eugenol

EndoFill

FillCanal

Cimento de Rickert

N-Rickert

N2

Endomethasone

Endomethasone N

Kerr PCS (Pulp Canal Sealer)

Roth 801

Roth 811

Tubli Seal

Canals

Cimento original de Grossman

Sealite

Cimentos à base de resina metacrilato

EndoRez

Epiphany

Cimentos à base de hidróxido de cálcio

Hypocal

Apexit

Sealapex

Cimentos à base de ionômero de vidro

Ketac-Endo

Endion

Outros cimentos

Sealer 26 – cimento à base de resina epóxica que contém hidróxido de cálcio em sua composição

MCS – Cimento que contém iodofórmio

Kloroperka/Eucapercha – materiais compostos por bálsamo canadense, resinas, gutapercha, óxido de zinco e clorofórmio

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Dorso do animal com identificação do local das quatro incisões onde foram implantados os tubos. **55**
- Figura 2:** Infiltrado linfoplasmocitário intenso(*) promovido pelo cimento EndoFill no período experimental de 7 dias. **62**
- Figura 3:** Aspecto da reação tecidual no grupo controle no período de 7 dias. **62**
- Figura 4:** Reação ao cimento AH Plus no período de 7 dias. Infiltrado linfoplasmocitário (*) e início da condensação fibrosa. **63**
- Figura 5:** Reação tecidual ao cimento EndoRez no período experimental de 7 dias. Nota-se a presença de infiltrado linfoplasmocitário(*) e de célula gigante (seta). **63**
- Figura 6:** Aspecto da reação tecidual ao cimento EndoFill no período pós-operatório de 30 dias. Nota-se presença de infiltrado inflamatório crônico (*) e de macrófagos (setas). **68**
- Figura 7:** Reação inflamatória no grupo controle no período experimental de 30 dias. Nota-se infiltrado linfoplasmocitário pouco intenso(*) e aumento da espessura da condensação fibrosa que envolve a reação inflamatória (setas). **68**
- Figura 8:** Aspecto do infiltrado inflamatório (*) produzido pelo cimento AH Plus no período de 30 dias pós-operatório. Nota-se também a presença de célula gigante (seta). **69**
- Figura 9:** Quadro histopatológico produzido pelo cimento EndoRez **69**

no período experimental de 30 dias. Nota-se infiltrado linfoplasmocitário intenso (*) e tecido rico em hemossiderina (setas).

Figura 10: Reação inflamatória ao cimento EndoFill no período pós-operatório de 60 dias. Nota-se manutenção do infiltrado inflamatório crônico (*) e a presença de abscesso (setas). **73**

Figura 11: Aspecto histopatológico de amostra do Grupo II no período experimental de 60 dias. Observa-se cicatrização do tecido. **73**

Figura 12: Aspecto da reação tecidual ao cimento AH Plus no período de 60 dias apresentando infiltrado inflamatório crônico moderado (*). **74**

Figura 13: Aspecto da reação inflamatória produzida pelo cimento EndoRez no período pós-operatório de 60 dias. Presença de infiltrado linfoplasmocitário (*) limitado por cápsula fibrosa (setas). **74**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre os grupos no período experimental de 07 dias.	64
Tabela 2. Comparação entre os grupos no período experimental de 30 dias.	70
Tabela 3. Comparação entre os grupos no período experimental de 60 dias.	75
Tabela 4. Comparação entre os tempos: Grupo I.	78
Tabela 5. Comparação entre os tempos: Grupo II.	80
Tabela 6. Comparação entre os tempos: Grupo III.	82
Tabela 7. Comparação entre os tempos: Grupo IV.	84

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 - Características gerais dos cimentos endodônticos	21
2.1.1 – Adesão e Capacidade de Selamento	25
2.1.2 – Capacidade Antimicrobiana	28
2.2 – Avaliação da biocompatibilidade de materiais	29
2.2.1 – Importância e definições	29
2.2.2 – Métodos utilizados	32
3. OBJETIVOS	52
4. METODOLOGIA	53
4.1 – Tipo de estudo	53
4.2 – Local de realização da pesquisa	53
4.3 – Descrição da amostra	53
4.4 – Métodos empregados	54
4.5 – Análise dos resultados	58
4.6 – Considerações éticas	59
5. RESULTADOS	60
6. DISCUSSÃO	86
6.1 – Sobre a metodologia empregada	87
6.2 – Da análise dos resultados	88
7. CONCLUSÕES	103
8. REFERÊNCIAS	105
9. ANEXOS	118

1. INTRODUÇÃO

A completa obturação do sistema de canais radiculares constitui um fator chave para o sucesso da terapia endodôntica. A principal razão para tanto é o fato de que, mesmo após o preparo biomecânico, as paredes do canal radicular podem conter microrganismos capazes de promover irritação aos tecidos periapicais (NGUYEN, 1994; PÉCORÁ; SOUZA-NETO, 2001).

Os materiais mais utilizados para o preenchimento dos canais radiculares são os cones de guta-percha associados aos cimentos endodônticos. Os cones de guta-percha são o material em estado sólido e compõem a maior parte da massa obturadora. O papel dos cimentos é preencher espaços residuais entre o material obturador sólido e as paredes do canal radicular (AHLBERG; TAY, 1998), obturando os túbulos dentinários e o forame apical contra a invasão microbiana (PÉCORÁ; SOUZA-NETO, 2001).

A obtenção do selamento ideal é extremamente difícil e, sendo assim, tem-se buscado um cimento endodôntico que, além de se adaptar à guta-percha e às paredes dentinárias do canal radicular, não sofra alterações dimensionais. Somadas a isso, características como capacidade antimicrobiana, facilidade de manipulação, radiopacidade, facilidade de remoção do canal radicular e a não alteração de cor do elemento dental também são almejadas (GEORGOUPOLOU et al, 1995; PÉCORÁ; SOUZA NETO, 2001).

Para que estas características possam auxiliar no sucesso da terapia endodôntica, é imprescindível que o material obturador seja biocompatível, de modo a favorecer o selamento biológico da região periapical. Sendo assim, a determinação do comportamento biológico de um material é indispensável, pois proporciona parte do

embasamento científico necessário à aplicação de práticas terapêuticas bem fundamentadas (COSTA, 2001a). Em especial na Endodontia, a biocompatibilidade de um cimento obturador está relacionada com a sua capacidade de oferecer condições ou até mesmo de favorecer o reparo (BERBERT et al, 2002).

Sabe-se que o comprometimento dos tecidos lesados é um aspecto que influencia negativamente o processo de cura, o qual inicia com mais rapidez quando a intensidade da irritação sofrida for baixa (MENDONÇA; ESTRELA, 2001). Portanto, são considerados apropriados do ponto de vista biológico cimentos obturadores que apresentem boa tolerância tecidual, sejam reabsorvidos no periápice em casos de extravasamento acidental e permitam o reparo, contribuindo para que se obtenha a menor agressão possível aos tecidos periapicais.

Está claro que respeitar o limite apical de trabalho, visando a atuar dentro do canal dentinário, contribui para a diminuição de agressões mecânicas e químicas impostas aos tecidos durante a terapia endodôntica, melhorando conseqüentemente as condições para o reparo. Mendonça e Estrela (2001) concordam que o extravasamento de material no periodonto apical dificulta o desenvolvimento do processo de reparo e afirmam que as repercussões de tais acidentes podem permanecer como lesões inflamatórias crônicas. No caso de extravasamento, o reparo se dá através da fagocitose por células inflamatórias e do encapsulamento do "objeto estranho" por um tecido conjuntivo fibroso.

Por outro lado, boas condições de biocompatibilidade de um material que venha a ser extravasado acidentalmente podem minimizar os danos causados, evitando que as irritações química e mecânica conduzam a uma inflamação crônica persistente (SELTZER, 1967; SELTZER, 1971).

A guta-percha tem sido considerada uma substância não-tóxica e bem aceita pelos tecidos vivos (HUNTER, 1957). De acordo com Seltzer (1971) a guta-percha extruída é encapsulada por fibrose, uma vez que os macrófagos não conseguem fagocitá-la.

Por outro lado, ainda se busca um cimento que proporcione um bom selamento e seja bem tolerado (LIGOCKI, 1998). É sabido que os cimentos endodônticos promovem algum grau de resposta inflamatória. Entretanto, essa resposta deve ser clinicamente aceitável e restrita a curtos períodos de tempo. Desta forma, o material obturador deve, após as reações pós-operatórias iniciais, tornar-se tão inerte quanto possível (YESILSOY et al, 1988).

Nesse sentido, para que um novo cimento endodôntico seja considerado mais vantajoso que os já estabelecidos no mercado, é necessário que seja realizado um conjunto de análises que permita identificar suas características físicas e de biocompatibilidade, e, após, possa-se averiguar clinicamente a sua eficácia.

Dentre os cimentos disponíveis no mercado estão os cimentos de óxido de zinco e eugenol, os cimentos à base de resina epóxica, os cimentos à base de resina metacrilato, os cimentos à base de hidróxido de cálcio e os cimentos à base de ionômero de vidro. Nesse estudo, pretendemos avaliar especialmente um cimento de óxido de zinco e eugenol (EndoFill), um cimento à base de resina epóxica (AH Plus) e um cimento a base de resina metacrilato (EndoRez).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. 1. Características gerais dos cimentos endodônticos

O presente estudo focalizou aspectos relacionados aos cimentos de óxido de zinco e eugenol, cimentos à base de resina epóxica e cimentos à base de resina metacrilato.

Os cimentos de óxido de zinco e eugenol foram introduzidos por Grossman em 1958, sofrendo alterações em sua fórmula original. Basicamente, apresentam a formulação pó-líquido, sendo o pó composto por óxido de zinco, resina Staybelite, subcarbonato de bismuto, sulfato de bário e borato de sódio anidro e o líquido por eugenol (LIGOCKI, 1998). Apesar do surgimento de novos materiais, os cimentos endodônticos de óxido de zinco e eugenol ainda hoje são amplamente utilizados, reunindo qualidades como o baixo custo, facilidade de manipulação e boa radiopacidade (TRONSTAD, 1991). Entre os cimentos comercialmente disponíveis situam-se o EndoFill, o cimento de Rickert, o N-Rickert, o N2, o Pulp Canal Sealer e o Endomethasone.

O EndoFill, de acordo com o fabricante (Dentsply HERO Indústria e Comércio Ltda. – Petrópolis- RJ, Brasil), possui a seguinte composição:

Pó:

-Óxido de Zinco

-Resina Hidrogenada

-Subcarbonato de Bismuto

-Sulfato de Bário

-Borato de Sódio

Líquido:

-Eugenol e óleos de amêndoas doces

Já os cimentos à base de resina epóxica surgiram como alternativa aos cimentos existentes no mercado, ganhando seu espaço em função de características como adesão à estrutura dentária, longo tempo de trabalho, facilidade de manipulação e bom escoamento (LEAL, 1998). O cimento AH-26 surgiu como uma alternativa em 1957, sendo uma combinação macromolecular sintética do grupo das resinas epóxicas que apresenta a formulação um pó (óxido de bismuto, prata pulverizada, dióxido de titânio e hexametilenotetramina) e uma resina base (éter de bisfenol A diglicídil). A partir de então, diversas modificações e alternativas foram sendo produzidas e deram origem a uma variada gama de cimentos endodônticos à base de resina epóxica, como o TopSeal, o Sealer 26 e o AH Plus. O AH Plus é, portanto, um cimento à base de resina epóxica, criado a partir de modificações na fórmula do cimento AH 26 (SALLES, 2001).

O AH Plus é composto por um sistema pasta-pasta: pasta A ou “pasta epóxi” e pasta B ou “pasta amina”. De acordo com o fabricante (Dentsply HERO Indústria e Comércio Ltda. – Petrópolis- RJ, Brasil), o AH Plus possui a seguinte formulação:

Pasta Epóxi:

- Resinas epóxicas

- Tungstanato de cálcio

- Óxido de zircônio

- Sílica

- Óxido de ferro

Pasta Amina:

- Aminas

- Tungstanato de cálcio

- Óxido de Zircônio

- Sílica

- Óleo de silicone

Mais recentemente têm sido introduzidos na prática endodôntica os cimentos à base de resina metacrilato, dentre os quais podemos citar o cimento Epiphany e o EndoRez. Os cimentos à base de resina metacrilato foram inicialmente desenvolvidos para utilização em cirurgias ortopédicas envolvendo tecido ósseo. O cimento ortopédico original possui como componentes um polímero polimetacrilato (preferencialmente o polietilmetacrilato) e um monômero na forma líquida, composto do n-butilmetacrilato e de uma amina que ativa o composto, tal como a N,N dimetil p-toluidina. Estudos preliminares com a resina original mostraram boa adesividade com a dentina e com a guta-percha, além de resultados favoráveis em estudos de citotoxicidade. Entretanto, algumas características indesejáveis também foram notadas, tais como curto tempo de trabalho e infiltração apical. A fim de corrigir esses problemas, algumas modificações foram testadas, dando origem a cimentos para uso endodôntico. O cimento passou por

modificações na composição do polímero e do monômero e na proporção polímero/monômero, além da adição de partículas tais como óxido de zinco, hidroxiapatita e ionômero de vidro na tentativa de melhorar sua capacidade de selamento (AHLBERG; TAY, 1998).

O EndoRez é disponibilizado em duas pastas inseridas em uma seringa com compartimentos separados, as quais devem ser misturadas em proporções iguais por meio de um dispositivo de mistura acoplado. O cimento é composto de óxido de zinco, sulfato de bário, resinas e pigmentos inseridos em uma matriz resinosa de uretano dimetacrilato.

De acordo com o fabricante (Ultradent Products, Inc., South Jordan, Utah, USA), O EndoRez apresenta a seguinte composição:

Pasta Base/ Pasta Catalisadora:

-Uretano Dimetacrilato 30%

-Clorexidina 1%

Ainda em relação às propriedades físico-químicas dos cimentos endodônticos, Carvalho-Júnior et al (2003) avaliaram se as características de solubilidade, desintegração e alterações dimensionais dos cimentos Ketac-Endo, EndoFill, N-Rickert e Sealer 26 estavam de acordo com as recomendações da *American National Standards Institute* (ADA). Em relação à estabilidade dimensional todos os cimentos apresentaram-se adequados. Quanto à solubilidade e desintegração os cimentos EndoFill e Ketac-Endo apresentaram valores acima dos desejados.

Versaini, et al (2006) compararam propriedades físico-químicas de um cimento à base de resina epóxica (AH Plus) e de um cimento a base de resina metacrilato (Epiphany) , verificando características como a solubilidade, e alterações dimensionais desses materiais. Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes para o escoamento e espessura do filme dos materiais. O cimento Epiphany sofreu maiores alterações dimensionais, com expansão de 8,1% contra 1,3% do AH Plus, e maior solubilidade. Nesses quesitos foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

2.1.1 – Adesão, Escoamento e Capacidade de Selamento

De Deus et al (2002) avaliaram *in vitro* a penetração intratubular do EndoFill, AH plus, Sealapex e do Pulp Canal Sealer em microscopia eletrônica de varredura (MEV). Concluíram que o cimento de Rickert (Pulp Canal Sealer) foi o que apresentou maior capacidade de penetração intradentinária e o cimento de hidróxido de cálcio (Sealapex), a menor. Os demais cimentos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si para essa variável. Também observaram que a lama dentinária influenciou negativamente a penetração intradentinária dos cimentos testados.

Kopper et al (2003) testaram em cães a capacidade de selamento coronário dos cimentos AH Plus, EndoFill e Sealer 26. Os dentes foram preparados e obturados, sendo posteriormente desobturados até o terço apical. Os dentes foram temporariamente selados com restaurações de ionômero de vidro, a fim de que a presa dos materiais fosse obtida. Após 72 horas o material selador foi removido, e os canais permaneceram expostos ao ambiente bucal por 45 dias. Concluíram que nenhum dos cimentos é capaz de promover selamento e ausência de infiltração coronária. Entretanto, foi observada

diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo menores as médias de infiltração observadas para o AH Plus e maiores as observadas para o Sealer 26.

Apesar da boa adesão à guta-percha atribuída aos cimentos à base de resina metacrilato, autores como Kardon et al (2003) verificaram deficiências em relação à habilidade seladora do EndoRez quando este é utilizado com técnica de obturação que empregue cone único. Segundo os autores, a utilização do EndoRez em associação com cone único apresenta infiltração apical significativamente maior do que a observada após a obturação de canais com o cimento AH Plus com técnica de cone único ou com técnica de termoplatificação com os sistemas *System B* e *Obtura*.

Cobankara et al (2006) observaram a infiltração apical em dentes obturados com os cimentos Rocanal 2, Sealapex, AH Plus e RC Sealer, utilizando a técnica de condensação lateral da guta-percha. Os autores observaram as amostras em 7, 14 e 21 dias, verificando melhores resultados para o Sealapex em todos os períodos experimentais. Os demais cimentos não diferiram estatisticamente em relação à infiltração apical.

Yücel et al (2006) compararam *in vitro* a penetração bacteriana apical de *Enterococcus faecalis* após obturação dos canais com quatro cimentos endodônticos. Após 30 dias, foi observada a penetração de bactérias em toda a extensão dos canais em 80% das raízes obturadas com AH Plus ou com Ketac-Endo, em 85% dos canais obturados com Sealapex e em 75% daqueles em que o AH 26 foi utilizado, representando ausência de diferença estatística entre os grupos. Após 60 dias, foi observada penetração total de bactérias em 100% dos canais obturados com AH Plus, Ketac-Endo e Sealapex e em 95% daqueles obturados com AH 26.

Orucoglu, Sengun e Yilmaz (2005) testaram a infiltração apical obtida após a obturação de canais pela técnica de condensação lateral da guta-percha empregando os cimentos AH Plus, EndoRez e Diaket. Para tanto, utilizaram um modelo computadorizado de quantificação de umidade, medida após expor as raízes preparadas em ambiente a 37°C com 100% de umidade por 7 dias. Concluíram que o cimento Diaket permitiu melhores resultados, enquanto o EndoRez e o AH Plus não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si.

De Deus et al (2006) estudaram em dentes extraídos a capacidade de selamento dos cimentos Pulp Canal Sealer, EndoRez, Sealapex e AH Plus em duas diferentes espessuras. Para tanto, metade das amostras foi preenchida com cilindros de guta-percha de 1mm enquanto as demais foram preenchidas com cilindros de guta-percha de 1,5mm, pré-fabricados em moldes metálicos pela injeção de guta-percha termoplastificada, permitindo que fossem utilizadas camadas mais finas e mais espessas dos cimentos para obturação dos canais. Todos os cimentos foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes. As raízes foram mantidas em um modelo próprio para testar infiltração bacteriana por 12 semanas. De maneira geral, camadas mais espessas de cimento influenciaram negativamente em relação à infiltração apical. Os resultados mostraram não haver diferença estatisticamente significativa em relação à infiltração entre os cimentos quando finas camadas foram testadas. Em maior espessura o AH Plus revelou melhor desempenho.

Recentemente, Hiraishi et al (2006) investigaram a possibilidade de a remoção acidental da camada inibidora de oxigênio da superfície de cones de guta-percha durante seu acondicionamento reduzir sua adesão de cimentos à base de resina metacrilato. Para tanto, testaram a aplicação de uma camada de adesivo dual sobre a guta-percha,

concluindo que ocorre a otimização da adesividade entre cones de guta-percha e o cimento EndoRez. Sugerem que tal prática possa melhorar a capacidade de selamento do cimento.

2.1.2 - Capacidade Antimicrobiana

Gomes et al (2004) testaram *in vitro* a capacidade antimicrobiana de cinco cimentos endodônticos (Endomethasone, Endomethasone N, AH Plus, EndoFill e Sealer 26) contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces naeslundii*, utilizando os métodos de contato direto e de difusão em ágar, nos períodos imediatamente após sua manipulação e após 24 h, 48 h e 7 dias. Nas duas metodologias utilizadas, após 24h, os cimentos EndoFill e Endomethasone mostraram maior capacidade antimicrobiana para todas as espécies testadas e o Sealer 26 foi o menos efetivo. Nos demais períodos experimentais não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

Saleh et al (2004) investigaram a capacidade de diversos cimentos endodônticos e do hidróxido de cálcio de eliminar microrganismos em túbulos dentinários. Dentes extraídos tiveram segmentos de suas raízes preparados e autoclavados, sendo posteriormente infectados experimentalmente com *Enterococcus faecalis*. Após sete dias, amostras da dentina dos canais foram coletadas para análise do número de unidades formadoras de colônias (CFU) presentes nos túbulos dentinários. Concluíram que canais obturados com guta-percha e com os cimentos de Grossman ou com o AH Plus foram efetivos em eliminar os microrganismos dos túbulos, enquanto os outros cimentos endodônticos testados (Ketac-Endo, Apexit, Roekoseal Automix e Roekoseal Automix com primer experimental), bem como o hidróxido de cálcio, foram menos efetivos.

Kayaoglu, Erten e Alaçam (2005) investigaram a atividade antimicrobiana de diversos cimentos endodônticos, permitindo e evitando o contato direto entre o cimento e *Enterococcus faecalis*. O teste de contato direto mostrou que os cimentos MCS (um cimento que contém iodofórmio em sua composição) e AH Plus (um cimento a base de resina epóxica) eliminaram as bactérias em níveis inferiores aos detectados pelo experimento. Tanto o MCS quanto o AH Plus foram seguidos em ordem decrescente de eficácia antimicrobiana pelo cimento de Grossman, pelo Apexit e pelo Sealapex. Nos testes de contato indireto foram eficazes o MCS, o AH Plus e o cimento de Grossman. O Sealapex e o Apexit não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle.

Sipert et al (2005) examinaram *in vitro* a atividade antimicrobiana de cimentos de óxido de zinco e eugenol (Sealapex e Fill Canal), à base de resina metacrilato (EndoRez), do agregado trióxido mineral (MTA) e do cimento de Portland contra várias espécies de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. O Sealapex e o Fill Canal mostraram atividade antimicrobiana para todas as espécies testadas. Já o MTA e o cimento de Portland apenas não inibiram *Escherichia coli*, e o EndoRez não apresentou qualquer atividade antimicrobiana.

2.2- Avaliação da biocompatibilidade de materiais

2.2.1- Importância e definições

O aprimoramento da definição de *biocompatibilidade* está intimamente relacionado com a busca por definir metodologias apropriadas para a avaliação dessa característica. A *International Standard Organization* (ISO) regulamenta os testes

biológicos de materiais dentários, recomendando a realização de testes iniciais (testes de citotoxicidade, testes de mutagenicidade e testes de toxicidade sistêmica via oral), de testes secundários (implantes subcutâneos, musculares e ósseos e testes de sensibilização e irritação) e de testes de uso (testes clínicos). A ISO 10993 (1991) e a ISO 7405 (1997) consideram alguns requisitos básicos para a realização de testes biológicos em humanos, quais sejam, a realização de uma profunda revisão de literatura, testes *in vitro*, e *in vivo* em animais e, apenas posteriormente, testes clínicos em humanos.

Apesar da importância da determinação da compatibilidade biológica de materiais, vários aspectos relacionados ao assunto não apresentam consenso no meio científico. Tanto é assim que o próprio conceito de *biocompatibilidade* é bastante variável. A ASTM (2006) (*American Society for Testing and Materials*) define biocompatibilidade como a avaliação da resposta produzida pelo íntimo contato de um material com os tecidos vivos do hospedeiro em comparação à resposta produzida por um grupo controle. Tais aspectos, apesar de serem bem aplicados a pesquisas que envolvam animais experimentais - parte importante no processo de determinação da compatibilidade biológica - não contemplam a abrangência necessária ao conceito, a qual deve envolver aspectos relacionados à resposta terapêutica esperada em decorrência de interações entre o material e os sistemas biológicos do indivíduo. Já a definição encontrada no *Dorland's Medical Dictionary* (2006) é de que biocompatibilidade é a qualidade de não promover efeitos tóxicos ou deletérios em sistemas biológicos. Tal conceito apresenta como falha a não consideração da interação entre o material e a resposta do hospedeiro, definindo a biocompatibilidade apenas como ausência de resposta. A partir dessas críticas, novas definições foram sugeridas, no sentido de permitir incluir no conceito aspectos relacionados a respostas

positivas e desejáveis. Sendo assim, de acordo com Willians (1999) biocompatibilidade é a habilidade de um material de atuar em aplicação específica com resposta adequada do hospedeiro. De forma semelhante, Costa (2001a) define biocompatibilidade como a capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos, sem, contudo, causar danos ou prejuízos ao hospedeiro.

Craig e Powers (2004) definem biocompatibilidade como a capacidade de um material extrair uma resposta biológica apropriada quando aplicado em um corpo. O fato de um material ser biocompatível ou não depende da função física que se solicita do material e de qual resposta biológica necessita-se dele.

Quando determinado material é colocado em contato com os tecidos e fluidos corporais, invariavelmente há alguma forma de interação entre o material e o ambiente biológico. Um material pode ser biocompatível quando possui a qualidade de não ser destrutivo ao ambiente. É importante observar que essa interação ocorre de ambos os lados, ou seja, o material pode ser afetado de alguma forma pelo ambiente biológico, bem como o ambiente biológico pode ser afetado pelo material (VAN NOORT, 2004).

Dessa forma, a determinação da compatibilidade biológica de um material deve envolver testes iniciais, testes secundários e testes de aplicação (pré-clínicos), para que, posteriormente, as reações provocadas pelo material possam ser monitoradas e avaliadas nas suas diversas aplicações em seres humanos, e possa ser determinada sua eficácia e segurança em procedimentos clínicos de rotina (COSTA, 2001a).

2.2.2 Métodos utilizados

A) Testes iniciais

Os testes iniciais determinam, de maneira preliminar, o comportamento biológico de materiais e de seus componentes. Parâmetros relacionados com o crescimento celular, com a morfologia celular, com o conteúdo protéico das células e com a liberação de prostaglandinas têm sido utilizados com esse propósito (WILLERSHAUSEN et al, 2000). Os testes de citotoxicidade apresentam como vantagem o fato de permitirem o desenvolvimento de metodologias estandardizadas e reproduzíveis, sendo assim amplamente utilizados. Esses testes permitem avaliar a viabilidade das células após o contato com os materiais em diferentes períodos experimentais.

Um dos testes de citotoxicidade *in vitro* mais utilizados é o da marcação radioativa das células em cultura através do emprego de cromato de sódio. Após a morte celular, a liberação dos marcadores radioativos, os quais normalmente se aderem a diversos constituintes protéicos das células, possibilita a quantificação do dano celular causado pelo material experimental. Outra metodologia bastante utilizada é o método do *Filtro de Millipore*, na qual a avaliação da citotoxicidade dos materiais é realizada através da demonstração citoquímica da desidrogenase succínica, permitindo a verificação da atividade mitocondrial das células. Já o teste para cultura de células em *Agar Overlav* determina a toxicidade aguda dos materiais experimentais através da aplicação direta dos materiais ou pela análise do seu extrato. Há também a possibilidade de testes de citotoxicidade que realizam a contagem do número de células antes e após o contato com materiais e produtos testes, e avaliam o metabolismo celular, o halo celular

ao redor dos corpos de prova e a morfologia das células em microscopia eletrônica de varredura (COSTA, 2001b).

A viabilidade celular também pode ser avaliada em termos de proliferação celular (número de células em diferentes períodos experimentais) e adesão celular (NEFF; LAYMAN; JEANSONNE, 2002). Outros testes observam características como a influência dos cimentos sobre a atividade de macrófagos (MENDES et al, 2003). Testes de genotoxicidade e de mutagenicidade (CAMPS; ABOUT, 2003) também têm sido realizados *in vitro*.

Essas características têm sido avaliadas em Endodontia em culturas de diversos tipos celulares, como fibroblastos do tecido gengival humano (BRISEÑO; WILLERSHAUSEN, 1991; WILLERSHAUSEN et al, 2000; TAI; HUANG; CHANG, 2001), e fibroblastos do tecido nasal humano (WILLERSHAUSEN et al., 2000), células epiteliais tumorais (WILLERSHAUSEN et al., 2000), fibroblastos do tecido pulmonar de roedores (TAI; HUANG; CHANG; 2001) e fibroblastos do tecido pulpar humano (CAVALCANTI; RODE; MARQUES, 2005), entre outros, na dependência da metodologia empregada e das características do material a ser testado.

Testes iniciais em Endodontia

Koulazidou et al (1998) testaram *in vitro* a citocompatibilidade do AH26, AH Plus e Topseal, sob linhagens celulares fibroblastos e polpa de ratos. Observaram que o AHPlus apresentou os menores efeitos citotóxicos nos períodos de 24 e 48 horas.

Levando em consideração que o potencial de agressão tecidual do formaldeído poderia retardar ou impedir o reparo endodôntico, e que a substância pode ser formada mesmo em cimentos que não a contém em sua fórmula, Leonardo et al (1999a)

investigaram sua liberação pelos cimentos AH26, AH Plus, Endomethasone e Topseal. Espectroscopia infra-vermelha e eletrônica foram utilizadas para determinar o conteúdo de formaldeído nos cimentos após sua manipulação e presa. Os resultados mostraram que os cimentos AH26 e Endomethasone liberam formaldeído, e que os cimentos AH Plus e Topseal também apresentam liberação de formaldeído, embora em concentrações mínimas.

Willershausen et al (2000) investigaram a citotoxicidade do Sealapex, Endion, Super-Eba , Ketac-Endo, AH Plus, da guta-percha tradicional e da guta-percha com base de hidróxido de cálcio sobre culturas de fibroblastos gengivais humanos, fibroblastos nasais e células epiteliais tumorais, avaliando o crescimento celular, a morfologia celular, a viabilidade celular, o conteúdo protéico das células e a liberação de prostaglandinas. O conteúdo proteico foi significativamente reduzido em todas as linhagens testadas e em todos os grupos. Também foi notada redução do crescimento celular para todos os materiais testados. Houve aumento significativo nos níveis de liberação de prostaglandinas para os cimentos Ketac-Endo e AH Plus e um nível moderado de aumento dessa substância para o grupo da guta-percha e da guta-percha com base de hidróxido de cálcio.

Tai, Huang Chang (2001) testaram a citocompatibilidade dos cimentos AH Plus (um cimento a base de resina epóxica), Canals e N2 (cimentos a base de óxido de zinco e eugenol) sobre linhagens celulares de fibroblastos da mucosa bucal e da mucosa gengival de humanos e sobre fibroblastos pulmonares de *hamsters*. A viabilidade das células após o contato com os cimentos foi avaliada em dois períodos (1 e 3 dias). Os autores concluíram que os cimentos são citotóxicos nos testes realizados para as três

linhagens de células nos dois períodos experimentais. O AH plus foi o menos citotóxico e o N2 o que apresentou os piores resultados.

Huang et al (2002) avaliaram *in vitro* o efeito citotóxico e mutagênico de dois cimentos endodônticos a base de resina epóxica – AH26 e AH Plus. O efeito citotóxico foi avaliado 24 horas após o contato com as células, utilizando como parâmetros a atividade enzimática e a viabilidade celular. A genotoxicidade foi avaliada por meio da mensuração do dano ao DNA celular. Os dois cimentos testados apresentaram citotoxicidade e genotoxicidade.

Schwarze et al (2002) testaram a compatibilidade celular dos cimentos N2, Endomethasone, Apexit, AH Plus e Ketac Endo em períodos de zero, 1, 5 e 24 horas. Observaram que os cimentos Ketac-Endo e N2 inibiram o metabolismo celular em todos os períodos experimentais. O cimento Endomethasone também promoveu inibição do metabolismo celular, exceto para o período de 24 horas. O AH Plus promoveu inibição da atividade mitocondrial nos dois primeiros períodos experimentais, e o Apexit não revelou nenhum sinal de potencial citotóxico.

Neff, Layman e Jeansonne (2002) investigaram o efeito citotóxico de sete cimentos endodônticos expostos ao suposto calor produzido durante a plastificação da guta-percha - as análises foram realizadas expondo os cimentos a temperaturas de 23°C, 43°C e 100°C durante dez minutos. Os autores observaram que a modificação na temperatura acarretou diferenças significativas estatisticamente no que se refere aos valores de adesão e proliferação celular. Os cimentos Roth 801 e Roth 811 após exposição a 100°C mostraram melhora nas características de adesão, mas não de proliferação celular. Por outro lado, os cimentos Kerr PCS e Dentalis, após exposição a 100° C apresentaram diminuição da adesão e aumento da proliferação. O AH Plus e o

AH 26 apresentaram aumento da adesão e da proliferação após exposição ao calor, enquanto o cimento Sealapex não sofreu alterações em suas características.

Mendes et al (2003) avaliaram os efeitos de cimentos endodônticos sobre a viabilidade e atividade de macrófagos. Para tanto, testaram os cimentos Pulp Canal Sealer e EndoFill, os quais foram manipulados e inseridos em tubos de vidro, sendo postos em contato com culturas celulares de macrófagos de ratos imediatamente após a manipulação ou após um período de 24 horas de incubação. Os autores concluíram que os cimentos não interferiram na viabilidade dos macrófagos, mas que a sua aderência e capacidade de fagocitose foi alterada. Os cimentos logo após o preparo e após período de incubação não apresentaram diferenças relativas a inibição celular.

Milletic et al (2005) compararam a citotoxicidade dos cimentos RoekoSeal Automix e AH Plus sobre células de carcinoma cervical humano e fibroblastos de ratos em dois períodos experimentais. Os cimentos foram postos em contato com suspensão contendo células em períodos de uma hora, 24 horas, 48 horas, 7 dias e 1 mês após sua manipulação. Após o período de cinco dias de incubação o número de células era determinado por contador eletrônico, sendo esse dado complementado pela análise do número de células viáveis com auxílio de microscopia óptica, e esse número calculado e expresso em percentuais. Os resultados mostraram que o AH Plus foi significativamente mais citotóxico nos períodos de 1h, 24h e 48h, comparando-se com os períodos de 7 dias e 1 mês. Já o cimento RoekoSeal não apresentou efeito citotóxico em nenhum dos períodos experimentais.

B) Testes secundários

Os testes secundários têm por finalidade eliminar produtos ou componentes de produtos com risco potencial de causar dano ou prejuízo aos tecidos, sendo nessa etapa feita a avaliação do potencial de toxicidade sistêmica, toxicidade à inalação, e à irritação e sensibilidade na pele e reação a implantes. Dessa forma, incluem-se nessa categoria os testes preliminares realizados com cimentos endodônticos.

Para a avaliação de cimentos endodônticos, modelos experimentais em roedores têm sido bastante utilizados, com metodologia que varia desde a injeção dos cimentos em tecido conjuntivo subcutâneo (YESILSOY, et al 1988) até testes de implantação de tubos de polietileno (MOLLOY et al, 1992; GÖRDUYSUS; ETIKÄN e GÖKÖS, 1998; YALTIRIK et al, 2004; SHAHI et al, 2006), dentina (HOLLAND et al, 1999) ou teflon (KOLOKURIS et al, 1996; KOLOKURIS et al, 1998) em tecido conjuntivo subcutâneo. A reação aos materiais também pode ser observada em tecido ósseo utilizando tubos de silicone (ZMENER; BANEGAS; PAMEIJER, 2005) ou teflon (SOUSA et al, 2006).

Uma das formas mais aceitas é a implantação de tubos de polietileno no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Esse modelo foi introduzido por Torneck (1966) em pesquisa que avaliou a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos à presença desses tubos e observou, após o período de sessenta dias, a formação de cápsula fibrosa envolvendo os implantes, rica em fibroblastos e fibras colágenas. Da mesma maneira, Philips (1967) avaliou a reação a tubos de polietileno vazios implantados em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, observando após sessenta dias a formação de cápsula fibrosa rica em fibroblastos e fibras colágenas, com poucas células plasmáticas e monócitos e pequena reação inflamatória nas extremidades dos tubos.

Já em 1970, Oynick, ao avaliar diversos métodos disponíveis para simular as respostas dos tecidos periapicais a materiais utilizados em Endodontia, concluiu que a implantação de tubos de polietileno tanto previne a dissolução do material, quanto permite um contato limitado com os tecidos vitais, simulando o uso de cimentos endodônticos no canal radicular. Da mesma forma, autores como Molloy et al (1992) e Yaltirik et al (2004) afirmam que a implantação de materiais em tubos permite a simulação de condições clínicas, além de estabilizar a posição do material e padronizar a interface entre o cimento e o tecido.

Em 1979, a *American Dental Association* (ADA) elaborou um protocolo com a intenção de regulamentar os testes secundários de materiais obturadores dos canais radiculares que utilizam implantes subcutâneos (Documento 41 ANSI/ADA). Esse documento sugere que o material testado seja implantado em tecido subcutâneo de ratos após preencher tubos de Teflon, e que as respostas a sua presença sejam avaliadas após os períodos de duas e doze semanas. Essas respostas deveriam ser classificadas da seguinte maneira:

1. Resposta tecidual ausente ou mínima: presença de tecido bem organizado, sem resposta inflamatória maior nas extremidades do tubo quando comparada ao centro deste;

2. Resposta tecidual moderada: em duas semanas, nota-se a presença de algumas células inflamatórias na extremidade do tubo, mas estas não estão presentes no centro do implante. O tecido adjacente ao tubo mantém sua estrutura, com presença reduzida de leucócitos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e gigantócitos. Nota-se também condensação fibrosa envolvendo o tubo.

3. Resposta tecidual severa: nota-se após período experimental de duas semanas a perda da estrutura normal do tecido conjuntivo, com presença de infiltrado celular inflamatório constituído por neutrófilos e linfócitos. Em doze semanas nota-se resposta inflamatória severa nas extremidades do tubo, com condensação fibrosa na sua porção média. Apesar de notar-se a recuperação da estrutura do tecido conjuntivo, percebe-se acúmulo de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e gigantócitos, podendo também haver presença continuada de neutrófilos, o que indicaria degeneração tecidual causada pelo material.

A FDI – *Federation Dentaire International* (1980) também sugere critérios qualitativos de análise da resposta tecidual a materiais, apresentando os seguintes graus para classificação:

1. Ausência de inflamação ou inflamação leve - espessura da zona de reação na abertura do tubo semelhante ou levemente superior àquela observada ao longo do tubo com ausência ou presença reduzida de células inflamatórias.

2. Moderada – reação inflamatória aumentada com presença de plasmócitos e macrófagos.

3. Severa – Zona de reação ampla com presença de macrófagos e plasmócitos e ocasionalmente presença de focos de neutrófilos, linfócitos ou ambos.

A FDI ainda sugere critérios de interpretação dos resultados, os quais consideram a reação aceitável quando o material produz: 1) reação leve nos períodos de 2 e 12 semanas; 2) reação moderada em períodos de 2 semanas que é reduzida a leve em períodos de 12 semanas. Por outro lado, a reação é considerada inaceitável quando o material promove: 1) reação leve em períodos iniciais de 2 semanas e que aumenta a

moderada ou severa em períodos próximos de doze semanas; 2) reação moderada em períodos de 2 e 12 semanas e 3) reação severa em quaisquer períodos experimentais.

Figueiredo et al (2001) propõem critério de avaliação que considera a classificação da presença de células como neutrófilos, linfócitos e plasmócitos, eosinófilos, macrófagos e gigantócitos, bem como de condensação fibrosa e abscesso em escores que variam de acordo com a intensidade de cada um desses achados. Tal classificação permite a avaliação de cada um dos achados importantes no processo inflamatório e ainda confere objetividade a análise dos resultados.

Testes secundários em Endodontia

Yesilsoy et al (1988), utilizando metodologia de injeção direta dos materiais no tecido conjuntivo subcutâneo de *guinea pigs*, testaram a reação tecidual produzida pela eucapercha, pelo cimento original de Grossman e pelo Sealapex, EndoFill, CRCS e Hypocal, sendo o grupo controle representado pela solução salina. A reação inflamatória foi observada nos períodos experimentais de 6, 15 e 80 dias, tendo como parâmetro a contagem do número de células inflamatórias em campos microscópicos com aumento de 45x. Os autores consideraram a inflamação ausente (grau 0) quando não eram observadas células inflamatórias; leve (grau 1) quando observaram uma média de até 25 células por campo; moderada (grau 2) quando a média de células inflamatórias por campo situava-se entre 25 e 124 células; e severa (grau 3) quando essa média era igual ou superior a 125 células. Observaram reação severa para o cimento de Grossman, CRCS, e Hypocal nos períodos de 6 e 15 dias, tornando-se moderada no período de 80 dias. O EndoFill e o Sealapex apresentaram as reações mais brandas, seguidos pela eucapercha.

Molloy et al (1992) avaliaram a compatibilidade biológica dos cimentos Sealapex, Kerr's sealer, AH26 e Root's sealer por meio de teste secundário de implantação de tubos de polietileno contendo esses materiais no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Os resultados foram observados por meio de microscopia óptica em períodos experimentais de 3, 10, 20 e 30 dias, sendo realizada análise descritiva das lâminas. Os autores observaram poucas diferenças em relação a reação do tecido aos diferentes materiais testados. Foi verificada presença de inflamação aguda no período de 3 dias, com presença de neutrófilos e algumas áreas de tecido de granulação com presença de linfócitos em todos os grupos estudados. No período de 10 dias observaram a diminuição da reação inflamatória, com presença de alguns macrófagos e células gigantes, sendo que o grupo do AH26 apresentou como característica a presença de edema, neutrófilos e macrófagos. A reação inflamatória foi reduzida no período de 20 dias, sendo que o AH26 persistiu promovendo edema e infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e macrófagos. A partir do período de 30 dias observou-se em todos os grupos condensação fibrosa, com diminuição do número de células inflamatórias e de células gigantes. O AH 26, ainda nesse período experimental, promoveu presença de edema, embora já reduzido em relação aos períodos anteriores. No período experimental de 60 dias, os autores observaram inflamação bastante leve para todos os grupos, com presença de condensação fibrosa e poucas células inflamatórias, indicando processo de cicatrização.

Com objetivo de avaliar a biocompatibilidade de dois cimentos a base de óxido de zinco e eugenol (Sealite e Pulp Canal Sealer) após sua implantação no tecido ósseo da mandíbula de coelhos, Pertot et al (1992) observaram histologicamente as reações decorrentes da presença desses materiais em períodos experimentais de 4 e 12 semanas. Para tanto, utilizaram escala que considerou a presença de interposição de camada fina

ou espessa de tecido conjuntivo fibroso, presença e magnitude de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, células gigantes, neutrófilos, vascularização, osteoclastos, ausência de formação de tecido ósseo e de remodelação óssea, organização do tecido ósseo, extensão da reabsorção óssea e abscesso. A ausência de cada um desses critérios produzia o escore 0 (zero) ao passo que sua identificação o escore 1 (um). Dessa forma, organizaram os eventos observados a partir da soma dos escores, resultando na seguinte classificação: ausência de reação (0); reação muito leve (1-2); reação leve (3-4); reação moderada (5-6); reação severa (7-10); e reação muito severa (10-13). A análise estatística dos resultados mostrou semelhança em relação aos dois cimentos, os quais apresentaram como característica reação tecidual classificada como leve já no período de 4 semanas e muito leve no período de 12 semanas.

Utilizando-se da metodologia de implantação subcutânea de tubos de teflon em ratos, Kolokuris et al (1996) testaram a reação tecidual aos cimentos Ketac-Endo (um cimento a base de ionômero de vidro) e Tubli Seal, em períodos experimentais de 5, 15, 60 e 120 dias. Os autores expressaram os resultados do estudo por meio de análise descritiva. O Tubli Seal apresentou reação inflamatória severa, com infiltrado de neutrófilos e linfócitos, e áreas de necrose nos períodos de 5 e 15 dias, sendo que no período experimental de 60 dias pode ser notada a diminuição da reação inflamatória e a presença de células gigantes e condensação fibrosa, e no período de 120 dias observou-se reação inflamatória leve, com presença de alguns macrófagos. Já o Ketac-Endo apresentou reação inflamatória leve já a partir do 5º dia, sendo essa progressivamente reduzida nos períodos experimentais subsequentes.

Görduysus, Etikän e Gökös (1998) observaram as reações teciduais decorrentes da implantação de tubos de polietileno contendo o cimento EndoFill no tecido

conjuntivo subcutâneo dos animais, nos períodos de 2 dias e 1, 2, 4 e 8 semanas. Os resultados desse estudo foram expressos de forma descritiva, sendo observada reação inflamatória moderada no dia 2, com edema, vascularização abundante e presença de eosinófilos, a qual foi gradativamente sendo reduzida, sendo substituída pela formação de colágeno e presença de fibroplasia.

Kolokouris et al (1998) avaliaram o comportamento dos cimentos Apexit (um cimento a base de hidróxido de cálcio) e Pulp Canal Sealer (um cimento a base de óxido de zinco e eugenol) após implantação desses materiais em tubos de teflon no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Os materiais foram avaliados em períodos experimentais de 5, 15, 60 e 120 dias, e os resultados expressos por meio de análise descritiva da reação dos tecidos aos materiais. Em relação ao Apexit, foi observada reação inflamatória severa no período de 5 dias, com presença abundante de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos e células gigantes. A intensidade da reação já se apresentava diminuída no 15º dia, entretanto eram observadas áreas de necrose tecidual. Nos períodos de 60 e 120 dias observou-se reação inflamatória bastante branda, caracterizada pela presença de alguns macrófagos no tecido conjuntivo. Já o Pulp Canal Sealer, no período experimental de 5 dias promoveu reação inflamatória moderada a severa, caracterizada pela presença de neutrófilos e macrófagos, sendo também observados alguns linfócitos e plasmócitos, hiperemia e áreas de necrose tecidual. A intensidade da reação inflamatória também se mostrou diminuída a partir do período de 15 dias, apesar de essa diminuição ser menos marcada que a observada em relação ao Apexit. Nesse período a inflamação foi caracterizada pela presença de infiltrado de macrófagos fagocitando o material e de alguns linfócitos, plasmócitos e células gigantes. No período experimental de 60 dias pode ser observada a formação de

condensação fibrosa, com manutenção da presença de células gigantes e macrófagos. Estes permaneceram sendo observados até o período de 120 dias.

Ligocki (1998) avaliou o comportamento biológico do cimento Sealer 26 por meio da análise quantitativa computadorizada de imagens. Para tanto, observou as reações teciduais decorrentes da implantação de tubos de PVC contendo o cimento em períodos de 02, 15 e 30 dias e comparou-as com grupo controle (tubo vazio). A quantificação da resposta tecidual foi realizada pela contagem do núcleo das células inflamatórias e cálculo da área ocupada pelos mesmos. Concluiu que o cimento endodôntico Sealer 26 é irritante ao tecido conjuntivo subcutâneo de ratos em todos os períodos experimentais testados.

Kaplan et al (2003) estudaram as características de cinco cimentos endodônticos (Sealapex, AH 26, Procosol, Endion e Endomethasone) e as reações teciduais ao implante subcutâneo em ratos de tubos de silicone contendo tais materiais. Os autores observaram os maiores níveis de escoamento para os cimentos Sealapex e AH 26. Em relação a reação tecidual, os autores avaliaram histomorfometricamente a extensão da reação inflamatória, conferindo caráter de maior agressividade aos cimentos que apresentassem volumes mais extensos de reação tecidual. Dentro desses critérios, os cimentos Procosol e Endion produziram reações inflamatórias mais severas. Os autores chegaram a conclusão de que o escoamento do cimento não influencia no grau de resposta inflamatória.

Zmner (2004) testou em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos a reação tecidual a implantes de silicone preenchidos com o cimento Endorez em períodos experimentais de 10, 30, 90 e 120 dias. Para apresentação dos resultados utilizou análise descritiva das lâminas. Observou a formação de tecido granulomatoso contendo numerosos

polimorfonucleares neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células gigantes. Fibroblastos e neoformação vascular também foram observados, sendo que essa proliferação celular persistiu durante os primeiros 30 dias. A partir desse período houve um declínio da reação inflamatória, sendo em 120 dias observada a cicatrização do tecido conjuntivo.

Perassi (2004) avaliou a resposta tecidual decorrente da implantação no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos de tubos de polietileno contendo os cimentos EndoRez, Sealapex, EndoFill e um cimento derivado do polímero de mamona em períodos experimentais de 7 e 50 dias. Para avaliação da resposta inflamatória utilizou os critérios propostos pela ISO/FDI e ADA/ANSI. Os resultados mostraram infiltrado inflamatório discreto ou moderado nas amostras dos cimentos EndoRez e Sealapex em ambos os períodos experimentais. O cimento derivado do polímero de mamona apresentou os melhores resultados biológicos.

Zmener, Banegas e Pameijer (2005) testaram a biocompatibilidade intraóssea do cimento EndoRez em tíbias de ratos *Wistar*, por meio de implantação de tubos de silicone contendo o material em lojas cirúrgicas preparadas no tecido ósseo. A resposta tecidual foi avaliada em cortes corados com hematoxilina e eosina nos períodos experimentais de 10 e 60 dias. A avaliação da resposta inflamatória seguiu dois parâmetros histométricos para os quais foi utilizado programa computadorizado de análise de imagens (*LECO 2001 – 2.02 image analyser*). Para análise da densidade da formação do trabeculado ósseo, o percentual de tecido ósseo formado foi avaliado, e o valor em termos de razão entre a área de novo trabeculado ósseo e a área total expressado. Para a variável população celular na área em contato com o material ou tubo, foi feita a contagem do número total de linfócitos, neutrófilos, macrófagos, células

gigantes, plasmócitos e fibroblastos, na área correspondente ao centro dos implantes. Os resultados mostraram que nos períodos de 10 e 60 dias houve cicatrização satisfatória. No período de 10 dias houve diferença estatisticamente significativa para a variável formação óssea em relação ao grupo controle, sendo menor a neoformação para o grupo do cimento EndoRez. Entretanto, na avaliação dessa variável após o período de 60 dias não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. A população celular observada foi majoritariamente composta por linfócitos, neutrófilos, macrófagos e ocasionalmente algumas células gigantes. O número de células foi significativamente maior para o cimento EndoRez em relação ao controle no período experimental de 10 dias, mas após 60 dias não houve diferença estatisticamente significativa.

Sousa et al (2006) compararam a reação tecidual aos cimentos AH Plus, EndoRez e Epiphany em tecido ósseo de *guinea pigs*. Os materiais preencheram tubos de teflon abertos em uma das extremidades e foram implantados em cavidades cirúrgicas preparadas na mandíbula dos animais. Os animais sofreram eutanásia após os períodos experimentais de 4 e 12 semanas, sendo realizada a biópsia e coloração das peças em hematoxilina-eosina para análise em microscopia óptica, a partir da qual os autores observaram reação inflamatória severa ao cimento EndoRez nos períodos experimentais de 4 e 12 semanas. Em 4 semanas houve presença abundante de linfócitos, macrófagos e células gigantes, além da presença de fragmentos de tecido ósseo necrosado e de fina camada de tecido conjuntivo interpondo o material e o tecido ósseo. No período de 12 semanas a reação inflamatória celular permaneceu intensa, havendo também áreas de dispersão do material, áreas de hemorragia e hiperemia. Observaram também reação inflamatória severa ao cimento AH Plus no período de 4 semanas, semelhante a observada com o EndoRez, e moderada no período de 12

semanas, com presença de algumas células gigantes e fina camada de tecido conjuntivo interpondo o tecido ósseo e o material. O cimento Epiphany apresentou reação inflamatória leve ou ausente em ambos os períodos experimentais, com poucas células inflamatórias e pouca dispersão do material no período de 4 semanas e presença de aposição e neoformação óssea no período de 12 semanas. Concluíram que de acordo com os critérios da *Fédération Dentaire Internationale* (FDI) apenas o cimento Epiphany possui características de biocompatibilidade com o tecido ósseo.

Zafalon et al (2007) seguiu os critérios da FDI para avaliar a reação tecidual em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos aos cimentos EndoRez e Endomethasone. Observaram que a reação tecidual a presença do cimento Endomethasone diminuiu com o tempo, ao passo que aquela promovida pelo Endorez manteve-se agressiva ao longo dos períodos experimentais observados. Baseados nos resultados, concluíram que o EndoRez não apresenta condições de biocompatibilidade aceitáveis.

Batista et al (2007) testaram a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos aos cimentos EndoFill, Endomethasone, Sealer 26 e AH Plus. Após a implantação de tubos de polietileno obturados com guta-percha e com os cimentos, avaliaram as reações em períodos de 07, 14 e 30 dias. Utilizaram como grupo controle tubos vazios e tubos obturados somente com cones de guta-percha. Os resultados foram apresentados por análise descritiva das lâminas e pela classificação da reação inflamatória em ausente, discreta, moderada ou intensa. O Endomethasone apresentou o melhor comportamento biológico entre os materiais testados em todos os períodos experimentais, seguido do sealer 26 e do AH Plus, os quais produziram efeito irritante nos períodos iniciais. O EndoFill foi o material mais agressivo produzindo reação inflamatória de moderada a intensa em todos os períodos avaliados.

C) Terceira e quarta fases da avaliação

A terceira fase de avaliação da compatibilidade biológica de um material envolve testes de aplicação em animais, nos quais o material deve ser avaliado dentro de seu contexto clínico. No caso de cimentos para obturação dos canais radiculares, a aplicação no tratamento endodôntico estaria recomendada, permitindo a avaliação do material quando aplicado em contato com os tecidos periapicais. Havendo sucesso na aplicação de determinado material nos estudos preliminares, deve haver a continuidade da avaliação clínica em dentes humanos (COSTA, 2001a).

Pascon et al (2001) avaliaram a biocompatibilidade do Pulp Canal Sealer (um cimento a base de óxido de zinco e eugenol), do AH26 (um cimento a base de resina epóxica) e da Kloroperka (material a base de guta-percha e óxido de zinco) em testes realizados em dentes de 12 babuínos. Após preparo dos canais, os dentes foram divididos em três grupos correspondentes aos materiais a serem testados durante a obturação. Os dentes foram obturados pela técnica da condensação lateral da guta-percha, respeitando o limite de trabalho determinado durante o preparo dos canais, o qual se situava cerca de 1 a 1,5mm aquém do ápice radiográfico da raiz. Após conclusão do tratamento endodôntico, os animais sofreram eutanásia em períodos experimentais de 1, 7 e 30 dias e 1, 2 e 3 anos. As peças removidas sofreram processamento histológico para avaliação da resposta dos tecidos periapicais ao tratamento. Os resultados mostraram que nos períodos de 1 e 7 dias, o AH 26 causou reações mais severas do que as observadas nas amostras obturadas com os demais cimentos (as quais apresentaram reação de leve a moderada). Já em períodos mais longos (2 e 3 anos) o Pulp Canal Sealer e o AH 26 produziram reações de leve a moderada e a Kloroperka apresentou os piores resultados.

Tanomaru Filho et al (1998) testou a ação de cimentos endodônticos no reparo de dentes de cães com processos periapicais. Após preparo dos canais com irrigação com solução de hipoclorito de sódio a 5,25% e medicação intracanal com hidróxido de cálcio por 7 dias, os canais foram obturados pela técnica da condensação lateral da guta-percha com os cimentos Sealapex (um cimento a base de hidróxido de cálcio) ou FillCanal (um cimento de óxido de zinco e eugenol). A análise do reparo periapical foi realizada após 270 dias, mostrando melhores resultados para as amostras obturadas com Sealapex.

Leonardo et al (1999b) testaram a reação tecidual a um cimento à base de resina epóxica (AH Plus) e a um cimento de óxido de zinco e eugenol (FillCanal), utilizando 34 pré-molares vitais de cães, os quais foram instrumentados e obturados pela técnica da condensação lateral da guta-percha. Os autores observaram áreas de inflamação e necrose associadas ao AH Plus. O FillCanal promoveu reação inflamatória de moderada a intensa na região periapical, principalmente na área em contato com o material.

Leonardo et al (2003) observaram o processo de cicatrização de lesões periapicais de dentes de cães obturados com diferentes cimentos endodônticos. Os autores realizaram o preparo dos canais irrigando com hipoclorito de sódio a 5,25% e mantiveram a pasta Calen PMCC como curativo. Após 180 dias, os animais foram mortos e as peças foram descalcificadas e coradas em HE para análise histológica. Os resultados apontaram melhor cicatrização nas amostras obturadas com AH Plus e Sealapex. O cimento Sealer Plus apresentou os piores resultados.

Objetivando avaliar preliminarmente os resultados de tratamentos endodônticos que utilizaram para a obturação a técnica da condensação lateral da guta-percha e o cimento EndoRez, Zmener e Pameijer (2004) observaram 295 canais radiculares de 180

pacientes em períodos de 14 e 24 meses. Para determinação do sucesso do tratamento utilizaram critérios que envolviam aspectos clínicos (ausência de sintomatologia) e radiográficos (aspecto radiográfico do espaço do ligamento periodontal e redução de radiolucência periapical). Os resultados mostraram sucesso do tratamento em 91,3% dos casos.

Zmener e Pameijer (2007) realizaram estudo clínico retrospectivo para acompanhamento do sucesso do tratamento endodôntico de dentes obturados com gutapercha e com o cimento EndoRez. Para tanto, consideraram aspectos radiográficos (redução ou ausência de lesão periapical, ausência de espessamento do ligamento periapical) e clínicos (ausência de sintomas). Todos os casos apresentaram ausência de sintomas. Os resultados apontaram sucesso clínico e radiográfico em 86,3% dos casos.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar histopatologicamente as reações ocorridas no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos após a implantação de tubos de polietileno contendo um cimento endodôntico de óxido de zinco e eugenol (EndoFill), um cimento à base de resina epóxica (AH Plus), um cimento à base de resina metacrilato (EndoRez) e tubos vazios (grupo controle).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as reações teciduais e comparar o grau de inflamação nos diferentes grupos testados quanto a: 1) características do componente celular inflamatório; 2) condensação fibrosa; 3) presença de abscesso.

- Avaliar o desenvolvimento das reações teciduais de cada um dos grupos nos períodos experimentais de 7 (sete), 30 (trinta) e 60 (sessenta) dias.

4. METODOLOGIA

4.1- Tipo de estudo

O presente estudo consiste em um trabalho experimental em animais. A fim de avaliar a biocompatibilidade de cimentos endodônticos, foram realizados testes de implantação subcutânea de tubos de polietileno preenchidos pelos materiais experimentais em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Trata-se de um estudo cego e controlado pela ausência de material inserido nos tubos de um dos grupos.

4.2- Local de realização da pesquisa

A fase experimental desse estudo foi realizada nas instalações do Biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O preparo e análise das lâminas foram realizados no laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

4.3 Descrição da amostra

Inicialmente foi realizado estudo piloto com 3 (três) ratos (*Rattus norvegicus albinus Wistar*) machos, com idades entre 90 (noventa) e 120 (cento e vinte dias), pesando entre 300 e 400 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A amostra final foi composta de 18 animais divididos em três períodos experimentais.

Foram testados três cimentos endodônticos inseridos em tubos de polietileno. Como controle utilizaram-se tubos de polietileno vazios. Sendo assim, ficaram definidos quatro grupos de estudo: cimento de óxido de zinco e eugenol (EndoFill¹) - Grupo I;

¹ Dentsply HERO Indústria e Comércio Ltda. – Petrópolis- RJ, Brasil.

grupo controle (tubo vazio) - Grupo II; cimento endodôntico à base de resina epóxica (AH Plus²) – Grupo III; cimento à base de resina metacrilato (EndoRez³) – Grupo IV.

4.4- Métodos Empregados

Etapa cirúrgica

Foi preparada a mesa operatória com material cirúrgico esterilizado. Os procedimentos foram realizados após anestesia geral por via intramuscular. Os animais foram anestesiados com 0,008ml/100g de Quetamina - Francotar ⁴- e 0,004ml/100g de Virbaxyl⁵ (cloridrato de xilasina 2%).

A tricotomia da região dorsal foi realizada manualmente, a fim de evitar a penetração de pelos nas lojas cirúrgicas. Em seguida, a desinfecção da área foi feita com álcool iodado⁶ (95% de álcool a 70% e 5% de iodo). Foram realizadas quatro incisões de 0,5cm de comprimento no dorso do animal, estando estas dispostas com a distância de 2cm da coluna vertebral do animal e distantes pelo menos 2cm entre si. Dessa forma, permitiu-se por meio da divulsão lateral do tecido subcutâneo do animal com tesoura de ponta romba a obtenção de quatro lojas cirúrgicas. O posicionamento das incisões para obtenção das lojas cirúrgicas pode ser observado na Figura 1.

² Dentsply HERO Indústria e Comércio Ltda. – Petrópolis- RJ, Brasil.

³ Ultradent Products, Inc., South Jordan, Utah, USA.

⁴ Virbac do Brasil indústria e comércio LTDA, São Paulo – SP, Brasil.

⁵ Virbac do Brasil indústria e comércio LTDA, São Paulo – SP, Brasil.

⁶ Farmácia Fiton Farma, Porto Alegre, RS, Brasil.

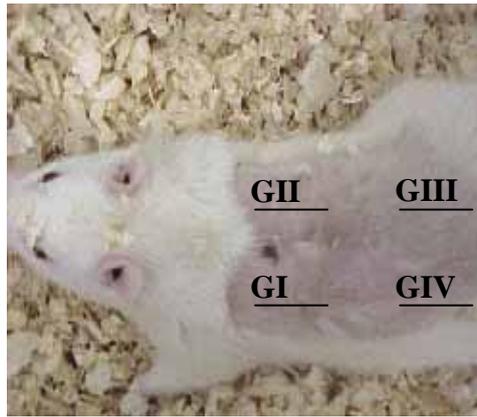


Figura 1: Dorso do animal com identificação do local das quatro incisões onde foram implantados os tubos (adaptado de RIBEIRO et al, 2003).

Para a implantação dos cimentos foram utilizados tubos de polietileno de aproximadamente 10mm de comprimento e 1,5mm de diâmetro⁷, os quais tiveram uma das extremidades fechadas a quente e permaneceram em álcool a 70% ⁸ por 6 horas, sendo posteriormente autoclavados.

Os cimentos endodônticos, preparados de acordo com as orientações dos fabricantes, foram introduzidos imediatamente após preparo nos tubos com a utilização de seringas de insulina estéreis⁹, evitando-se que ocorresse o seu extravasamento. Com auxílio de uma pinça curva, os tubos preenchidos com o material foram introduzidos nas lojas cirúrgicas em direção paralela à incisão, com abertura do tubo voltada para a cabeça do animal.

O dorso do animal foi dividido em quadrantes, dispostos no sentido horário. Os tubos contendo os cimentos EndoFill (Grupo I), os tubos vazios que representaram o grupo controle (Grupo II) e aqueles que continham o cimento AH Plus (Grupo III) e

⁷ Abott Lab do Brasil. São Paulo, SP, Brasil.

⁸ Farmácia Fiton Farma, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁹ Injex Indústria Cirúrgica Ltda. Ourinhos, SP, Brasil.

EndoRez (Grupo IV) foram inseridos respectivamente nos quadrantes apontados na figura 1. Após a implantação dos tubos de polietileno foi realizada a sutura com fio de seda montado 3-0¹⁰.

Durante o período experimental, os animais foram mantidos no biotério da UFRGS, em caixas individuais apropriadas, em adequadas condições de higiene e com ração e água à vontade.

Eutanásia dos animais, biópsia e processamento histológico

A eutanásia foi realizada em 07 (sete), 30 (trinta) e 60 (sessenta) dias pós-operatórios. Decorridos estes períodos experimentais, os animais foram anestesiados como descrito anteriormente e mortos por meio de deslocamento cervical. Nova tricotomia foi feita, e a biópsia excisional da área do implante realizada, com margem de segurança de 1cm. As peças cirúrgicas foram posicionadas em discos de papel “cartolina” com tamanhos compatíveis, de maneira que o tecido conjuntivo do animal ficasse em contato com o papel. Este procedimento permitiu que as peças ficassem distendidas facilitando a fixação do tecido, a qual foi realizada em formalina a 10% tamponada com tampão fosfato¹¹ pelo período de 24 horas (COSTA, 2001a). As amostras permaneceram de duas a três horas em formol glicerinado (1l de formalina 10% + 50 ml de glicerina)¹². Após, os tubos de polietileno foram cuidadosamente removidos das peças cirúrgicas, as quais foram incluídas em blocos de parafina, com auxílio das barras de Leuckhart. Nesse momento, foi realizada a codificação dos blocos por colaborador que não participou da leitura das lâminas, a fim de conferir caráter cego ao estudo. Cortes de 3 a 4 µm de espessura foram obtidos para a confecção das lâminas.

¹⁰ Johnson e Johnson produtos profissionais Ltda. São José dos Campos, SP, Brasil.

¹¹ Cedido pelo laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

¹² Cedido pelo Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

Os cortes histológicos obtidos através do longo eixo do tubo foram corados em HE (Hematoxilina e Eosina), permitindo a avaliação da resposta tecidual presente na interface entre o material experimental e o tecido conjuntivo.

4.5- Análise dos Resultados

As lâminas foram examinadas em microscópio de luz por 1 (um) examinador treinado e calibrado. Cada amostra foi avaliada a partir de 3 cortes histológicos.

O treinamento do examinador foi realizado comparando seus resultados com os de um examinador experiente (padrão ouro) até que seu percentual de concordância atingisse valores próximos de 80% na leitura de 10 lâminas. Após, foi aferida a calibragem inter-examinador pelo cálculo Kappa. A concordância intra-examinador também foi verificada por meio do cálculo de Kappa, comparando a leitura de 10 lâminas realizada em dois períodos distintos, com intervalo de uma semana.

As lâminas foram analisadas qualitativamente seguindo os critérios apontados por Figueiredo et al (2001) e utilizados por Só (2004). Observou-se o componente celular inflamatório a partir da presença de células como neutrófilos, linfócitos e plasmócitos, eosinófilos, macrófagos e gigantócitos. Também foram avaliados fenômenos como a condensação fibrosa e a ocorrência de abscesso. Os eventos celulares foram classificados de acordo com os seguintes escores:

- 1- Ausente (quando as células inflamatórias estavam ausentes ou se encontraram no interior de vasos sanguíneos);
- 2- Leve (quando as células estavam presentes de maneira esparsa ou em grupamentos muito reduzidos);

3– Moderado (elementos celulares presentes, porém sem dominar o campo microscópico);

4- Intenso (elementos celulares presentes sob a forma de infiltrado próximo ao material).

A condensação fibrosa foi classificada de acordo com os seguintes escores:

1 – Ausência de fibras colágenas envolvendo a área que continha o material em estudo;

2 – Presença de fina camada de fibras colágenas envolvendo o material em estudo;

3– Presença de camada espessa de fibras colágenas envolvendo a área que continha o material em estudo.

O abscesso, caracterizado pela presença de neutrófilos mortos (piócitos) em área fracamente corada, foi assim classificado:

1– Ausência de abscesso;

2– Presença de abscesso em contato com o local que continha o material;

3– Presença de abscesso atingindo áreas mais distantes do que a do local que continha o material.

Análise estatística dos resultados

As variáveis relacionadas aos eventos celulares da inflamação (linfócitos e plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos, células gigantes e macrófagos), às características da condensação fibrosa e à presença e características de abscesso inflamatório foram

comparadas entre os grupos e nos diferentes períodos experimentais. Tais variáveis forneceram dados qualitativos, apresentando-se em escala ordinal.

A comparação dessas variáveis entre os grupos de estudo foi realizada considerando as amostras relacionadas. Isso porque as amostras foram aplicadas nos mesmos animais (sendo medidas repetidas do mesmo indivíduo). Por isso, foi realizado o teste de Friedman, complementado pelo teste de Wilcoxon nos casos em que foram identificadas diferenças estatisticamente significantes na variável avaliada.

Já as comparações entre os períodos de 7, 30 e 60 dias foram realizadas em animais diferentes. Por isso, para a comparação entre os períodos experimentais foram consideradas amostras independentes, e o teste de Kruskal Wallis foi realizado, sendo complementado pelo teste U de Mann-Whitney em caso de verificação de diferenças estatisticamente significativas na variável avaliada.

4.6- Considerações éticas

Este estudo atende às normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA – Resolução normativa 04/97 (Anexo 1) e do Código de Proteção aos Animais (Anexo 2), havendo sido apresentado projeto aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (Anexo 3).

5. RESULTADOS

A partir da leitura das lâminas durante o projeto piloto, o *Teste de Kappa* foi utilizado com o objetivo de determinar a concordância das avaliações realizadas pelo examinador e pelo padrão ouro, definindo a calibração do examinador do presente estudo.

Verificou-se que para todas as variáveis existe um grau de concordância significativo entre os escores dos examinadores (apêndice 1).

Também foi aferida, por meio do teste Kappa, a calibração “intra-examinador”. Observou-se a concordância de duas avaliações realizadas pelo mesmo examinador com intervalo de uma semana (apêndice 2).

Verificou-se que para todas as variáveis existiu um grau de concordância significativo entre os escores das leituras realizadas pelo mesmo avaliador.

Verificados os níveis de calibração, foi realizada a leitura das lâminas dos três períodos experimentais propostos, obtendo resultados referentes aos eventos celulares da inflamação, a aspectos relacionados com a condensação fibrosa e com a formação de abscesso.

No período experimental de 7 dias, observou-se que o tecido em contato com o cimento EndoFill (Grupo I) apresentou infiltrado inflamatório intenso com predomínio de linfócitos e plasmócitos (Figura 2). Em algumas das amostras também puderam ser observadas células como neutrófilos, eosinófilos e células gigantes, porém em número bastante reduzido. O tecido conjuntivo apresentou ocorrência bastante significativa de macrófagos, os quais apareceram realizando fagocitose do material. A condensação

fibrosa nesse período foi bastante reduzida, notando-se a presença de fibroblastos ativos na formação de fibrilas, porém sem resultar ainda na formação de cápsula fibrosa. Ainda que na maioria das amostras não se tenha evidenciado a presença de abscesso, em algumas lâminas houve formação de abscesso em região próxima ao material.

Já o grupo controle (Grupo II) apresentou infiltrado inflamatório moderado, também com predomínio de linfócitos e plasmócitos. Pode ser observada também a presença de alguns macrófagos e de fibroblatos, estes, responsáveis pela formação de fibras colágenas orientadas, dispostas na embocadura do tubo de polietileno. Não se observou a formação de abscesso (Figura 3).

O cimento AH Plus produziu reação inflamatória com presença de infiltrado composto predominantemente por linfócitos (Figura 4). Em algumas das amostras observou-se a presença de células gigantes. Os macrófagos também foram observados, porém em número reduzido em relação ao cimento EndoFill. Observou-se também a presença de fibroblastos atuando na formação de fibras colágenas, indicando o início da formação de condensação fibrosa em torno do material experimental.

O cimento EndoRez produziu reação inflamatória intensa, caracterizada pela presença predominante de linfócitos e plasmócitos e pela abundância de macrófagos. Ocasionalmente também puderam ser observados neutrófilos, eosinófilos e células gigantes (Figura 5). Outro achado importante foi a observação de tecido conjuntivo rico em hemossiderina junto a abertura do tubo. Em algumas amostras pode ser observada a formação de abscesso junto a abertura do tubo ou em áreas distantes à abertura. Observou-se o início da formação de condensação fibrosa, com produção de fibras colágenas por fibroblastos ativos.

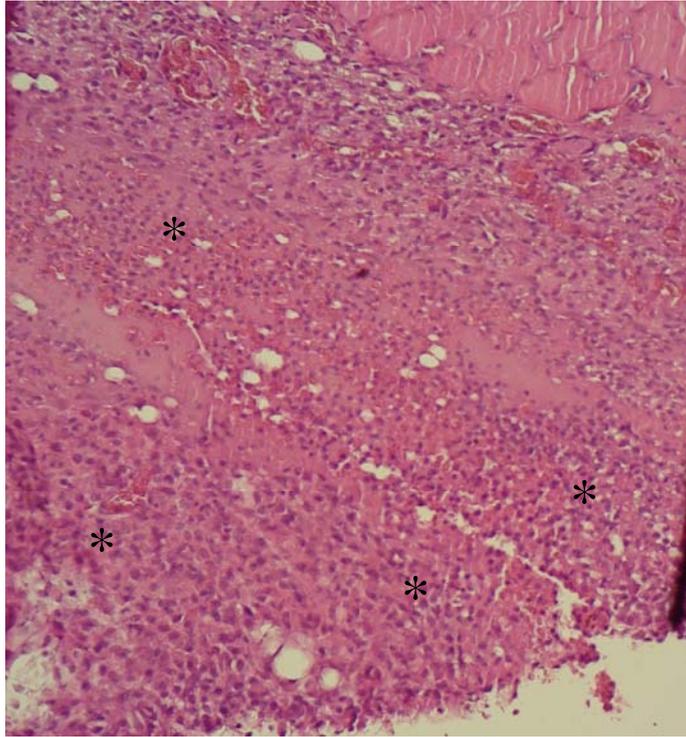


Figura 2: Infiltrado linfoplasmocitário intenso(*) promovido pelo cimento EndoFill no período experimental de 7 dias.

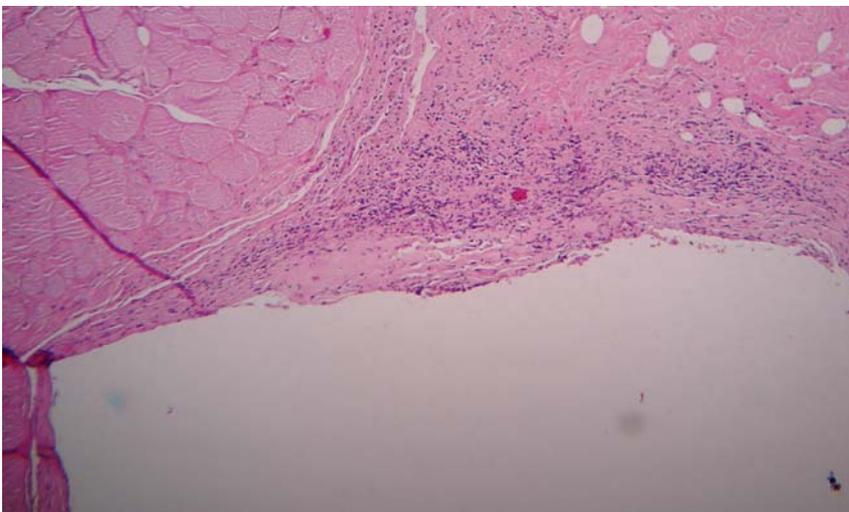


Figura 3: Aspecto da reação tecidual no grupo controle no período de 7 dias.

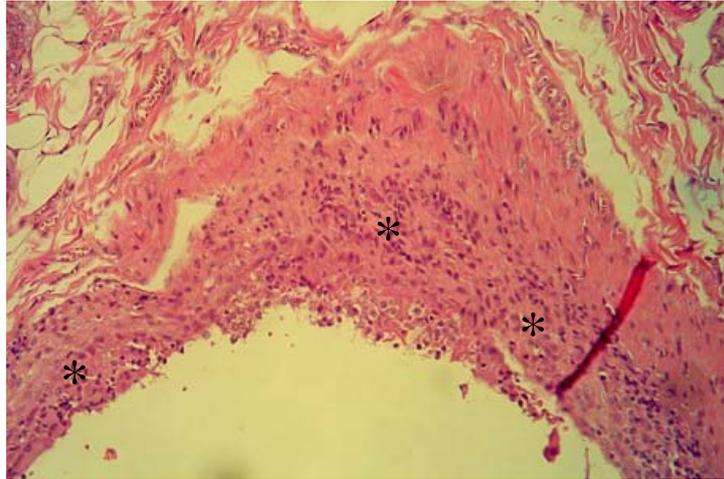


Figura 4: Reação ao cimento AH Plus no período de 7 dias. Infiltrado linfoplasmocitário (*) e início da condensação fibrosa.

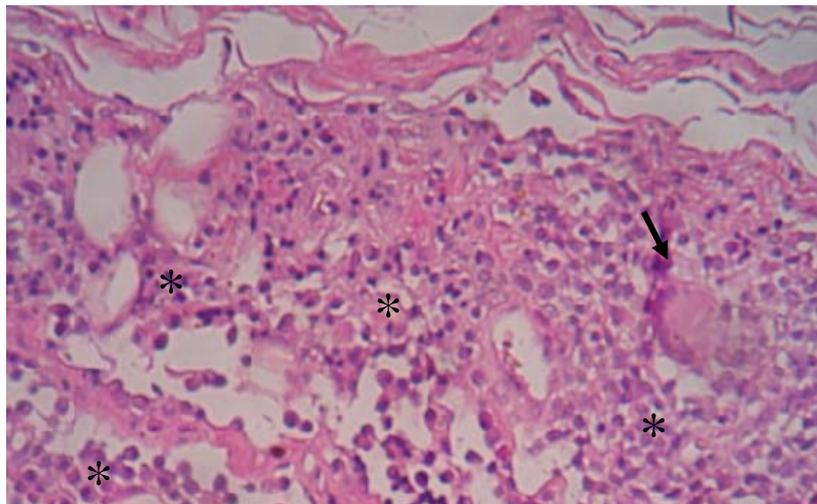


Figura 5: Reação tecidual ao cimento EndoRez no período experimental de 7 dias. Nota-se a presença de infiltrado linfoplasmocitário(*) e de célula gigante (seta).

A tabela 1 apresenta os resultados do período experimental de 07 dias para os quatro grupos avaliados.

Tabela 1. Comparação entre os grupos no período experimental de 07 dias

<i>Grupo</i>	<i>Escore Médio</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Teste de Friedman</i>	<i>P</i>
Condensação Fibrosa				
Grupo 1	1,33 ^A	0,52	9,811	0,020
Grupo 2	2,17 ^B	0,41		
Grupo 3	2,00 ^B	0,00		
Grupo 4	1,50 ^{AB}	0,55		
Neutrófilos				
Grupo 1	1,50	0,55	7,714	0,052
Grupo 2	1,00	0,00		
Grupo 3	1,00	0,00		
Grupo 4	1,50	0,55		
Eosinófilos				
Grupo 1	1,33	0,52	4,714	0,194
Grupo 2	1,00	0,00		
Grupo 3	1,00	0,00		
Grupo 4	1,17	0,41		
Linfócitos/Plasmócitos				
Grupo 1	3,83 ^A	0,41	8,887	0,031
Grupo 2	2,33 ^B	0,52		
Grupo 3	2,67 ^{AB}	0,82		
Grupo 4	3,50 ^{AB}	0,84		
Células gigantes				
Grupo 1	1,67	0,52	5,333	0,149
Grupo 2	1,00	0,00		
Grupo 3	1,33	0,52		
Grupo 4	1,33	0,52		
Macrófagos				
Grupo 1	2,50 ^A	0,55	12,057	0,007
Grupo 2	1,17 ^B	0,41		
Grupo 3	1,50 ^B	0,55		
Grupo 4	2,67 ^A	0,52		
Abscesso				
Grupo 1	1,50	0,55	7,552	0,056
Grupo 2	1,00	0,00		
Grupo 3	1,00	0,00		
Grupo 4	1,67	0,82		

* Escores seguidos da mesma letra não diferem entre si.

Por meio do teste não-paramétrico de Friedman, no período experimental de 7 dias, observou-se diferenças significativas entre os grupos para as variáveis *linfócitos e plasmócitos* ($p=0,031$), *macrófagos* ($p=0,007$) e *condensação fibrosa* ($p=0,020$).

As demais variáveis não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si.

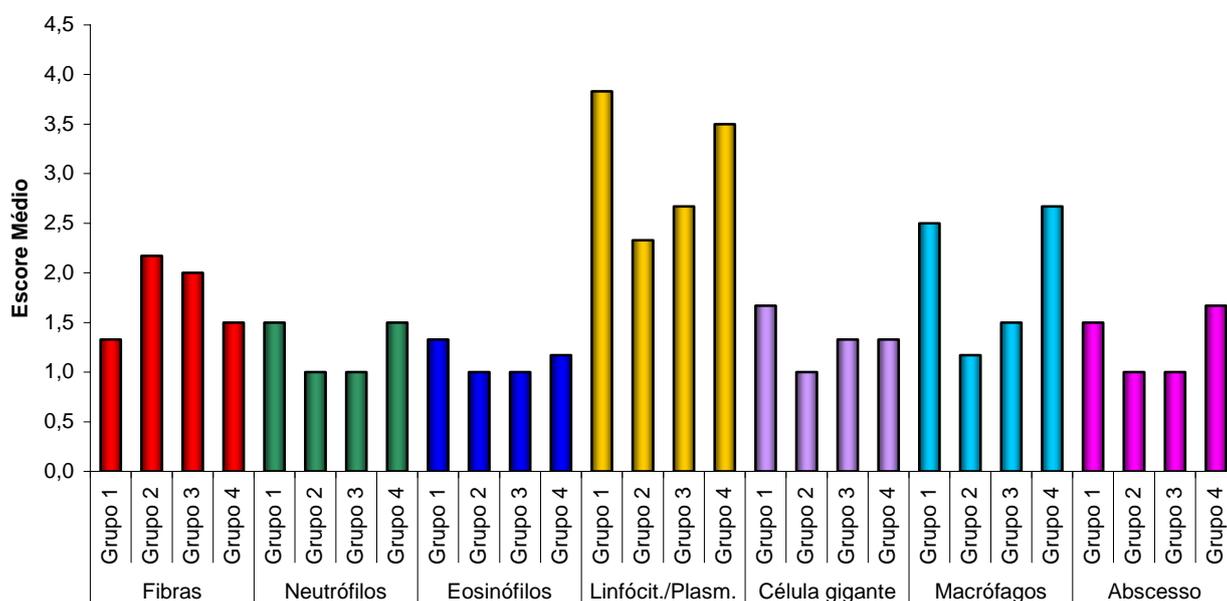
Em relação a presença de linfócitos e plasmócitos verificou-se, por meio do teste de Wilcoxon, que o Grupo I (tubos preenchidos com o cimento EndoFill) apresentou escores significativamente superiores ao Grupo II (grupo controle) ($p=0,024$). O Grupo IV (EndoRez) produziu resultados estatisticamente semelhantes aos do Grupo I, ainda que não tenham sido observadas também diferenças relacionadas aos demais grupos de estudo.

Para a variável *macrófagos*, observou-se que os Grupos I (EndoFill) ($p=0,038$) e IV (Endorez) ($p=0,024$) apresentaram escores significativamente superiores ao grupo II (grupo controle). Dos cimentos testados, Grupo III (AH Plus) foi o que apresentou menor quantidade de macrófagos, diferindo significativamente do Grupo IV ($p=0,038$).

A condensação fibrosa foi menos prevalente nos grupos I (tubos preenchidos com o cimento de óxido de zinco e eugenol – EndoFill) e IV (tubos preenchidos com cimento a base de resina metacrilato – EndoRez). Entretanto, através dos resultados do teste não-paramétrico de Friedman verificou-se que existiu diferença significativa apenas para os escores referentes ao Grupo I (EndoFill), os quais foram significativamente inferiores ao Grupo II (grupo controle) ($p=0,025$) e ao Grupo III (AH Plus) ($p=0,046$). O restante dos grupos não apresentou diferenças significativas.

Os resultados do período experimental de 7 dias podem ser observados no Gráfico 1.

Gráfico 1. Comparação entre os grupos: 7 dias



No período experimental de 30 dias, as amostras que sofreram ação do cimento EndoFill (Grupo I) apresentaram a manutenção das características do infiltrado inflamatório, o qual apresentou-se intenso e com o predomínio de linfócitos e plasmócitos, caracterizando um infiltrado inflamatório crônico. Em algumas amostras pode ser observada a presença de alguns neutrófilos, eosinófilos e células gigantes. A presença de macrófagos mostrou-se bastante abundante. Tais células foram observadas em sua forma ativa, fagocitando o material experimental. A presença de abscesso foi bastante reduzida, porém em alguns casos pode ser observada junto à saída do tubo (Figura 6). Notou-se também o aumento da espessura da condensação fibrosa que envolvia a reação inflamatória decorrente da presença do material.

O grupo controle (Grupo II), no período experimental de 30 dias, apresentou suas amostras caracterizadas pela presença de infiltrado inflamatório crônico moderado (com predominância de linfócitos e plasmócitos) (Figura 7). Ocasionalmente, pode ser

observada a presença de eosinófilos, neutrófilos e células gigantes, porém em número bastante reduzido. Macrófagos também foram observados. Notou-se ainda a presença de condensação fibrosa espessa na maioria das amostras, organizada de modo a formar uma cápsula fibrosa junto à abertura do tubo.

As amostras referentes ao cimento AH Plus também apresentaram infiltrado inflamatório crônico moderado, com predomínio de linfócitos e plasmócitos no período experimental de 30 dias. Além disso, pode ser observada a presença esparsa de células gigantes e eosinófilos. Os macrófagos estiveram presentes na maioria das amostras compondo a reação inflamatória remanescente, porém em número reduzido. A condensação fibrosa apresentou-se espessa na maioria das amostras, entretanto em algumas lâminas notou-se condensação fibrosa pouco espessa. Não foi observada em nenhuma das lâminas a presença de abscesso (Figura 8).

O cimento EndoRez (Grupo IV), no período experimental de 30 dias, promoveu reação inflamatória de moderada a severa, caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório com presença predominante de linfócitos e plasmócitos. Observou-se ocasionalmente a presença de neutrófilos e eosinófilos, células gigantes e abscesso. A presença de macrófagos foi bastante intensa, e observou-se a presença de cápsula fibrosa fina envolvendo a área de reação inflamatória produzida pelo material na maioria das amostras. Também no período de 30 dias observou-se tecido rico em hemossiderina nas amostras referentes ao Grupo IV (Figura 9).

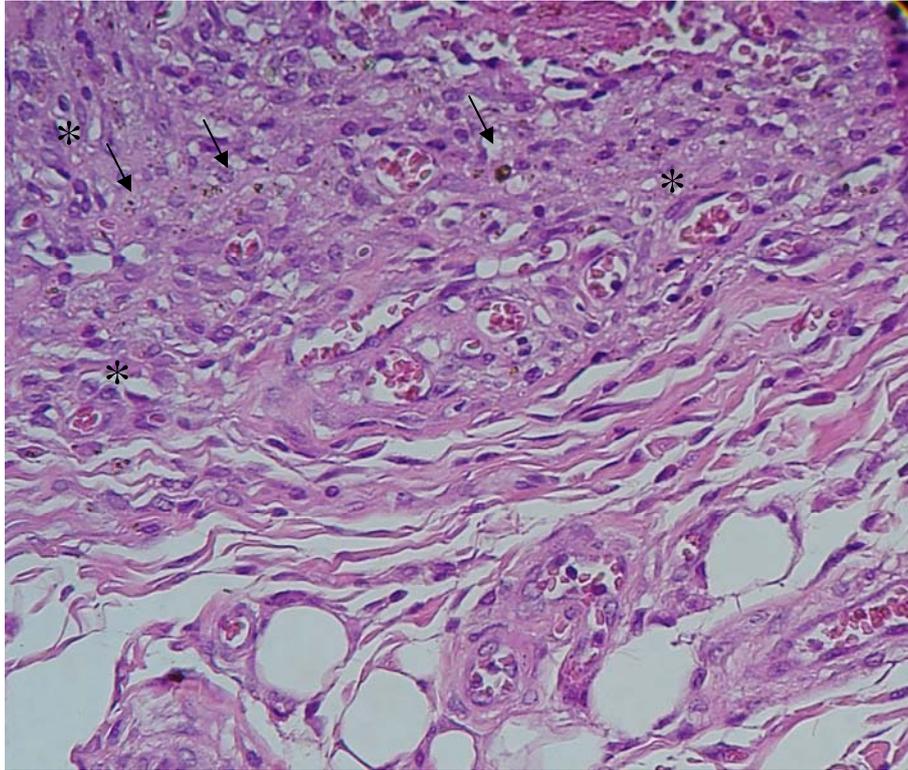


Figura 6: Aspecto da reação tecidual ao cimento EndoFill no período pós-operatório de 30 dias. Nota-se presença de infiltrado inflamatório crônico (*) e de macrófagos (setas).

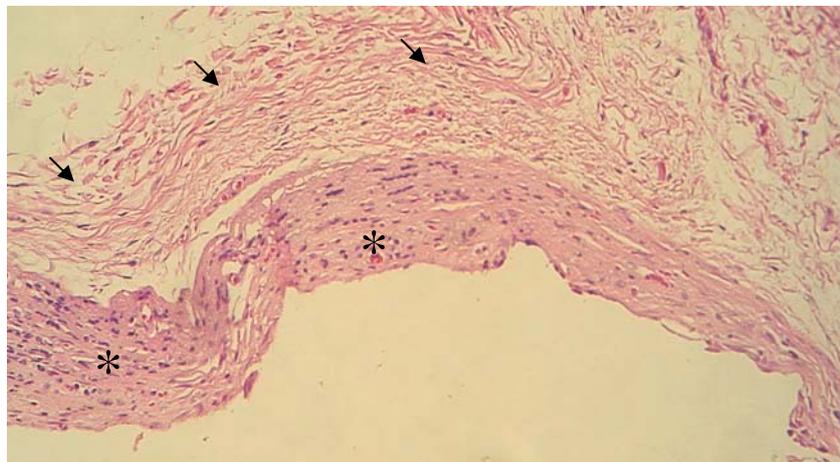


Figura 7: Reação inflamatória no grupo controle no período experimental de 30 dias. Nota-se infiltrado linfoplasmocitário pouco intenso(*) e aumento da espessura da condensação fibrosa que envolve a reação inflamatória (setas).

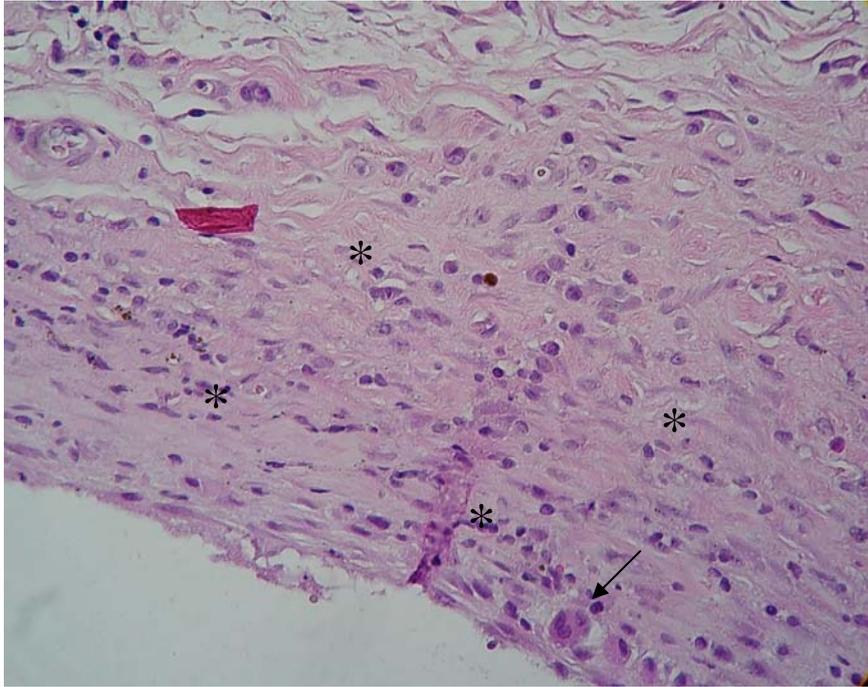


Figura 8: Aspecto do infiltrado inflamatório (*) produzido pelo cimento AH Plus no período de 30 dias pós-operatório. Nota-se também a presença de célula gigante (seta).

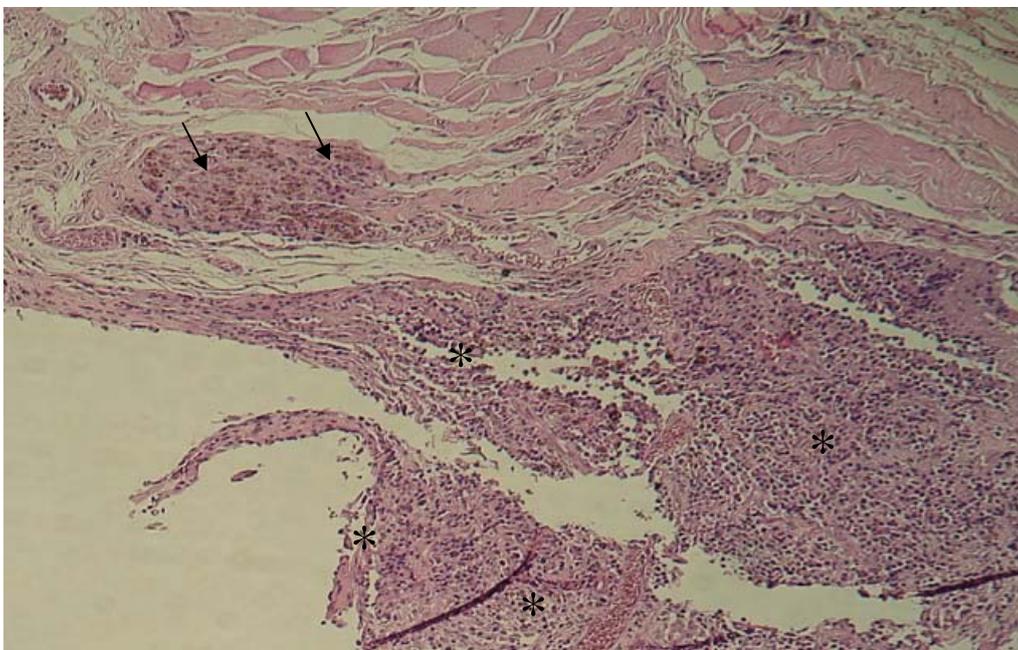


Figura 9: Quadro histopatológico produzido pelo cimento EndoRez no período experimental de 30 dias. Nota-se infiltrado linfoplasmocitário intenso (*) e tecido rico em hemosiderina (setas).

A tabela 2 apresenta os resultados do período experimental de 30 dias para os quatro grupos avaliados.

Tabela 2. Comparação entre os grupos no período experimental de 30 dias

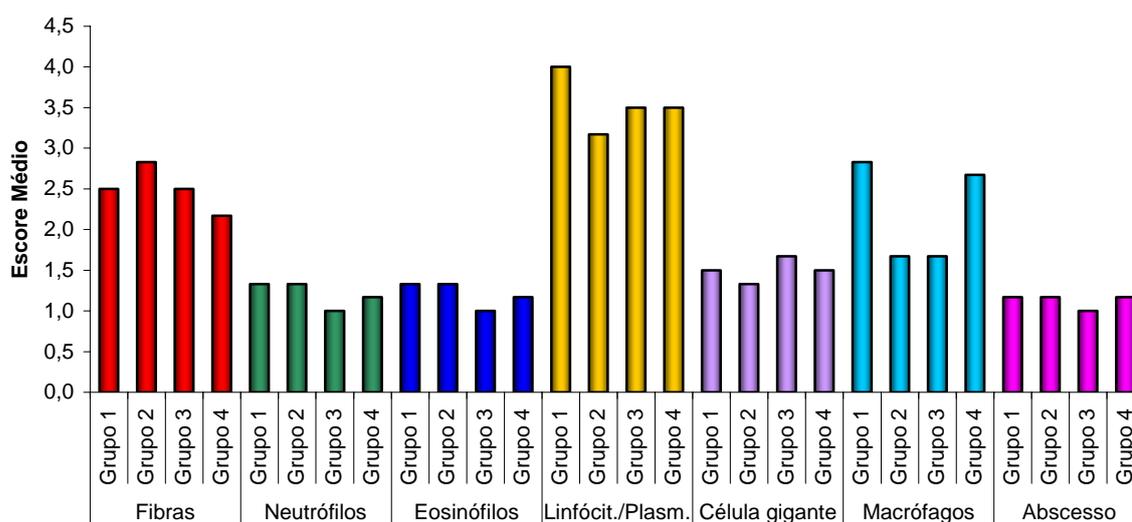
<i>Grupo</i>	Escore Médio	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Teste de Friedman</i>	<i>P</i>
Condensação Fibrosa				
Grupo 1	2,50	0,55	4,364	0,225
Grupo 2	2,83	0,41		
Grupo 3	2,50	0,55		
Grupo 4	2,17	0,41		
Neutrófilos				
Grupo 1	1,33	0,82	1,000	0,801
Grupo 2	1,33	0,82		
Grupo 3	1,00	0,00		
Grupo 4	1,17	0,41		
Eosinófilos				
Grupo 1	1,33	0,52	2,200	0,532
Grupo 2	1,33	0,52		
Grupo 3	1,00	0,00		
Grupo 4	1,17	0,41		
Linfócitos/Plasmócitos				
Grupo 1	4,00	0,00	3,353	0,340
Grupo 2	3,17	0,98		
Grupo 3	3,50	0,84		
Grupo 4	3,50	0,84		
Células gigantes				
Grupo 1	1,50	0,55	1,714	0,634
Grupo 2	1,33	0,52		
Grupo 3	1,67	0,52		
Grupo 4	1,50	0,55		
Macrófagos				
Grupo 1	2,83 ^A	0,41	10,902	0,012
Grupo 2	1,67 ^B	0,82		
Grupo 3	1,67 ^B	0,52		
Grupo 4	2,67 ^A	0,52		
Abscesso				
Grupo 1	1,17	0,41	1,000	0,801
Grupo 2	1,17	0,41		
Grupo 3	1,00	0,00		
Grupo 4	1,17	0,41		

- Escores seguidos de mesma letra não diferem entre si

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Friedman verifica-se que existe diferença significativa para a variável *Macrófagos*. O teste de Wilcoxon apontou que o Grupo II (grupo controle) e III (AH Plus) apresentam resultados estatisticamente inferiores aos dos grupos I (EndoFill) ($p=0,038$) e IV (Endorez) ($p=0,024$). As demais variáveis não diferem significativamente entre os grupos estudados nesse período experimental.

Os resultados do período de 30 dias podem ser observados no Gráfico 2.

Gráfico 2. Comparação entre os grupos: 30 dias



No período experimental de 60 dias o cimento EndoFill (Grupo I) promoveu reação inflamatória caracterizada pela manutenção de infiltrado inflamatório crônico intenso, com predominância de linfócitos e plasmócitos e presença ainda acentuada de macrófagos (Figura 10). Ocasionalmente, ainda pode ser observada a presença de células gigantes, de neutrófilos e de abscesso. Observou-se também a formação de

discreta cápsula fibrosa, com fibras organizadas, porém pouco espessa, envolvendo a área de reação inflamatória.

O grupo controle (Grupo II), no período experimental de 60 dias, apresentou reação inflamatória bastante leve ou inexistente, com poucas células inflamatórias junto à saída do tubo. A reação também foi caracterizada pela formação de cápsula fibrosa espessa envolvendo o tecido inflamatório ainda remanescente (Figura 11).

O AH Plus (Grupo III) promoveu a presença de infiltrado inflamatório leve a moderado no período experimental de 60 dias. Observou-se também a presença esparsa de macrófagos e a formação de cápsula fibrosa espessa envolvendo a reação inflamatória remanescente (Figura 12).

Já o EndoRez (Grupo IV) promoveu a manutenção de infiltrado inflamatório de moderado a intenso (Figura 13), com predominância de linfócitos e plasmócitos. Ocasionalmente, ainda puderam ser observados alguns neutrófilos dispostos de maneira esparsa e a presença de abscesso. Os macrófagos permaneceram aparecendo em grande quantidade. Em relação à condensação fibrosa, observou-se a formação de cápsula fibrosa espessa junto à reação inflamatória produzida pelo cimento.

A tabela 3 aponta os resultados dos quatro grupos avaliados no período experimental de 60 dias.

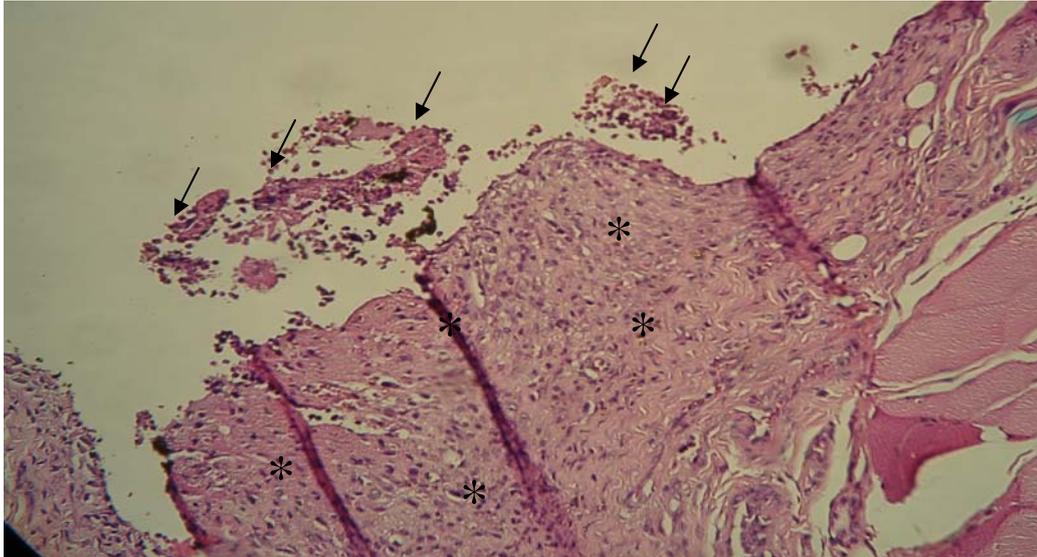


Figura 10: Reação inflamatória ao cimento EndoFill no período pós-operatório de 60 dias. Nota-se manutenção do infiltrado inflamatório crônico (*) e a presença de abscesso (setas).

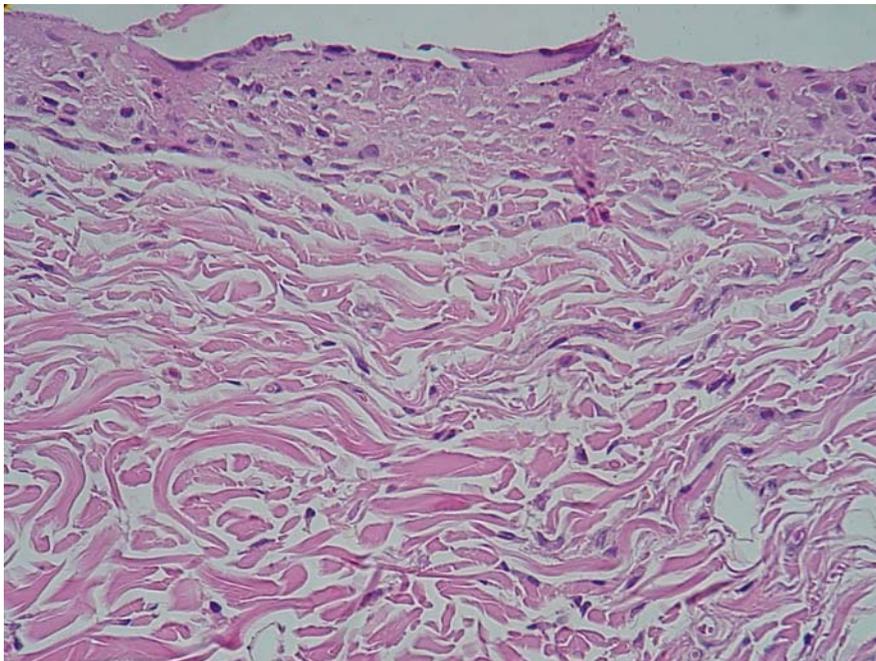


Figura 11: Aspecto histopatológico de amostra do Grupo II no período experimental de 60 dias. Observa-se cicatrização do tecido.

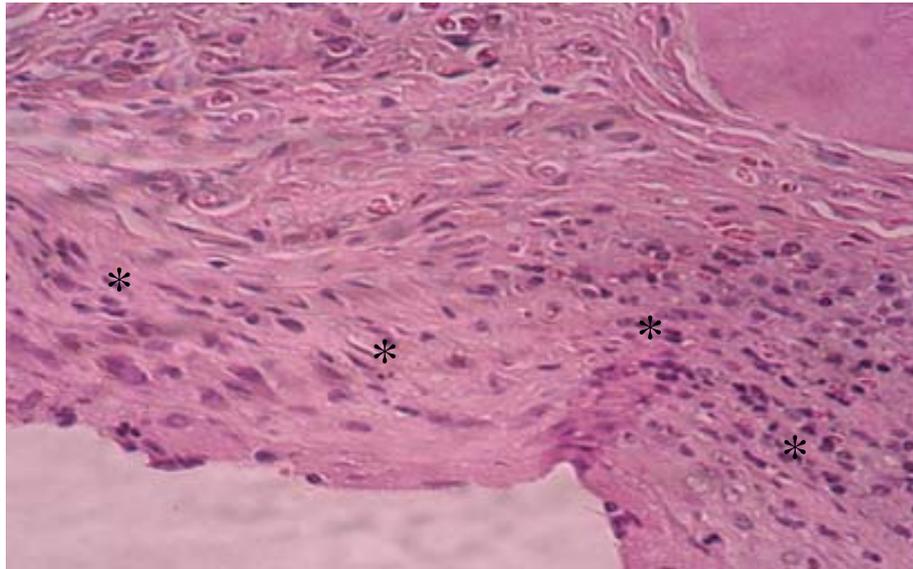


Figura 12: Aspecto da reação tecidual ao cimento AH Plus no período de 60 dias apresentando infiltrado inflamatório crônico moderado (*).

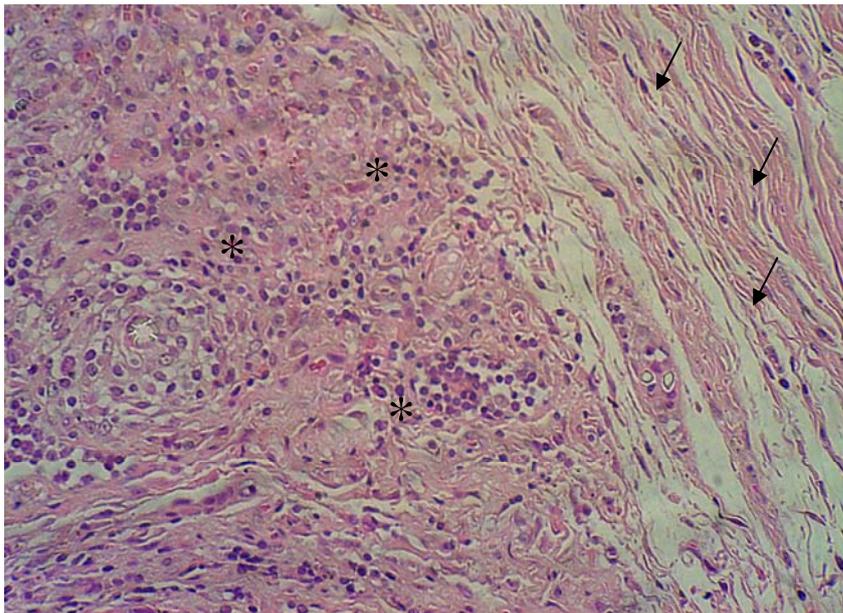


Figura 13: Aspecto da reação inflamatória produzida pelo cimento EndoRez no período pós-operatório de 60 dias. Presença de infiltrado linfoplasmocitário (*) limitado por cápsula fibrosa (setas).

Tabela 3. Comparação entre os grupos no período experimental de 60 dias

<i>Grupo</i>	Escore Médio	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Teste de Friedman</i>	<i>P</i>
Condensação Fibrosa				
Grupo 1	2,17	0,75	6,750	0,080
Grupo 2	2,83	0,41		
Grupo 3	3,00	0,00		
Grupo 4	2,83	0,41		
Neutrófilos				
Grupo 1	1,17	0,41	2,000	0,572
Grupo 2	1,00	0,00		
Grupo 3	1,00	0,00		
Grupo 4	1,17	0,41		
Eosinófilos				
Grupo 1	1,00	0,00	-	-
Grupo 2	1,00	0,00		
Grupo 3	1,00	0,00		
Grupo 4	1,00	0,00		
Linfócitos/Plasmócitos				
Grupo 1	3,83 ^A	0,41	12,161	0,007
Grupo 2	1,17 ^B	0,41		
Grupo 3	2,33 ^{AB}	1,37		
Grupo 4	3,00 ^A	0,63		
Células gigantes				
Grupo 1	1,33	0,52	6,000	0,112
Grupo 2	1,00	0,00		
Grupo 3	1,00	0,00		
Grupo 4	1,00	0,00		
Macrófagos				
Grupo 1	2,50 ^A	0,55	11,712	0,008
Grupo 2	1,00 ^B	0,00		
Grupo 3	1,50 ^{AB}	0,84		
Grupo 4	2,67 ^A	0,52		
Abscesso				
Grupo 1	1,33	0,82	2,000	0,572
Grupo 2	1,00	0,00		
Grupo 3	1,00	0,00		
Grupo 4	1,17	0,41		

* Escores seguidos de mesma letra não diferem entre si

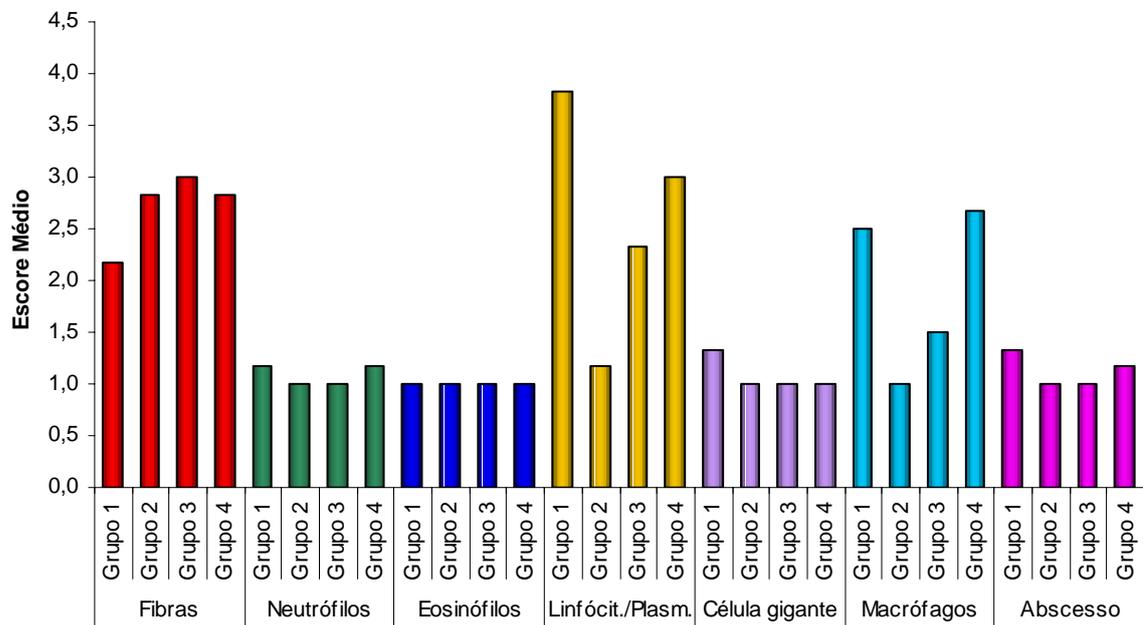
Através dos resultados do teste não-paramétrico de Friedman, verificou-se que existiu diferença significativa para as variáveis *linfócitos e plasmócitos* ($p=0,007$) e *macrófagos* ($p=0,008$).

No período experimental de 60 dias, notou-se uma redução do infiltrado inflamatório de linfócitos e plasmócitos na maioria dos grupos. Observou-se, porém, uma diferença significativa entre os grupos estudados, sendo que Grupo I (cimento EndoFill) e o Grupo IV (cimento Endorez), apresentaram resultados significativamente superiores aos do Grupo II (controle) ($p=0,020$). O Grupo III (AH Plus) apresentou reação inflamatória que manteve posição intermediária entre o Grupo II (controle) e os Grupos I (EndoFill) e IV (EndoRez), não havendo sido observadas diferenças estatisticamente significantes.

Em relação à presença de macrófagos, no período de 60 dias, verificou-se que existiu diferença significativa para os escores entre os grupos estudados. Observou-se que os grupos I (EndoFill) ($p=0,024$) e IV (EndoRez) ($p=0,023$) apresentaram escores significativamente superiores ao Grupo II (grupo controle). Da mesma maneira que em relação ao infiltrado linfoplasmocitário, o Grupo III (AH Plus) manteve-se em posição intermediária, sem apresentar diferenças estatisticamente significantes em comparação aos demais grupos de estudo.

Os resultados do período experimental de 60 dias podem ser observados no Gráfico 3.

Gráfico 3. Comparação entre os grupos: 60 dias



Também foram observadas as diferenças entre os três períodos experimentais para cada um dos grupos. A tabela 4 apresenta os resultados referentes ao Grupo I (EndoFill) nos três períodos experimentais avaliados.

Tabela 4. Comparação entre os tempos: Grupo I

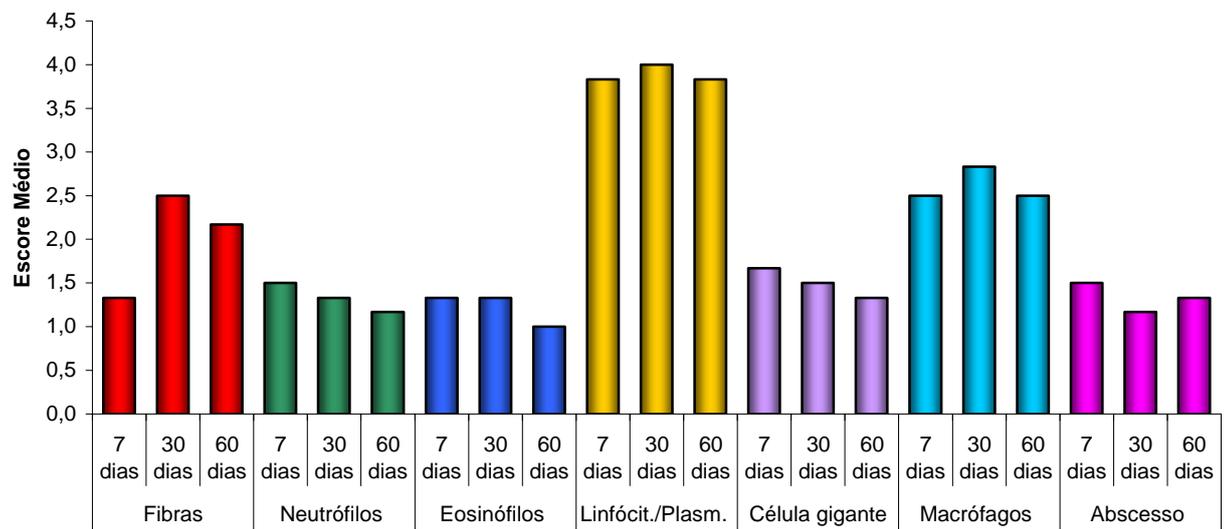
Período	<i>N</i>	<i>Escore Médio</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Kruskal-Wallis</i>	<i>P</i>
Condensação Fibrosa					
7 dias	6	1,33 ^A	0,52	7,367	0,025
30 dias	6	2,50 ^B	0,55		
60 dias	6	2,17 ^{AB}	0,75		
Neutrófilos					
7 dias	6	1,50	0,55	1,605	0,448
30 dias	6	1,33	0,82		
60 dias	6	1,17	0,41		
Eosinófilos					
7 dias	6	1,33	0,52	2,429	0,297
30 dias	6	1,33	0,52		
60 dias	6	1,00	0,00		
Linfócitos/Plasmócitos					
7 dias	6	3,83	0,41	1,063	0,588
30 dias	6	4,00	0,00		
60 dias	6	3,83	0,41		
Células gigantes					
7 dias	6	1,67	0,52	1,259	0,533
30 dias	6	1,50	0,55		
60 dias	6	1,33	0,52		
Macrófagos					
7 dias	6	2,50	0,55	1,766	0,413
30 dias	6	2,83	0,41		
60 dias	6	2,50	0,55		
Abscesso					
7 dias	6	1,50	0,55	1,605	0,448
30 dias	6	1,17	0,41		
60 dias	6	1,33	0,82		

* Escores seguidos de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis verificou-se que existiu diferença significativa para a variável *condensação fibrosa* ($p=0,025$). O Teste U de Mann-Whitney mostrou que no período de 7 dias essa variável apresentou escores inferiores aos do período de 30 dias ($p=0,011$). As demais variáveis não apresentaram diferenças estatisticamente significantes nos períodos experimentais avaliados.

A comparação dos resultados do Grupo I nos três períodos experimentais também pode ser observada no Gráfico 4.

Gráfico 4. Comparação entre os tempos: Grupo I



A tabela 5 apresenta os resultados do Grupo II (grupo controle) para os três períodos experimentais avaliados.

Tabela 5. Comparação entre os tempos: Grupo II

<i>Período</i>	<i>N</i>	<i>Escore Médio</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Kruskal-Wallis</i>	<i>P</i>
Condensação Fibrosa					
7 dias	6	2,17 ^A	0,41	7,065	0,029
30 dias	6	2,83 ^B	0,41		
60 dias	6	2,83 ^B	0,41		
Neutrófilos					
7 dias	6	1,00	0,00	2,000	0,368
30 dias	6	1,33	0,82		
60 dias	6	1,00	0,00		
Eosinófilos					
7 dias	6	1,00	0,00	4,250	0,119
30 dias	6	1,33	0,52		
60 dias	6	1,00	0,00		
Linfócitos/Plasmócitos					
7 dias	6	2,33 ^A	0,52	11,615	0,003
30 dias	6	3,17 ^A	0,98		
60 dias	6	1,17 ^B	0,41		
Células gigantes					
7 dias	6	1,00	0,00	4,250	0,119
30 dias	6	1,33	0,52		
60 dias	6	1,00	0,00		
Macrófagos					
7 dias	6	1,17	0,41	4,406	0,110
30 dias	6	1,67	0,82		
60 dias	6	1,00	0,00		
Abscesso					
7 dias	6	1,00	0,00	2,000	0,368
30 dias	6	1,17	0,41		
60 dias	6	1,00	0,00		

* Escores seguidos de mesma letra não diferem entre si

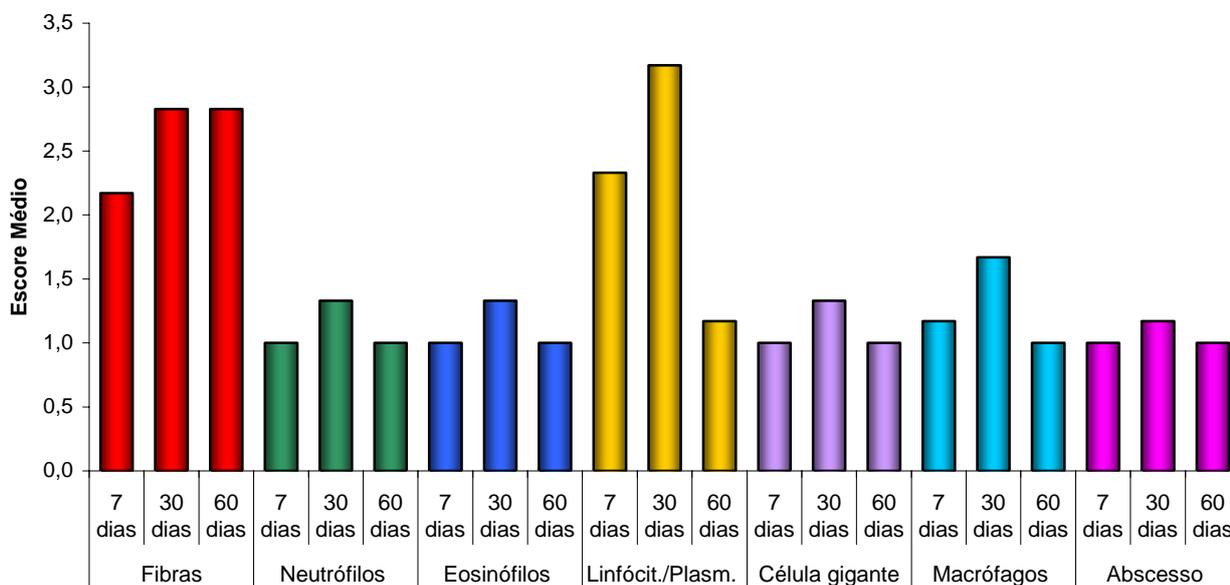
Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis verificou-se que existiu diferença significativa para a variável *condensação fibrosa*. O teste U de Mann-Whitney mostra que o período de 7 dias apresentou escores estatisticamente inferiores aos dos períodos de 30 ($p=0,027$) e 60 dias ($p=0,027$).

Também se observou diferença estatisticamente significativa para a variável *Linfócitos e Plasmócitos*. O teste U de Mann-Whitney mostrou que o período de 7 dias

diferiu significativamente do tempo de 60 dias ($p=0,006$), e o período de 30 dias apresentou escores superiores aos do período de 60 dias ($p=0,004$).

Os resultados do Grupo II nos três períodos experimentais estão expostos no Gráfico 5.

Gráfico 5. Comparação entre os tempos: Grupo 2



A tabela 6 apresenta os resultados do grupo III (AH Plus) nos períodos experimentais de 7, 30 e 60 dias.

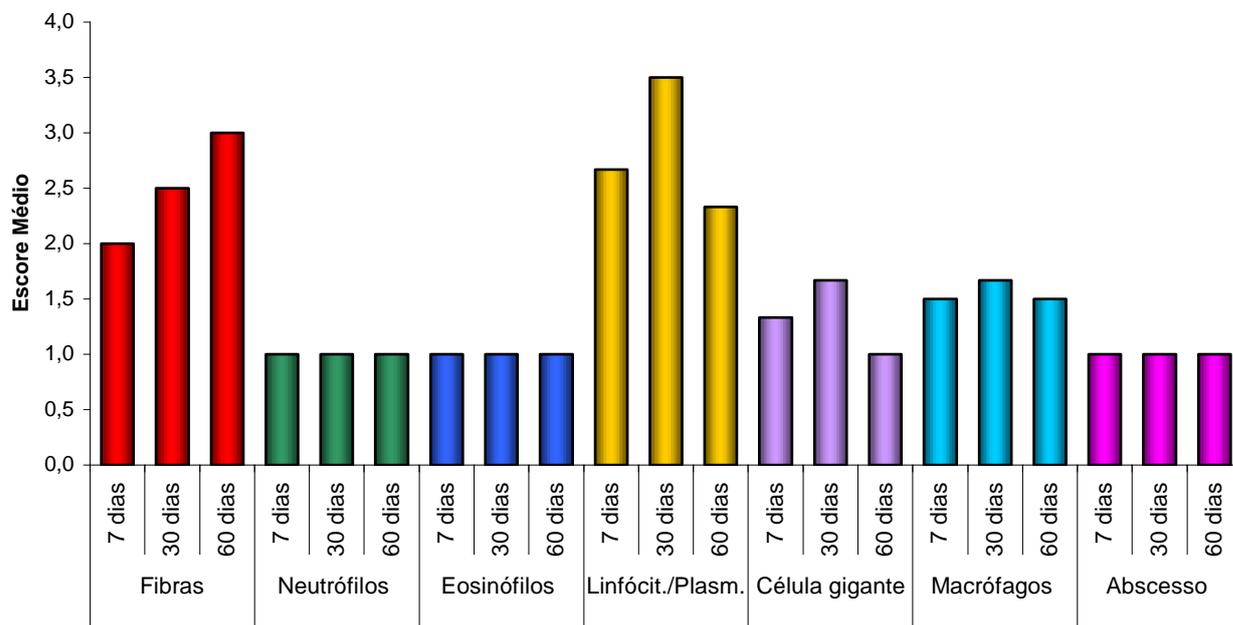
Tabela 6. Comparação entre os tempos: Grupo III

<i>Período</i>	<i>N</i>	<i>Escore Médio</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Kruskal-Wallis</i>	<i>P</i>
Condensação Fibrosa					
7 dias	6	2,00 ^A	0,00	11,333	0,003
30 dias	6	2,50 ^{AB}	0,55		
60 dias	6	3,00 ^B	0,00		
Neutrófilos					
7 dias	6	1,00	0,00	-	-
30 dias	6	1,00	0,00		
60 dias	6	1,00	0,00		
Eosinófilos					
7 dias	6	1,00	0,00	-	-
30 dias	6	1,00	0,00		
60 dias	6	1,00	0,00		
Linfócitos/Plasmócitos					
7 dias	6	2,67	0,82	3,515	0,172
30 dias	6	3,50	0,84		
60 dias	6	2,33	1,37		
Células gigantes					
7 dias	6	1,33	0,52	5,667	0,059
30 dias	6	1,67	0,52		
60 dias	6	1,00	0,00		
Macrófagos					
7 dias	6	1,50	0,55	0,604	0,739
30 dias	6	1,67	0,52		
60 dias	6	1,50	0,84		
Abscesso					
7 dias	6	1,00	0,00	-	-
30 dias	6	1,00	0,00		
60 dias	6	1,00	0,00		

* Escores seguidos de mesma letra não diferem entre si

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis verifica-se que existe diferença significativa apenas para a variável *condensação fibrosa*. De acordo com o teste U de Mann-Whitney, o período de 7 dias apresentou escores inferiores ao período de 60 dias ($p=0,001$). Os resultados do Grupo III podem ser observados no Gráfico 6.

Gráfico 6. Comparação entre os tempos: Grupo III



A tabela 7 apresenta os resultados do Grupo IV (EndoRez) nos três períodos experimentais avaliados.

Tabela 7. Comparação entre os tempos: Grupo IV

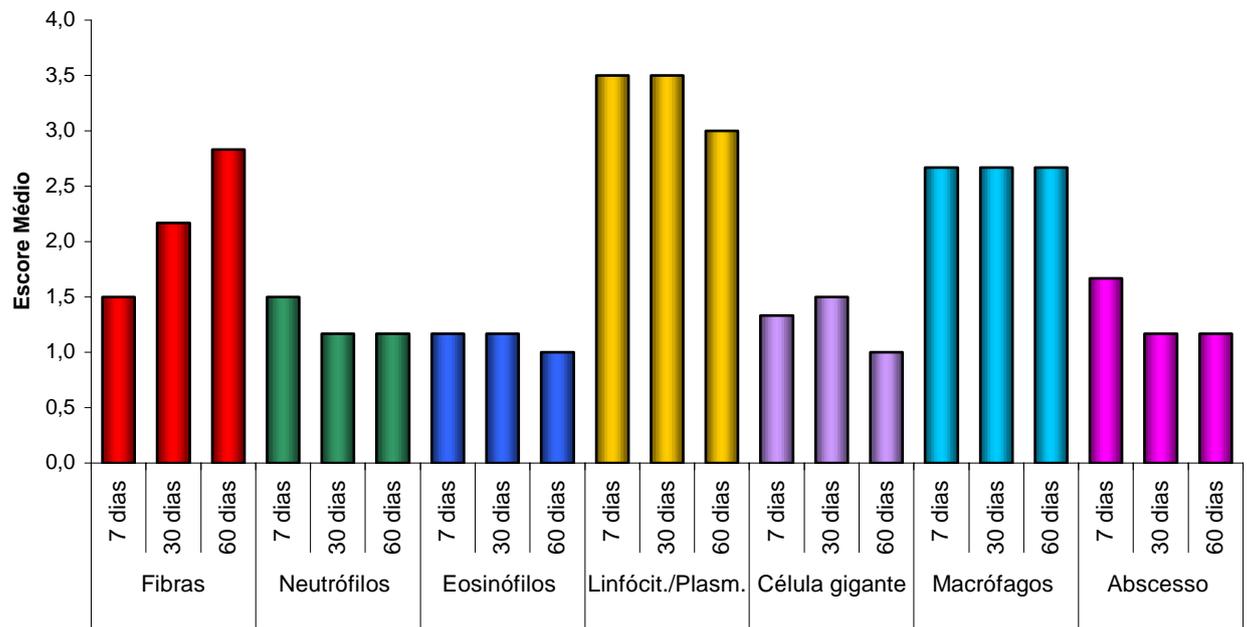
<i>Período</i>	<i>N</i>	<i>Escore Médio</i>	<i>Desvio-padrão</i>	<i>Kruskal-Wallis</i>	<i>P</i>
Condensação Fibrosa					
7 dias	6	1,50 ^A	0,55	10,798	0,005
30 dias	6	2,17 ^{AB}	0,41		
60 dias	6	2,83 ^B	0,41		
Neutrófilos					
7 dias	6	1,50	0,55	2,092	0,351
30 dias	6	1,17	0,41		
60 dias	6	1,17	0,41		
Eosinófilos					
7 dias	6	1,17	0,41	1,063	0,588
30 dias	6	1,17	0,41		
60 dias	6	1,00	0,00		
Linfócitos/Plasmócitos					
7 dias	6	3,50	0,84	2,361	0,307
30 dias	6	3,50	0,84		
60 dias	6	3,00	0,63		
Células gigantes					
7 dias	6	1,33	0,52	3,662	0,160
30 dias	6	1,50	0,55		
60 dias	6	1,00	0,00		
Macrófagos					
7 dias	6	2,67	0,52	-	-
30 dias	6	2,67	0,52		
60 dias	6	2,67	0,52		
Abscesso					
7 dias	6	1,67	0,82	2,414	0,299
30 dias	6	1,17	0,41		
60 dias	6	1,17	0,41		

* Escores seguidos de mesma letra não diferem entre si

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis verificou-se que existiu diferença significativa para a variável *condensação fibrosa*. O teste U de Mann-Whitney mostra que o período de 7 dias apresentou escores inferiores aos dos períodos de 30 dias ($p=0,043$) e 60 dias ($p=0,027$).

Os resultados do Grupo IV nos três períodos experimentais avaliados podem ser observados no Gráfico 7.

Gráfico 7. Comparação entre os tempos: Grupo IV



6. DISCUSSÃO

6.1- Sobre a Metodologia Empregada

Da definição do experimento

Os testes de implantação subcutânea são amplamente utilizados para avaliação da resposta tecidual a cimentos endodônticos, sendo considerada uma metodologia destinada a avaliação da compatibilidade biológica em nível secundário. Tal etapa do processo de determinação da biocompatibilidade permite averiguar o comportamento dos materiais em contato com tecidos semelhantes aos envolvidos na terapia endodôntica, tornando possível, dentro de determinados limites, a projeção dos possíveis efeitos dos materiais nos tecidos da região apical e periapical.

Os experimentos em tecido conjuntivo subcutâneo ainda apresentam como vantagem o fato de ser uma técnica bem controlada, com menor número de variáveis e padronizada, além de permitir a obtenção de resultados em curto período de tempo (COSTA, 2001a).

As principais metodologias para avaliação da reação tecidual a cimentos endodônticos em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos envolvem a injeção direta do material nos tecidos e a implantação de tubos contendo os materiais experimentais. No presente estudo optou-se pela implantação de tubos de polietileno, uma vez que essa metodologia permite a padronização da interface cimento/tecido, o que reduz o risco de que a presença de grande quantidade do material em contato direto com o tecido conjuntivo aumente exageradamente a reação inflamatória tecidual (não reproduzindo a realidade clínica). Além disso, oferece maior facilidade no momento da biópsia (pois os tubos indicam os locais em que se deve fazer a incisão) e na análise dos resultados (por

facilitar a observação de reações em áreas mais restritas, auxiliando na determinação da severidade da resposta).

O material de escolha para os tubos foi o polietileno, material amplamente utilizado com esse propósito, sendo sua aceitabilidade comprovada por estudos de Torneck (1966) e Onyck (1970). Os materiais foram implantados logo após sua espatulação, a fim de reproduzir as condições em que entram em contato com os tecidos periapicais durante o tratamento endodôntico.

No presente estudo optou-se pelo emprego de ratos *Wistar* para a implantação dos tubos de polietileno. Este é considerado o modelo biológico padrão para os testes secundários dos materiais estudados. A determinação da idade e peso do animal (90 a 120 dias e pesando entre 300 e 400g) deveu-se a escolha de características que proporcionassem condições de saúde e resistência capazes de suportar o procedimento durante o transcorrer do experimento (SEMENOFF, 2003).

Segundo Mittal, Chandra e Chandra (1995) o teste em ratos é uma forma econômica de se averiguar os efeitos biológicos de cimentos endodônticos.

As semelhanças entre ratos e humanos aparecem de forma mais específica depois da melhor concepção da biologia dos ratos obtida pelo mapeamento da maior parte do seu genoma no ano de 2004. Tal concepção é útil para estudos fisiológicos e farmacológicos, uma vez que o rato é o animal mais empregado nas pesquisas, e também embasa o modelo de estudo aqui definido (KOLA, 2004).

Os animais foram mantidos em gaiolas separadas a fim de evitar o acesso à região dorsal por outros animais no período pós-operatório, o que poderia levar ao deslocamento dos tubos, retardar o processo de reparo ou induzir infecção. A avaliação

dos 4 grupos foi realizada num mesmo animal, permitindo comparar as respostas produzidas em cada grupo sem a interferência de questões individuais de ordem imunológica.

Da definição dos períodos experimentais

Foram definidos períodos experimentais de sete, trinta e sessenta dias. A definição desses períodos baseou-se nas características das diversas fases do processo inflamatório e nas particularidades da metodologia empregada.

Quando se tem a intenção de observar a intensidade de eventos relacionados à inflamação aguda, devem ser programados períodos experimentais curtos (24-48h). Isso porque, nas primeiras horas após a agressão, o processo inflamatório estabelece uma defesa inata não induzida, caracterizada pela atuação do sistema complemento, com formação de compostos vasoativos, reconhecimento e fagocitose por macrófagos residentes (histiócitos) e liberação de mediadores químicos. Estes levam a alterações vasculares e a migração de células inflamatórias para o local da injúria (especialmente neutrófilos, principais combatentes no local acometido por inflamação aguda, que além de apresentarem atividade fagocitária, podem perpetuar a resposta inflamatória pela liberação de enzimas, mediadores químicos e radicais livres tóxicos) (PEREIRA; BOGLIOLO, 1993; SIQUEIRA, 2001a; SIQUEIRA, 2001b; MONTENEGRO; FACCHIO, 2004).

Apesar de reconhecer-se a importância da definição de reações imediatas a presença dos cimentos endodônticos, no presente estudo optou-se por não avaliar os materiais em períodos de 24-48 horas, uma vez que as características da reação inflamatória produzida pelos cimentos estariam mascaradas pela resposta induzida pelo

trauma do próprio ato cirúrgico. De acordo, autores como Kallus e Eklund (1983) afirmam que a exacerbação da resposta inflamatória em períodos demasiadamente curtos pode ser devida ao trauma cirúrgico. Segundo os autores o processo de reparação causado pelo trauma cirúrgico pode interferir no processo de avaliação das alterações teciduais causadas pelo material implantado.

Por outro lado, apesar de não haver sido realizada a avaliação em período experimental curto, atentou-se para o fato de que a permanência de características relacionadas a inflamação aguda por períodos mais prolongados confere caráter de maior agressividade ao material testado. Em períodos experimentais mais longos espera-se observar o estabelecimento e as características de uma reação inflamatória crônica, que varia em intensidade e duração de acordo com as características dos materiais testados.

Entretanto, há situações em que os neutrófilos podem continuar chegando em grande número ao foco inflamatório por períodos variáveis, às vezes semanas, na dependência do tipo de agressão e de sua permanência no foco. Os macrófagos também podem estar presentes, auxiliando na fagocitose (PEREIRA; BOGLIOLO, 1993; SIQUEIRA, 2001a; MONTENEGRO; FACCHIO, 2004).

Nos períodos avaliados no presente estudo (sete, trinta e sessenta dias) observa-se a intensidade e a permanência de um quadro inflamatório por mais tempo, o que leva a verificação de uma resposta imunológica adaptativa, também conhecida como resposta inflamatória crônica. Nessa etapa ocorre a resposta imune celular, com presença de linfócitos T- helper, T-citotóxicos e produtos secretados por essas populações celulares. Além disso, podem ser observados macrófagos que, além de terem papel participante no combate ao agente agressor, podem induzir direta ou indiretamente a destruição do

parênquima tecidual. Na reação inflamatória crônica também pode ser observada a resposta imune humoral, caracterizada pela produção de anticorpos sintetizados por plasmócitos, a neoformação vascular e a estimulação de fibroblastos, que passam a produzir colágeno caracterizando o processo de reparo com formação de fibrose. Dessa forma, a resposta inflamatória crônica apresenta períodos de destruição tecidual alternados com períodos de reparo (PEREIRA; BOGLIOLO, 1993; MONTENEGRO, 2004; ANDRADE, 2004; KUNIE, 2004). Tal assertiva é apoiada por achados histológicos evidenciados no presente estudo, os quais comprovam a coexistência de uma reação inflamatória crônica com o reparo dos tecidos lesados nos períodos experimentais mais longos.

Sendo assim, avaliação histopatológica da resposta provocada pelos materiais baseou-se nas características da reação inflamatória produzidas por esse material junto ao tecido conjuntivo dos animais experimentais, durante os períodos de 7, 30 e 60 dias pós-operatório.

De acordo, Costa (2001a) recomenda a avaliação da resposta intermediária em períodos de 7 e 30 dias, a fim de observar a evolução do quadro reacional frente aos materiais em teste, e de 60 dias para sinalizar o mecanismo de reparação em períodos mais longos.

6.2- Da análise dos resultados

De acordo com Perassi (2004), os materiais obturadores do canal radicular devem preencher requisitos biológicos tais como: (1) ter pouca solubilidade; (2) não estimular resposta inflamatória ou estimular resposta que se desenvolva dentro de parâmetros que permitam ao tecido reparador isolar o material obturador do tecido

conjuntivo *per se* por meio de formação de cápsula fibrosa após o período inicial de reparação e; 3) não promover persistência de infiltrado inflamatório intenso ou moderado que impeça ou retarde o início do reparo.

Nos dados revisados na literatura, fica clara a busca por classificar os graus de reação inflamatória, procurando avaliar fatores como o componente celular inflamatório, as características da condensação fibrosa e a ocorrência de abscesso e necrose tecidual. Entretanto, ao analisar os estudos que observam a reação tecidual a materiais, nota-se a ausência de padronização na metodologia de avaliação da reação inflamatória, ainda que tentativas de estabelecimento de critérios tenham sido sugeridas por normatizações da ANSI/ADA (1979) e FDI (1980). Essa ausência de padronização pode ser devida a algumas deficiências na metodologia sugerida por essas organizações, que apesar de proporcionarem a observação de aspectos importantes na definição e qualificação do tipo de resposta apresentada, não permitem uma comparação precisa do grau de resposta inflamatória, apresentando deficiências de objetividade.

Estudos como os de Molloy et al (1992), Kolokuris et al (1996), Görduysus, Etikän e Gökös (1998) e Kolokuris et al (1998) aproximam-se do tipo de avaliação sugerida e utilizam-se da análise descritiva dos eventos inflamatórios observados.

Essa maneira de verificação dos resultados apresenta como vantagem a observância dos diversos fatores envolvidos no processo inflamatório, o que permite o entendimento da reação promovida pelo material testado baseado no conhecimento dos eventos biológicos que caracterizam a inflamação e o processo de reparo. A partir da observação desses eventos, a avaliação da inflamação é relacionada com a intensidade e com a duração dos eventos inflamatórios. As características fundamentais do processo inflamatório são, portanto, contempladas em estudos que oferecem a análise descritiva

dos resultados, classificando a inflamação em graus de severidade (como ausente, leve, moderado e intenso).

Por um lado, a análise descritiva é pouco objetiva, prescindindo da possibilidade de avaliação e da comparação precisa das respostas observadas. Essa dificuldade estende-se para a definição de aceitabilidade do material testado, a qual, segundo os critérios FDI / ISO, sugere critérios de interpretação dos resultados, os quais consideram a reação aceitável ou inaceitável na dependência dos graus de inflamação em diferentes períodos experimentais.

A partir dessas dificuldades foram surgindo tentativas de quantificação da resposta inflamatória que permitissem a comparação entre grupos de estudo por meio de testes estatísticos.

Autores como Yesilsoy et al (1988) e Ligocki (1998) avaliam a resposta tecidual a partir da contagem do número de células inflamatórias observadas. Esse tipo de avaliação permite menor subjetividade e maior precisão, conferindo aos estudos a possibilidade de avaliação estatística dos resultados e da comparação entre grupos de estudo.

Apesar de bastante simples e objetivo, esse método de análise não oferece dados referentes a características específicas do processo inflamatório em suas diversas fases, não qualifica o tipo de reação e deixa de apontar fatores importantes na avaliação da aceitabilidade dos materiais. Entre esses fatores pode ser citada a caracterização da presença de alguns tipos celulares que atuam durante as diversas etapas do processo inflamatório desempenhando diferentes papéis.

Pelas razões expostas, o presente estudo segue os critérios de avaliação da resposta inflamatória apresentados por Figueiredo (2001) e utilizados por Só (2004). Essa alternativa possibilita complementar a análise descritiva dos eventos observados pela análise objetiva dos resultados, e permite a qualificação do tipo de reação apresentada, observando elementos celulares que desempenham papéis específicos importantes e contemplando eventos que juntamente com as células caracterizam a intensidade da reação inflamatória (como a formação de condensação fibrosa e de abscesso tecidual).

Em relação ao componente celular inflamatório, buscou-se atentar para células que apresentam papel importante no processo e que podem delinear características de aceitabilidade dos materiais. Entre elas, observamos a presença e a predominância de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e células gigantes.

Linfócitos e plasmócitos apareceram como as células mais prevalentes nas lâminas analisadas em todos os períodos experimentais, compondo grande parte do infiltrado inflamatório das amostras avaliadas. Tal prevalência é esperada, uma vez que essas células atuam na fase crônica da inflamação, a qual caracteriza os períodos experimentais observados. Os linfócitos e os plasmócitos relacionam-se com as respostas imunes de base celular e de síntese de anticorpos (PEREIRA; BOGLIOLO, 1993; SIQUEIRA, 2001a; KUNIE, 2004; MONTENEGRO; FACCHIO, 2004).

No período experimental de 7 dias, verificou-se diferença significativa para os escores relacionados a essa variável entre os grupos estudados. O Grupo I (tubos preenchidos com o cimento EndoFill) apresentou escores significativamente superiores ao Grupo II (grupo controle). Os Grupos III (AH Plus) e IV (EndoRez) apresentaram resultados intermediários aos observados nos Grupos I e II. Já no período experimental

subseqüente (30 dias), não houve diferença significativa para os escores entre os grupos estudados.

No período experimental de 60 dias, o Grupo I (Endofill) e o Grupo IV (Endorez) apresentaram infiltrado linfoplasmocitário significativamente superior ao do Grupo II (controle). Tal constatação foi devida à redução do infiltrado inflamatório nos grupos II (controle) e III (AH Plus), o que não ocorreu nas amostras referentes aos cimentos EndoFill e EndoRez.

Os cimentos de óxido de zinco e eugenol apresentam vasta literatura que enfatiza suas características de agressividade às células e aos tecidos vitais, desde estudos envolvendo testes primários (TAI; HUANG; CHANG, 2001; MENDES, 2003), passando por estudos envolvendo testes secundários (PERASSI, 2004; BATISTA et al, 2007) e testes de aplicação (TANOMARO FILHO et al, 1998; LEONARDO et al, 1999b). Tal característica pode ser evidenciada na reação inflamatória a esse material, a qual apontou para a presença de intenso infiltrado inflamatório crônico que se manteve ao longo dos três períodos experimentais avaliados.

Já o cimento à base de resina metacrilato (EndoRez) apresentou uma tendência a promover reação mais intensa do que a promovida pelo cimento AH Plus e pelo grupo controle, especialmente em períodos experimentais mais longos, como o observado nas lâminas referentes ao período de 60 dias. Tal observação encontra respaldo em outros trabalhos relacionados à biocompatibilidade. Essa evidência também foi observada por Zmener, Banegas e Pameijer (2005), os quais verificaram população celular mais abundante (formada em grande parte por linfócitos e plasmócitos) na reação ao cimento EndoRez em relação ao grupo controle.

De acordo, no estudo desenvolvido por Sousa et al (2006) houve semelhança nas reações teciduais aos cimentos AH Plus e EndoRez em período experimental de 4 semanas, com presença abundante de linfócitos para os dois cimentos testados, ao passo que a reação mostrou-se diminuída em 12 semanas para o cimento AH Plus e persistiu severa nas amostras relacionadas ao EndoRez. Ainda, Zafalon et al (2007) ressaltam a permanência da reação inflamatória ao cimento EndoRez por períodos mais prolongados. Por outro lado, Zmener e Pameijer (2004) não observaram diferenças de manutenção da reação inflamatória na presença do cimento EndoRez em relação ao grupo controle em períodos superiores à 60 dias.

Ao contrário do cimento à base de resina metacrilato, o cimento AH Plus apresentou infiltrado inflamatório semelhante ao do grupo controle em períodos experimentais mais longos. Essa relação de menor agressividade conferida ao AH Plus está respaldada nos estudos de Leonardo et al. (1999b) e Tai, Huang e Chang (2001).

Por outro lado, apenas para o Grupo II (controle) notou-se uma redução significativa para a variável *linfócitos e plasmócitos* nos três períodos experimentais. Tal constatação demonstra que a presença do cimento nos três grupos testados acarreta uma maior reação inflamatória, bem como a inexistência, dentre os materiais avaliados, de um cimento endodôntico com características ideais de biocompatibilidade. Nas amostras referentes ao AH Plus pode ser observada uma tendência à redução das características da reação inflamatória, ainda que estatisticamente não tenham sido observadas diferenças ao longo dos três períodos experimentais. Ao contrário, os cimentos EndoFill e EndoRez apresentaram uma tendência à manutenção prolongada das características da reação inflamatória.

De acordo com Yesilsoy et al (1988) o material biocompatível deve promover resposta inflamatória aceitável e restrita a curtos períodos de tempo, tornando-se, após as reações pós-operatórias iniciais, tão inerte quanto possível.

Outro aspecto avaliado que apontou diferenças significativas entre os grupos foi a presença de macrófagos. Essas células participam da eliminação do agente agressor, podendo também promover destruição tecidual pela liberação de radicais oxigenados, enzimas e citocinas (PEREIRA; BOGLIOLO, 1993; SIQUEIRA, 2001a; MONTENEGRO; FACCHIO, 2004). No presente estudo, no período de 7 dias pós-operatório, os Grupos I (EndoFill) e IV (EndoRez) apresentaram escores significativamente superiores aos grupos II (grupo controle) e III (AH Plus). Também nos períodos experimentais de 30 e 60 dias, observou-se que os grupos I (EndoFill) e IV (Endorez) apresentaram escores significativamente superiores aos grupos II (grupo controle) e III (AH Plus).

Ao avaliar os efeitos de cimentos de óxido de zinco e eugenol sobre a viabilidade e atividade de macrófagos, Mendes et al (2003) concluíram que os cimentos não interferiram na viabilidade dos macrófagos, mas que a sua aderência e capacidade de fagocitose foi alterada. Talvez em razão disso possa ser necessária uma maior mobilização de macrófagos para conter a agressão promovida por esse tipo de cimento, uma vez que as células se encontram com suas funções prejudicadas. Apesar de não se ter localizado estudos envolvendo influência dos cimentos a base de resina metacrilato na atividade e viabilidade de macrófagos, infere-se que a mesma reação possa ocorrer em relação ao cimento EndoRez, uma vez que esse apresentou resultados bastante semelhantes aos do cimento de óxido de zinco e eugenol no que se refere a presença de macrófagos.

Outro aspecto que contribui para a hipótese de diminuição da atividade dos macrófagos que atuam na reação ao cimento EndoRez é o fato de suas amostras apresentarem acúmulo de hemosiderina nos períodos de 7 e 30 dias. A hemosiderina representa um pigmento que marca o excesso de ferro presente nos tecidos em decorrência da degradação de hemácias. Esse pigmento normalmente é degradado pelos macrófagos, o que não ocorreu quando da presença do cimento EndoRez.

Já a presença de neutrófilos aparece reduzida em todos os períodos experimentais. Tal fato talvez seja devido a inexistência de um período experimental mais curto, de 24-48 horas. De acordo com Siqueira (2001a) os neutrófilos apresentam função na resposta inflamatória aguda à lesão tecidual, caracterizando-se por serem células móveis com atividade fagocitária. Podem estar envolvidos nos processos crônicos em número reduzido, mas em processos supurativos, ainda que crônicos, podem exercer papel de destaque. No presente estudo, ainda que não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nos períodos experimentais avaliados, nota-se, no período experimental de 7 dias uma maior tendência à presença de neutrófilos no Grupo I (EndoFill) e no Grupo IV (EndoRez) em relação ao Grupos II (grupo controle) e ao Grupo III (AH Plus), o que denota a permanência de algumas das características de um quadro inflamatório agudo por período mais prolongado e sustenta, juntamente com os achados referentes à manutenção das características do infiltrado linfoplasmocitário e da presença mais pronunciada de macrófagos nesses grupos, a afirmação de que a reação inflamatória é mais duradoura e intensa para esses materiais.

Os dados revisados na literatura sustentam os resultados encontrados. Koloukuris et al (1996) observaram a presença de neutrófilos na reação tecidual ao

cimento Tubli Seal (um cimento de óxido de zinco e eugenol), em períodos experimentais de 5 e 15 dias, sendo a reação reduzida em períodos mais longos. Da mesma forma, ao avaliar a reação tecidual de um cimento de óxido de zinco e eugenol, Koloukoria et al (1998) observaram a presença de neutrófilos em período equivalente a 5 dias, sendo a intensidade da reação inflamatória diminuída a partir do período de 15 dias. No que se refere aos cimentos à base de resina metacrilato, os achados de Zmener (2004) já haviam mostrado a presença de neutrófilos no tecido conjuntivo de ratos após a exposição ao cimento Endorez. De acordo, Zmener, Banegas e Pameijer (2005), ao avaliar a reação produzida pelo cimento Endorez em tecido ósseo, mostram maior número de células inflamatórias (entre as quais os neutrófilos) na reação produzida por esse cimento em relação ao grupo controle.

A maior tendência à presença de polimorfonucleares neutrófilos nas amostras referentes aos cimentos EndoFill e EndoRez também pode ter contribuído para a presença abundante de macrófagos nesses dois grupos experimentais. Os neutrófilos em contato com cimentos endodônticos liberam enzimas para o meio extracelular, destruindo as proteínas estruturais do tecido. Esta lise possivelmente atrai macrófagos para a região, propiciando uma renovação celular constante estimulada pela morte celular (BERBERT; CONSOLARO, 1994).

Quanto aos eosinófilos, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos períodos experimentais avaliados. Os eosinófilos estão relacionados com a destruição de sistemas antígeno-anticorpo, sendo bastante encontrados em reações de hipersensibilidade. Possuem também ação bloqueadora da ação de histaminas, desempenhando papel nas fases tardias de algumas inflamações (SIQUEIRA, 2001a). A presença desse tipo de célula inflamatória,

entretanto, mostrou-se bastante reduzida, ainda que observada nos períodos experimentais de 7 e de 30 dias. Autores como Kolokuris et al (1996), Kolokuris et al (1998), Zmener (2004) e Sousa et al (2006) também não observaram abundante presença desse tipo celular ao avaliar a reação a cimentos endodônticos. Por outro lado, Göduysus, Etikan e Gökös (1998) observaram presença abundante de eosinófilos na reação ao cimento Endofill no período experimental de dois dias. No presente estudo, apesar de não haver sido detectada diferença estatisticamente significativa para essa variável, o EndoFill foi o cimento que promoveu maior ocorrência de reação por células do tipo eosinófilo, marcando também uma tendência de maior agressividade. Isso talvez tenha sido observado em função de o eugenol (parte componente do produto) ser um material com potencial alérgico.

Já as células gigantes multinucleadas representam, em conjunto com a presença de macrófagos, uma reação do tipo corpo estranho, o que caracteriza presença de material de difícil degradação por parte do organismo (KUNIE, 2004; ANDRADE; 2004). No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados em todos os períodos experimentais, e a presença de células gigantes foi bastante reduzida.

Outro aspecto por vezes negligenciado na avaliação da resposta biológica a materiais é a formação de cápsula fibrosa. A formação dessa estrutura, de acordo com Perassi (2004) é um critério de aceitabilidade do material, pois representa uma resposta do tecido imune que torna corpos estranhos reconhecidos inofensivos ao organismo. O fibrosamento varia em densidade e organização, podendo estar disposto ao acaso ou apresentar característica capsular. De acordo, autores como Catanzaro Guimarães e Percinoto (1984) se valeram da presença da cápsula fibrosa como um dos parâmetros

auxiliares na avaliação da aceitabilidade dos materiais em implantação subcutânea. Por outro lado, autores como Podshadley e Harrison (1966) e Alle, Alle e Marchesano (1998) afirmam que a espessura da cápsula fibrosa é diretamente proporcional à intensidade da resposta tecidual, e Wolfaardt et al (1992) defendem que a cápsula fibrosa que se forma ao redor do implante é inaceitável em testes subcutâneos.

Os critérios de avaliação utilizados neste estudo contemplam a observação da presença e das características de espessura da condensação fibrosa, permitindo verificar sua relação com o processo inflamatório. A presente pesquisa concorda, portanto, com os autores que consideram a formação da cápsula fibrosa um critério de aceitabilidade do material.

A presença da cápsula fibrosa permite também identificar se há restrição de extensão do processo inflamatório, já que a formação de tecido fibroso limita a presença do infiltrado inflamatório às áreas em contato próximo com o material. Acredita-se, portanto, que a observação da formação da cápsula fibrosa é um critério que permite observar também a extensão da reação inflamatória.

Outra proposta de avaliação da intensidade da resposta inflamatória é a verificação da extensão da resposta por meio de histomorfometria. Kaplan et al (2003) verificaram o volume da reação inflamatória, conferindo caráter de maior agressividade a materiais que apresentassem reação inflamatória que envolvesse áreas mais distantes. A dificuldade em tal metodologia reside na padronização de ângulos de corte durante o processamento das lâminas histológicas, que inviabiliza a comparação precisa de áreas de inflamação. Devido a essas características de dificuldade metodológica, consideramos a condensação fibrosa um critério mais confiável, que permite avaliar, inclusive, a extensão da resposta inflamatória.

Em relação a essa variável, observou-se um progressivo aumento da espessura do tecido conjuntivo fibroso ao longo dos três períodos experimentais, limitando a zona de reação inflamatória às áreas mais próximas dos materiais para todos os grupos avaliados. A comparação das características da condensação fibrosa entre os grupos aponta para semelhanças entre os cimentos AH Plus, EndoRez e o grupo controle.

Entretanto, o cimento EndoFill (Grupo I) apresentou, nos períodos experimentais de 7 dias condensação fibrosa menos intensa em relação aos demais grupos de estudo. Tal característica evidencia maior poder de agressividade aos tecidos, uma vez que a presença de cápsula fibrosa bem organizada limitando a área de inflamação inviabiliza que a reação inflamatória seja estendida para regiões distantes da área de contato com o material experimental.

De acordo, Nassri, Lia e Bombana (2003) afirmam que a evolução mais lenta da colagenização, juntamente com características de manutenção da presença de macrófagos e do infiltrado inflamatório, permite determinar características de maior agressividade ao material, uma vez que evidencia reparo tecidual mais lento.

Além dos aspectos já comentados, a metodologia de escolha para análise dos resultados desse estudo contempla a observação da presença de abscesso promovido pelo contato com os materiais. Outros estudos, como os de Pertot et al (1992), Kolokuris et al (1996), Kolokuris et al (1998) e Sousa et al (2006) também contemplam a análise dessa característica, a qual confere ao material caráter de agressividade.

Em relação à presença de abscesso tecidual, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhum dos períodos experimentais avaliados. A presença de abscesso pareceu ser bastante reduzida, sendo sua ocorrência

ocasionalmente detectada, especialmente nos grupos relacionados ao cimento de óxido de zinco e eugenol (EndoFill) e ao cimento à base de resina metacrilato (EndoRez). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ainda que esses materiais apresentassem maior tendência a essa característica.

Kolokouris et al (1998) também observaram a presença de abscesso nas amostras relacionadas a cimentos a base de óxido de zinco e eugenol em estudo em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. De maneira semelhante, ao avaliar a reação promovida pelo cimento EndoRez em tecido ósseo, Sousa et al (2006) observaram a indução de necrose tecidual, especialmente no período experimental de 4 semanas. De acordo com os autores, o cimento não apresentou características de biocompatibilidade ao tecido ósseo.

7. CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais desse estudo e a partir da análise dos resultados pode-se concluir que:

- Em relação ao componente celular inflamatório:

1) Linfócitos e plasmócitos foram as células mais prevalentes nos quatro grupos de estudo. Nos períodos de 7 e 60 dias, o infiltrado linfoplasmocitário apresentou-se mais intenso na reação inflamatória promovida pelos cimentos EndoFill e EndoRez;

2) Os cimentos EndoFill e EndoRez também promoveram maior ocorrência de macrófagos nos períodos de 7, 30 e 60 dias;

3) Neutrófilos, eosinófilos e células gigantes foram observados em número reduzido em todos os grupos e nos três períodos experimentais.

- Em relação à condensação fibrosa:

Apenas o cimento EndoFill apresentou diferenças estatisticamente significativas que evidenciaram menor condensação fibrosa no período experimental de 7 dias.

- Em relação à formação de abscesso:

A indução de abscesso foi reduzida nos quatro grupos de estudo.

- Em relação à comparação entre os períodos experimentais:

Na comparação entre os três períodos experimentais, notou-se a redução significativa ao longo do tempo das características da reação inflamatória apenas para o

grupo controle. Tal observação torna evidente a ausência, dentre os materiais testados, de um cimento com características ideais de biocompatibilidade.

8. REFERÊNCIAS*

AHLBERG, K.M.F.; TAY, W.M. A methacrilate-based cement used as a root canal sealer. **Int. End. J.**, Oxford, v. 31, no. 1, p. 15-21, Jan., 1998.

ALLE, N.; ALLE, N.; MARCHESANO, L.H. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (indomethacin, phenylbutazone, sulindac, naproxen, benzydamine and neflumic acid) on rat leukograms with a chronic inflammatory process. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 120-6, abr./jun., 1988.

ANDRADE, Z.A. Tecido conjuntivo: reparo, regeneração e cicatrização. In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**. 4 ed. São Paulo: Atheneu.2004. Cap.8, p.135-151.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION/AMERICAN NACIONAL STANDARDS INSTITUTE. **Document no 41 for recommended standard practices for biologic evaluation of dental materials**. Council of Dental Materials and Devices. [Documento n.41], 1979.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard generic biological test methods for materials and devices**. [ASTM Designation] F:748-91, 2006.

BATISTA R.F. et al. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, Ohio, v. 81, no. 1, p. 171-7, Apr., 2007.

* De acordo com a NBR 6023/2002.

BERBERT C.C.V.; CONSOLARO A. Influência de cimentos endodônticos na migração neutrofílica pelo teste de skin window. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, Bauru, v. 2, n. 2, p. 81-7, abr., 1994.

BERBERT, F.L. et al. influence of root canal dressings and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment. [Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.](#), St. Louis, v. 93, no. 2, p.184-9, Feb., 2002.

BRISEÑO, B.M.; WILLERSHAUSEN, B. Root canal sealer cytotoxicity of human gingival fibroblasts: II. Silicone – and resin-based sealers. **J. Endod.**, Baltimore, v. 17, no. 11, p. 537-540, Nov., 1991.

CAMPS, J.; ABOUT, I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. **J. Endod.**, Baltimore, v. 29, no. 9, p. 583-586, Sep., 2003.

CARVALHO-JÚNIOR, J.R. et al. Evaluation of solubility, disintegration, and dimensional alterations of a glass ionomer root canal sealer. **Braz. Dent. J.**, London, v. 14, no. 2, p. 114-118, 2003.

CATANZARO-GUIMARÃES, S.A.; PERCINOTO, C. Effect of some endodontic materials on the influx of macrophages and multinucleated giant cell development in experimental granulomas. **J. Endod.**, Baltimore, v. 10, no. 3, p. 101-4, Mar, 1984.

CAVALCANTI, B.N.; RODE, S.M.; MARQUES, M.M. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 38, no. 8, p.505-509, Aug, 2005.

COBANKARA, F.K. et al. The quantitative evaluation of apical sealing of four endodontic sealers. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, no. 1, p. 66-8, Jan, 2006.

COSTA, C.A.S. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: ESTRELA, C. **Metodologia Científica**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001a. Cap.10, p.162-194.

COSTA, C.A.S.; Testes de citotoxicidade em culturas de células. In: ESTRELA, C. **Metodologia Científica**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001b. Cap.10, p.162-194.

CRAIG, R.G.; POWERS, J.M. **Materiais dentários restauradores**. 11 ed. São Paulo: Livraria Santos Editora Ltda., 2004, 704p.

De DEUS, G. et al. Penetração Intratubular de cimentos endodônticos. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 332-336, oct./dec., 2002.

De DEUS, G. et al. Polymicrobial leakage of four root canal sealers at two different thickness. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, no. 10, p. 998-1001, Oct., 2006.

DORLAND'S Illustrated Medical Dictionary. Disponível em: < www.dorlands.com >. 30th eds. Online version. Acesso em: 21 mar., 2006.

FÉDÉRATION DENTAIRE INTERNATIONALE – Commission of dental materials, Instruments, equipment and therapeutics. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **Int. Dent. J.**, London, v. 30, no. 2, p. 140-88, 1980.

FIGUEIREDO, J. A. P. et al. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 34, no. 5, p. 377-385, Jul., 2001.

GEORGOPOULOU et al. Effect of thickness on the sealing ability of some root canal sealers. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod**, St Louis, v. 80, no. 3, p. 338-44, Sep., 1995.

GOMES, B.P.F.A; et al. In Vitro Evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. **Braz. Dent. J.**, London, v. 15, no. 1, p. 30-35, Jan, 2004.

GÖRDUYSUS, M.O.; ETIKÄN, I.; GÖKÖS, A.; Histopathological evaluation of the tissue reactions to Endo-Fill root canal sealant and filling material in rats. **J. Endod.**, Baltimore, v. 24, no. 3, p. 194-196, Mar, 1998.

GROSSMAN, L.I. An improved root canal cement. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 56, no. 3, p. 381-5, Mar, 1958.

HIRAIISHI, N. et al. Is an oxygen inhibited layer required for bonding of resin-coated gutta-percha to a methacrylate-based root canal sealer? **J. Endod**, Baltimore, v. 32, no. 5, p. 429-33, May, 2006.

HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **J. Endod.**, Baltimore, v. 25, no. 3, p.161-6, Mar, 1999.

HUANG, T. et al. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. **Biomaterials** ,Oxford , v. 23, no. 1, p. 77-83, Jan 2002.

HUNTER, H.A. Effect of gutta-percha, silver points end Richert's root sealer on bone healing. **J. Can. Dent. Assoc.**, Toronto, v. 23, no. 2, p. 385-388, 1957.

INGLE, J.I. et al. Obturation of the radicular space. In: INGLE, J.I.; BARKLAND, L. **Endodontics**. 5ed. Hamilton Ontario: Bc Decker, 2002. p.571.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **Biological Testing of Medical and Dental Materials and Devices**. Geneve, [ISO 10993 Draft], 1991.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. **Dentistry - Preclinical evaluation of medical devices used in dentistry - test methods for dental materials**. Geneve, [ISO 7405 Draft], 1997.

KALLUS, T.; EKLUND, G. Instrumentation for preparation and placement of subcutaneous implants. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v. 17, no. 5, p.735-740, Sep., 1983.

KAPLAN, A.E. et al. Rheological proprieties and biocompatibility of endodontic sealers. **Int. Endod. J.** Oxford, v. 36, no. 8, p. 527-32, Aug, 2003.

KARDON, B.P. et al. An in vitro evaluation of the sealing ability of a new root-canal-obturation system. **J. Endod.**, Baltimore, v. 29, n.10, Oct., 2003.

KAYAOGU, G.; ERTEN, H.; ALAÇAM, D. Short-term antibacterial activity of root canal sealers towards *Enterococcus faecalis*. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 38, no. 7, p.483-488, Jul, 2005.

KOLA, I. Putting the ratio n the map. **Nat. Biotechnol.** , New York, v. 22, no. 5, p.529-531, May, 2004.

KOLOKURIS, I. et al. Experimental study of the biocompatibility of a new glass-ionomer root canal sealer (Ketac –Endo) **J. Endod.**, Baltimore, v. 22, no. 8, p.395-398, Aug, 1996.

KOLOKURIS, I. et al. In vivo comparasion of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. **J. Endod.**, Baltimore, v. 24, no. 2, p. 82-85, Feb, 1998.

KOULAOUZIDOU, E.A. et al. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 14, no. 4, p. 182-5, Aug, 1998.

KOPPER, P.M.P. et al. Comparative *in vivo* analysis of the sealing ability of three endodontic sealers in post-prepared root canals. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 36, no. 12, p.857-863, Dec, 2003.

KUNIE, I.R.C. Granulomas. In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**. 4 ed. São Paulo: Atheneu.2004. Cap.9, p.153-161.

LIGOCKI, A, F. **Avaliação microscópica da reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos frente à implantação de cimento para obturação de canal**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia. Porto Alegre, 1998.

LEAL, J.M. Obturação dos canais radiculares: considerações gerais. In: LEONARDO, M.R; LEAL, J.M. **Endodontia: Tratamento de Canais Radiculares**. 3ed. São Paulo: Panamericana, 1998. Cap.25, p.535-607.

LEONARDO, M.R. et al. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 88, no. 2, p. 221-5, Aug., 1999.

LEONARDO, M.R. et al. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 15, no. 1, p. 28-32, Feb, 1999.

LEONARDO, M.R. et al. Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 17, no. 1, p. 69-74, 2003.

MENDES, S.T.O. et al.. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. **J. Endod.**, Baltimore, v. 29, n. 2, p. 95-99, Feb., 2003.

MENDONÇA, E. F.; ESTRELA, C. Reparo após o Tratamento Endodôntico. In: ESTRELA, C.; FIGUEIREDO, J. A. P. **Endodontia: Princípios Biológicos e Mecânicos**. São Paulo: Editora Artes Médicas, 2001; p. 295-314.

MILLETIC, I. et al. The cytotoxicity of Roekoseal and AH Plus compared during different setting periods. **J. Endod.**, Baltimore, v. 31, no. 4, p. 307-9, Apr., 2005.

MITTAL, M, CHANDRA, S, CHANDRA, S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. **J. Endod.**, Baltimore, v. 21, no. 12, p. 622-624, Dec, 1995.

MOLLOY, E. et al. Comparative tissue tolerance of a new endodontic sealer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v. 73, no. 4, p. 490-3, Apr., 1992.

MONTENEGRO, M.R.; FACCHIO, D. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap.6, p.109-128.

MONTENEGRO, M.R. Inflamação Crônica. In: MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia: Processos Gerais**. 4 ed. São Paulo: Atheneu.2004. Cap.7, p.129-133.

NASSRI, M.R.G.; LIA, R.C.C.; BOMBANA, A.C. Análise da resposta tecidual de dois cimentos endodônticos. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v. 11, no. 1, p.9-14, Jan./Mar., 2003.

NEFF, T.; LAYMAN, D.; JEANSONNE, B.G. In vitro cytotoxicity evaluation of endodontic sealers exposed to heat before assay. **J. Endod.**, Baltimore, v. 28, no. 12, p. 811-14, Dec., 2002.

NGUYEN, T.N. Obturation of the root canal system. In: COHEN, S.; BURNS, R.C. **Pathways of the pulp**. 6 ed. St. Louis: Mostby, 1994. Cap.9, p.219-271.

ORUCOGLU, H.; SENGUN, A. YILMAZ, N. Apical leakage of resin based root canal sealers with a new computerized fluid filtration meter. **J. Endod.**, Baltimore, v. 31, n. 12, p .886-90, Dec., 2005.

ONYCK, J. Methods and criteria in evaluation of periapical tissue response. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 20, no. 3, p. 533-538, Mar, 1970.

PASCON, E.A. et al. Tissue reaction to endodontic materials: methods, criteria, assessment and observations. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 72, no. 2, p. 222-37, Aug., 1991.

PECORA, J. SOUZA-NETO, M.D. Testes físico-químicos de materiais odontológicos. In: ESTRELA, C. **Metodologia Científica**. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001. Cap.12, p.224-247.

PERASSI, F.T. **Resposta tecidual ao cimento endodôntico resinoso EndoREZ e um cimento especial derivado do polímero de mamona comparados ao EndoFill e Sealapex. Estudo morfológico**. 2004. 117f. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

PEREIRA, F.E.L.; BOGLIOLO, L. Inflamações. In: BOGLIOLO et al. **Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. Cap.7, p.111-143.

PERTOT, W.J. et al. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the mandibular bone of rabbits. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St.Louis, v. 73, no. 5, p.613-20, May, 1992.

PHILLIPS, J.M. Rat connective response to hollow polyethylene tube implants. **Can. Dent. Assoc.**, Toronto, v. 33, no. 2, p. 59-64, Feb, 1967.

PODSHADLEY, A.G.; HARRISON, J.D. Rat connective tissue response to pontic materials. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 16, no. 1, p. 110-118, 1966.

RIBEIRO, F.A.Q. et al. Comportamento clínico e histológico da pele do rato submetida ao uso tópico e injetável de Mitomicina C. **Rev. Bras. Otor.**, v. 69, n. 2, p.151-158, mar./abr., 2003.

SALEH, M.; RUYTER, I.E.; HAAPASALO, M.; OSTRAVIK, D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers *in vitro*. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 37, no. 3, p. 193-198, Mar., 2004.

SALLES, A.A. **Influência do tratamento com E.D.T.A no embricamento de dois cimentos resinosos às paredes dos canais radiculares.** 2001, 120f.. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica – Endodontia). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SCHWARZE, T. et al. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. **J .Endod.**, Baltimore, v. 28, no. 11, p. 784-6, Nov., 2002.

SELTZER S. et al. Endodontics failures. A analysis based on clinical roentnographic and histologic findings. **Oral Surg. Oral Méd. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 23, n. 4, p. 517-30, Apr., 1967.

SELTZER, S.; **Endodontology**, Nova Yorque: Mc Graw-Hill Books, 1971, p. 236.

SEMENOFF, T.A.D.V. **Análise comparativa da reação do tecido submucoso de ratos ao implante de hidróxido de cálcio, de clorexidina e da mistura de ambos.** Canoas. 2003.132f. Dissertação (Mestrado-Endodontia) – Curso de Odontologia, Universidade Luterana do Brasil, Canoas.

SHAHI, S. et al. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. **J .Endod.**, Baltimore, v. 32, no. 8, p. 776-80, Aug., 2006.

SIPERT, C.R. et al. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and Endorez. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 38, no. 8, p. 539-543, Aug., 2005.

SIQUEIRA Jr, J.F. Inflamação aguda: resposta vascular e celular. In: SIQUEIRA Jr, J.F. et al. **Bases Moleculares da Inflamação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 6, p.73-82.

SIQUEIRA Jr., J.F. Inflamação aguda: mediadores químicos. In: SIQUEIRA Jr, J.F. et al. **Bases Moleculares da Inflamação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 7, p. 83-103.

SÓ, M.V.R. **Avaliação do pH, liberação de íons cálcio e biocompatibilidade de três pastas à base de hidróxido de cálcio**. 2004. 69f. Tese (Doutorado- Endodontia) - Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara.

SOUSA, C.J.A. et al. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, Endorez and Epiphany root canal sealers. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, no. 7, p. 656-662, Jul., 2006.

TAI, K.; HUANG, F.; CHANG, Y. Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. **J. Endod.**, Baltimore, v. 27, n. 9, p. 571-573, Sep., 2001.

TANOMARU FILHO, M. et al. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 85-9, Mar., 1998.

.TORNECK, C.D. Reaction of a rat connective tissue to polyethylene tube implants. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 21, no. 3, p. 379-387, Mar., 1966.

TRONSTAD, L. **Clinical Endodontics – a textbook**. New York: Thieme Medical Publishers, 1991, p.158-166.

VAN NOORT, R. **Introdução aos materiais dentários**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004, 344p.

VERSAINI, M.A.et al. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 39, no. 6, p. 464-471 ,Jun., 2006.

YALTIRICK A. et al. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. **J. Endod.**, Baltimore, v. 30, n. 2 , p. 95-99, Feb., 2004.

YESILSOY, C. et al. comparative tissue toxicity evaluation of established end newer root canal sealers. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 65, no. 4, p.459-67, Apr., 1988.

YÜCEL, A.Ç. et al. Bacterial penetration after obturation with four different root canal sealers. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, no. 9, p. 890-3, Sep., 2006.

WILLERSHAUSEN, B. et al. Cytotoxicity of root canal filling materials to three different human cell lines. **J. Endod.** , Baltimore, v. 26, no. 12, p. 703-707, Dec., 2000.

WILLIAMS, D. Revisiting the definition of biocompatibility. **Med. Dev. Technol.**, v. 14, no. 8, Oct., 2003.

WOLFAARDT J.F. et al. Biocompatibility testing of a silicone maxillofacial prosthetic elastomer: soft tissue study in primates. **J. Prosthet. Dent.**, v. 68, no. 2, p. 331-8, Aug., 1992.

ZAFALON, E.J. et al. 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.**, St.Louis, v. 103, no. 5, p. 83-94 ,May, 2007.

ZMENER, O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. **J. Endod.**, Baltimore, v. 30, no. 5, p. 348-51, May, 2004.

ZMENER, O.; PAMEIJER, C.H. Clinical and radiographic evaluation of a resin-based root canal sealer. **Am. J. Dent.** , San Antonio, v. 17, no. 1, p. 19-22, Feb., 2004.

ZMENER, O.; BANEGAS, G.; PAMEIJER, C.H. Bone tissue response to a methacrilate-based endodontic sealer: a histological and histometric study. **J. Endod.**, Baltimore, v. 31, no. 6, p. 457-59, July, 2005.

ZMENER, O. PAMEIJER, C.H. Clinical and radiographical evaluation of a resin-based root canal sealer: a 5 year follow-up. **J. Endod.**, Baltimore, v. 33, no. 6, p. 676-9, Jun., 2007.

9. ANEXOS

ANEXO 1

Utilização de Animais em Projetos de Pesquisa

Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA
Resolução Normativa 04/97

A Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde credenciada, junto a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde, como Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), vinculada ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com o objetivo de estabelecer normas para a utilização de animais em projetos de pesquisa submetidos à apreciação desta Comissão, com base nos princípios e normas internacionalmente aceitas, dispõe que:

- a) a utilização de animais em pesquisas científicas deve ocorrer somente após ser provada a sua relevância para o avanço do conhecimento científico, considerando-se a impossibilidade de utilização de métodos alternativos como: modelos matemáticos; simulações computadorizadas; sistemas biológicos “in vitro” ou outro método adequado;
- b) a espécie utilizada e o cálculo do tamanho da amostra devem ser adequados para a obtenção de resultados válidos;
- c) deve ser oferecido alojamento, transporte, alimentação e cuidados adequados à espécie através de assistência qualificada;
- d) procedimentos que possam causar dor ou angústia devem ser desenvolvidos com sedação, analgesia ou anestesia, salvo quando forem os mesmos o objetivo da pesquisa. Devem ser, igualmente, observados cuidados com assepsia e prevenção de infecções, assim como cuidados para minimizar o desconforto e estresse dos animais em estudo;
- e) necessitando de imobilização física e/ou de privação alimentar ou hídrica, os pesquisadores devem procurar manter estas condições pelo menor período de tempo possível, evitando prolongar a angústia, desconforto e dor;
- f) quando for necessário ao estudo, ou após o mesmo, se indicado, que os animais devam ser sacrificados, este procedimento deve ser realizado de forma rápida indolor e irreversível;

g) as técnicas aceitas para o sacrifício de animais são as seguintes: hipoxia por barbitúricos, anestésicos inalatórios, dióxido de carbono e monóxido de carbono (engarrafado), metanesulfonato de triclaína, benzocaína e irradiação por microondas;

h) as técnicas aceitas, de forma condicional, são as seguintes: hipoxia por deslocamento cervical, por nitrogênio ou argônio, decapitação, concussão cerebral e dano medular;

i) não serão aceitas, salvo exceções extremamente justificadas, as seguintes técnicas de sacrifício de animais: sangramento, descompressão, congelamento rápido, embolismo gasoso, afogamento, atordoamento, uso isolado de estriquinina, nicotina, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, agentes curariformes, clorofórmio e cianeto.

Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA. Resolução Normativa 04/97 - Utilização de Recursos Financeiros em Projetos de Pesquisa. Aprovada na reunião conjunta das Comissões Científica e de Pesquisa e Ética em Saúde de 08 de maio de 1997.

Código Estadual de Proteção aos Animais

Lei Estadual Nº 11.915

21 de maio de 2003

Rio Grande do Sul

Institui o Código Estadual de Proteção aos Animais, no âmbito do Estado do Rio Grande do Sul.

TÍTULO II
CAPÍTULO I
Dos Animais de Laboratório

Seção I
Da Vivissecção

Art. 18 - Considera-se vivissecção os experimentos realizados com animais vivos em centros de pesquisas.

Art. 19 - Os centros de pesquisas deverão ser devidamente registrados no órgão competente e supervisionados por profissionais de nível superior, nas áreas afins.

Art. 20 - É proibida a prática de vivissecção sem uso de anestésico, bem como a sua realização em estabelecimentos escolares de ensino fundamental e médio.

Parágrafo único - Os relaxantes musculares parciais ou totais não serão considerados anestésicos.

Art. 21 - Com relação ao experimento de vivissecção é proibido:

I - realizar experiências com fins comerciais, de propaganda armamentista e outros que não sejam de cunho científico humanitário;

II - utilizar animal já submetido a outro experimento ou realizar experiência prolongada com o mesmo animal.

Art. 22 - Nos locais onde está autorizada a vivisseccão, deverá constituir-se uma comissão de ética, composta por, no mínimo, 03 (três) membros, sendo:

I - um (01) representante da entidade autorizada;

II - um (01) veterinário ou responsável;

III - um (01) representante da sociedade protetora de animais.

Art. 23 - Compete à comissão de ética fiscalizar:

I- a habilitação e a capacidade do pessoal encarregado de prestar assistência aos animais;

II - verificar se estão sendo adotados os procedimentos para prevenir dor e o sofrimento do animal, tais como aplicação de anestésico ou analgésico;

III - denunciar ao órgão competente qualquer desobediência a esta Lei.

Art. 24 - Todos os centros de pesquisas deverão possuir os recursos humanos e materiais necessários a fim de zelar pela saúde e bem-estar dos animais.

Seção	Disposições	II
Das		Finais

Art. 25 - As penalidades e multas referentes às infrações definidas nesta Lei serão estabelecidas pelo Poder Executivo, em espécie.

Art. 26 - O Poder Executivo definirá o órgão estadual encarregado de fiscalizar o cumprimento das disposições desta Lei.

Art. 27 - O Poder Executivo regulamentará esta Lei no prazo de 30 (trinta) dias da data de sua publicação.

Art. 28 - Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art. 29 - Revogam-se as disposições em contrário.

PALÁCIO PIRATINI, em Porto Alegre, 21 de maio de 2003.

ANEXO 3: Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

 **UFRGS**
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1936  1996
Faculdade de Odontologia

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

RESOLUÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa e a Comissão de Pesquisas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisaram o Projeto:

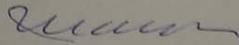
Número: 10/06

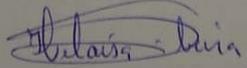
TÍTULO: ANÁLISE COMPARATIVA "IN VIVO" DA BIOCMPATIBILIDADE DE UM CIMENTO A BASE DE RESINA METACRILATO COM DOIS OUTROS CIMENTOS ENDODÔNTICOS

Investigador(es) principal(ais): Professora Elaine V. F. Fachin e C.D. Roberta K. Scarparo

O Projeto foi aprovado na reunião do dia 18/04/06, Ata nº 04/06 do Comitê de Ética em Pesquisa e da Comissão de Pesquisas, da UFRGS, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com as normas de utilização de animais em projetos de pesquisa, conforme a Resolução 04/97, da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 19 de abril de 2006.


Prof. Marisa Maltz
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa


Prof. Heloísa Emília Dias da Silveira
Coordenadora da Comissão de Pesquisas

10. APÊNDICES

APÊNDICE 1

Resultados dos valores de Kappa para a Análise “Inter-examinador”

Célula	Valor Kappa	P
Condensação Fibrosa	80,4%	0,01
Neutrófilos	61,5%	0,03
Eosinófilos	99,0%	0,01
Linfócitos/ Plasmócitos	85,3%	0,01
Células Gigantes	60,0%	0,04
Macrófagos	100%	0,01
Abscesso	78,7%	0,01

APÊNDICE 2

Resultados dos valores de Kappa para a análise “intra-examinador”

Célula	Valor Kappa	P
Condensação Fibrosa	80,4%	0,01
Neutrófilos	100%	0,01
Eosinófilos	99,0%	0,01
Linfócitos/ Plasmócitos	85,3%	0,01
Células Gigantes	78,3%	0,01
Macrófagos	84,8%	0,01
Abscesso	80,4%	0,01