

UNIVERSIDADE POSITIVO
MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA CLÍNICA

ESTUDO COMPARATIVO DE QUATRO DIFERENTES CIMENTOS
ENDODÔNTICOS ATRAVÉS DA ANÁLISE HISTOLÓGICA E
IMUNOISTOQUÍMICA

PAOLA CRISTINE VALENÇA

CURITIBA

2009

UNIVERSIDADE POSITIVO
MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA CLÍNICA

ESTUDO COMPARATIVO DE QUATRO DIFERENTES CIMENTOS
ENDODÔNTICOS ATRAVÉS DA ANÁLISE HISTOLOGICA E
IMUNOISTOQUÍMICA

PAOLA CRISTINE VALENÇA

Dissertação apresentada à Universidade Positivo
como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Odontologia, pelo programa de
Mestrado Profissional em Odontologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Flares Baratto Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Allan Fernando Giovanini

CURITIBA

2009

Dados Internacionais de catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da Universidade Positivo- Curitiba – PR

V152 Valença, Paola Cristine.

Estudo comparativo de quatro diferentes cimentos endodônticos através da análise histológica e imunoistoquímica / Paola Cristine Valença. — Curitiba : Universidade Positivo, 2009.

81 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Positivo, 2009.
Orientador : Prof. Dr. Flares Baratto Filho.

1. Cimentos dentários. I. Título.

CDU

616.314-74

Programa de Mestrado Profissional em Odontologia Clínica

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de novembro de 2009, considerou a candidata **PAOLA CRISTINE VALENÇA** aprovada.



PROF. DR. FLARES BARATTO FILHO



PROF. DR. LUIZ FERNANDO FARINIUK



PROF.ª DR.ª DENISE PIOTTO LEONARDI

DEDICATÓRIA

Ao meu filho *Rafael Valença Razente*, pelo extremo amor, carinho e compreensão.

Aos meus pais *Sirlei Valença e Edson Valença*, pelo carinho, amizade, dedicação e principalmente exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Flares Baratto Filho, pela orientação concedida durante o curso.

Ao Professor Dr. Allan Fernando Giovanini, pela compreensão, paciência e muito estímulo dado a cada dia do curso, pela ajuda na análise dos resultados, pelas revisões concedidas durante este tempo de muito estudo e trabalho.

A Professora Dra. Denise Piotto Leonardi, pela orientação nos projetos e muita compreensão concedida neste tempo.

A Querida Amiga e Professora Gisele Aihara Haragushiku, pela ajuda no experimento, pelas tardes de conversas e estudos, o meu muito obrigado, sem sua ajuda seria tudo muito mais difícil.

A Dedicada e Amiga Professora Flávia Sens Fagundes Tomazinho, pelo companheirismo e paciência na clinica durante a monitoria, pela ajuda durante o curso e pelo exemplo de força, coragem e muita amizade.

A Prof. Dra. Carla C. Gonzaga pelas tardes de ensinamentos, apoio, carinho, incentivo e principalmente exemplo de vida e profissionalismo.

Aos Professores do Mestrado em Odontologia Clinica da Universidade Positivo pelas experiências profissionais e clínicas que demonstraram ao logo do curso.

Aos funcionários do Biotério da Universidade Positivo pela colaboração durante a pesquisa.

As minhas avós Divahir Fiala e Luci Valença pela força durante este curso.

Aos meus primos André E. Sutil, Carlos E. Sutil e Caroline G. Sutil pela paciência e compreensão nos momentos que não estive presente.

As minhas amigas que muitas vezes durante este tempo ficaram chateadas pela minha ausência, Juliana Zanini e Joana Ruas.

Aos meus grandes amigos que me deram o maior apoio para a realização deste curso e entenderam que muitas vezes fiquei ausente para a realização deste grande sonho, Aline Lourensetti, Patricia Simioni, Angela Poletto, Michelle Martins.

A uma pessoa muito importante que sempre me apoiou e me incentivou em todas as minhas escolhas, Jackson Razente.

Ao meu grande companheiro de trabalho e de muita amizade, Rodrigo Gomes, que me incentivou a participar deste curso.

Ao meu Querido Amigo Roberto Nanami pelo carinho e muita colaboração para a realização deste sonho.

Aos colegas de Mestrado que participaram juntamente comigo das horas de estudo, horas de pesquisa, horas de festas e horas de bronca, Diogo Zanicotti, Joelson Egidio, Wilson Buffara, Altair Locatelli, Fabiana Coneglian Machado, Simone Thá Rocha, Fernanda Matsubara, Ulisses de Almeida, Roberto Nanami, Rodrigo Gomes, Tatiana Bindo, Felipe Richuv, Antonio Trevisani, Eduardo Morais, Rogerio Goulart e Cecim Calixto Jr., o meu Muito Obrigada.

Valença, PC. Estudo comparativo de quatro diferentes cimentos endodônticos através da análise histológica e imunoistoquímica [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Positivo; 2009.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos em tecidos subcutâneos de ratos, analisando o grau de citotoxicidade induzida por 4 diferentes cimentos endodônticos, através da análise histopatológica, histomorfométrica e imunoistoquímica. Para este estudo 18 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) foram utilizados, sendo divididos nos seguintes grupos: grupo I – Endofil, grupo II - AH Plus , grupo III - Acroseal , grupo IV - Epiphany , grupo V – Controle. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados para a inserção do tubo de polietileno e em seguida foi feita a implantação de 4 tubos em cada animal, sendo, 2 na região escapular e 2 na região pélvica. Para o grupo controle três animais foram utilizados, recebendo 2 tubos de polietileno com ausência de material. Os animais foram eutanasiados após 7, 21 e 45 dias pós-cirúrgico. Os resultados deste trabalho revelaram que o Grupo II foi o que apresentou resultados com uma menor reação em relação à presença de inflamação crônica e o mais rápido encapsulamento do tubo de polietileno com as fibras colágenas, sendo considerado de maior biocompatibilidade em relação aos outros grupos. De maneira antagônica, o grupo IV foi o que apresentou a mais severa reação, demonstrando a presença de cápsula fibrosa somente em 45 dias. Conclui-se que o cimento Ah Plus, foi considerado o mais biocompatível, e o cimento Epiphany o de menor biocompatibilidade, devido uma persistente inflamação e um tardio encapsulamento do tubo.

Palavra Chave: Biocompatibilidade; Cimentos endodônticos; Miofibroblastos;

Valença, PC. Estudo comparativo de quatro diferentes cimentos endodônticos através da análise histológica e imunoistoquímica [Dissertação de Mestrado]. Curitiba: Universidade Positivo; 2009.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of endodontic sealers in subcutaneous tissue of rats, analyzing the cytotoxicity degree induced by four endodontic sealers – group I – Endofil, group II - AH Plus, group III – Acroseal, group IV – Ephiphany and group V – Controle, by means of histopathological analysis, histomorphometry and immunohistochemistry. Eighteen Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were used. In each animal, an incision was made and a polyethylene tube was inserted in the connective tissue. Four tubes were implanted in each animal, two in the scapular region and two in the pelvic region. Three animals were used in the control group and received two empty polyethylene tubes. The animals were euthanized after 7, 21 and 45 days post-surgery. Group II presented more favorable results regarding the presence of chronic inflammation and revealed the faster collagen fiber capsule development surrounding the polyethylene tube. Thus, group II was considered the most biocompatible. Conversely, group IV presented the most severe reaction, demonstrating the presence of fibrous capsule after 45 days. It is concluded that the sealer Ah Plus, was considered the most biocompatible, and Epiphany the lowest biocompatibility because of a persistent inflammation and a delayed encapsulation of the tube.

Key Words: Biocompatibility, endodontics sealers, Myofibroblasts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Resposta imune em teste de biocompatibilidade.....	4
2.1.1. <i>Fase vascular e inflamatório.....</i>	<i>5</i>
2.1.1. <i>Formação do tecido de granulação.....</i>	<i>6</i>
Angiogênese.....	7
Formação da matriz e fibroplasia.....	7
Contração da área afetada.....	7
Remodelação de matriz e colágeno.....	8
2.2 Miofibroblastos.....	8
2.3 Persistência a ação patógena.....	11
2.4 Cimentos endodônticos e biocompatibilidade.....	11
2.4.1 <i>Endofil – Cimento a Base de Óxido de Zinco Eugenol.....</i>	<i>12</i>
2.4.2 <i>AH Plus – Cimento a base de resina epóxica.....</i>	<i>14</i>
2.4.3 <i>Acroseal – Cimento a base de hidróxido de cálcio.....</i>	<i>16</i>
2.4.4 <i>Epiphany – Cimento a base de resina metacrilato.....</i>	<i>17</i>
3 PROPOSIÇÃO.....	19
4 MATERIAL E MÉTODO.....	20
5 RESULTADOS.....	35
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÃO.....	72
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	73

1. INTRODUÇÃO

Todas as fases do tratamento endodôntico (diagnóstico, abertura coronária, preparo biomecânico e obturação) são interdependentes, ou seja, a falha em qualquer uma delas pode levar ao insucesso da terapia. O canal radicular já obturado expressa a qualidade das fases de abertura e preparo endodôntico, desta forma, uma obturação inadequada pode refletir um acesso ao canal e instrumentação insuficientes.

No entanto, não apenas radiograficamente a obturação deve ser analisada a fim de considerar a possibilidade do sucesso terapêutico, uma vez que os materiais obturadores empregados não devem ser irritantes a ponto de liberar componentes bioativos capazes de alterar o comportamento histofisiológico habitual dos tecidos periapicais (Schilder, 1967; Schilder, 1974). É importante ressaltar que o maior contato entre o material obturador e os tecidos periapicais ocorre via forame apical, assim, quanto mais biocompatível for o material colocado no interior do canal radicular, menor será a interferência na reação tecidual da região periapical.

A obturação do canal radicular é, comumente, realizada empregando-se cones de guta-percha e cimento endodôntico, tendo o cimento a função principal de vedar o canal radicular preenchendo os espaços existentes entre os cones e entre estes e as paredes dentinárias. Estes espaços, se permanecerem, poderão comprometer os resultados do tratamento endodôntico, principalmente em casos de dentes com lesão periapical, pois poderá haver drenagem de exsudato inflamatório para o interior da região onde o selamento apresenta-se de forma

deficiente, comprometendo a integridade periodontal. É válido destacar que a importância do cimento vai além da sua capacidade de selar a interface guta-percha/guta-percha e guta-percha/dentina. Para aumentar as chances de sucesso terapêutico, o cimento endodôntico deve apresentar, além de boas propriedades físico-químicas (ex.: capacidade de selamento), boas propriedades biológicas a fim de evitar injúrias irreversíveis aos tecidos periapicais (Tronstad et al., 1981; Mazinis et al.; 2007).

A literatura científica enfatiza a importância do tipo de resposta biológica desencadeada pelos cimentos endodônticos diante de tecido conjuntivo denso fibroso, já que a melhor condição tecidual é aquela representada por um selamento biológico ocorrido mesmo após o contato íntimo entre o cimento e os tecidos periapicais (Holland et al. 1985; Leonardo et al.; 1991).

No mercado odontológico, encontram-se cimentos endodônticos com diferentes composições como, por exemplo, os cimentos à base de Óxido de Zinco e Eugenol, cimentos à base de resina epóxi-amina, cimentos à base de hidróxido de cálcio, entre outros. Essas variações na composição dos cimentos ocorrem com o objetivo melhorar suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Diferentes testes podem ser empregados para verificar a resposta biológica aos cimentos endodônticos. Segundo a *International Standard Organization* (ISO10993 – 1991 e ISO7405- 1997), a análise da citotoxicidade dos materiais odontológicos é regulamentada por testes iniciais *in vitro*, testes secundários *in vivo* e, de acordo com os resultados obtidos, o material estudado poderá ou não ser empregado clinicamente.

Um teste secundário amplamente utilizado é o que preconiza o implante de tubos de polietileno, contendo o material a ser avaliado em seu interior, em tecido conjuntivo subcutâneo de cobaias, mimetizando possíveis reações que ocorrem na intimidade periapical. Apesar deste tecido subcutâneo não ser considerado réplica dos tecidos periapicais, dadas as características peculiares desta região, este teste permite estabelecer uma excelente avaliação tecidual dos materiais indicados para a prática odontológica (Birman e Magalhães, 1984).

Diante do exposto, justifica-se a realização do presente estudo devido à contínua modificação existente na composição dos cimentos endodônticos a fim de aprimorá-los para serem empregados clinicamente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Resposta Imune em teste de biocompatibilidade

A definição do que é biocompatibilidade é controversa. A ASTM (2006) (*American Society for Testing and Materials*), por exemplo, define a biocompatibilidade como uma avaliação da resposta produzida pelo íntimo contato entre o material a ser testado e os tecidos vivos, em comparação a um grupo controle. Contudo, essa definição é ampla e imprecisa, suprimindo gradação concisa para se estabelecer possíveis efeitos benéficos ou mesmo uma gradação de viabilidade onde se insere determinado biomaterial. Assim sendo, diversos autores sugerem que, no âmbito das ciências da saúde, o efeito citotóxico ou a propriedade de biocompatibilidade de um material designa-se pela capacidade de produzir uma resposta imune, mas exibindo menor dano possível quando em contato com tecidos vivos (Silva *et al.*, 2008).

A aplicação direta de substâncias quimicamente reativa como o cimento endodôntico, em regiões subcutâneas, resultam em uma sensibilização local e sistêmica a vários metabólitos do composto agressor. Este fato provoca uma reação por sensibilidade de contato, que culmina em uma resposta celular tardia (hipersensibilidade tipo IV) que é desencadeada por linfócitos T sensibilizados especificamente, células T CD4 ou diretamente mediada por células T CD8 (Stites, 1997).

Deve-se ressaltar que as células T, só detectam compostos estranhos em contextos específicos. Usualmente, para que a sensibilização dos linfócitos T ocorram, o componente estranho agressor deve ser clivado em pequenos peptídeos compatíveis ao

reconhecimento de uma segunda célula do hospedeiro, que é denominada célula apresentadora de antígeno. Essas células são constituídas por proteínas citoplasmáticas específicas conhecida como proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Entre o componente celular que possui potencial de apresentar antígenos, destacam-se: Célula de Langerhans, macrófagos e linfócitos B (Ignatowicz *et al.*, 1996, Wucherpfennig e Strominger, 1995; Stites, 1997).

Em seu aspecto histomorfológico, a hipersensibilidade tardia caracteriza-se pelo acúmulo de células mononucleares em regiões periféricas a vênulas e veias, causando um mecanismo similar a outras formas de inflamação crônica, ou seja rica em componentes linfo-plasmocitário. Geralmente este infiltrado celular surge em 24 a 48 horas após o contato intradérmico de um determinado antígeno, contudo, dependendo da ação patogênica de um biomaterial, pode demonstrar uma hipersensibilidade imediata, dentro de 15 a 20 minutos (reação inflamatória aguda), sendo suprida, posteriormente, pela cronificação após 5 a 8 horas seguindo-se o processo de reparo (Cotran *et al.*, 2000).

Assim sendo, o processo cicatricial ou de reparo tecidual pode ser definido como um complexo de interação de uma série de fenômenos, desde a implantação do material exógeno, até o momento que culmina na reconstituição da força elástica do tecido e conseqüentemente a restituição de sua homeostase e morfostase. Contudo, para o contexto citotóxico, fenômenos irritativos tais como modificações vasculares, inflamatório à constituição de tecido de granulação e reparo tissular são fatores fundamentais de análise (Desmouliere *et al.*, 2005)

2.1.1 Fase vascular e inflamatória;

Os fenômenos celulares da inflamação envolvem o acionamento das vias que desencadeiam a hipersensibilidade do tipo IV (tardio), com capacidade de apresentação de antígeno via MHC, e proporcionando ao conteúdo celular inflamatório capacidade de movimentação, de adesão e de até englobamento de partículas (Cotran *et al.*, 2000).

Esse fenômeno ocorre durante a apresentação de antígeno, que além de induzir a sensibilidade das células T, são responsáveis por induzir degranulação de mastócitos, que liberam compostos amino-vaso ativos, como histamina e serotonina, que possui função de retração endotelial, favorecendo a uma isquemia seguido por uma persistente vasodilatação e hiperemia. Esse fenômeno contribui para a adesão, diapedese e migração do conteúdo celular inflamatório, ao locus da região agredida (Kumar *et al.*, 2007).

A variação qualitativa e quantitativa dos diferentes elementos celulares presentes no foco inflamatório local, podem caracterizar, entre outras classificações, uma inflamação aguda ou crônica que posteriormente são substituídas por um tecido de granulação (Kumar *et al.*, 2007).

2.1.2. Formação do tecido de granulação

A formação do tecido de granulação consiste em um estágio de reestruturação tecidual após ação fagocitária, onde células inflamatórias crônicas (linfócitos e plasmócitos), fibroblastos, uma nova matriz extracelular vascularizada representada principalmente por colágeno são os constituintes de maior representação. Constitui o novo tecido que se desenvolve para preencher área de tecido fagocitado (Magino, 1998). Diversas etapas constitui o tecido de granulação.

Angiogênese

O conteúdo mononuclear inflamatório promove síntese de uma série de fatores de crescimento que são responsáveis pela diferenciação e maturação de inúmeras células que povoaram o tecido de granulação. Entre os fatores de crescimento, destaca-se fator de crescimento vascular e endotelial, (VEGF) que é considerado um dos principais fatores de crescimento envolvidos na regulação da angiogênese criando o suprimento sanguíneo requerido para formação e nutrição do tecido de granulação. Em células indiferenciadas um receptor, denominado de angiopoetina é ativado e coopera com VEGF durante a angiogênese. Este fator é um mitógeno potente e é seletivo para as células endoteliais constituírem a microarquitetura vascular neste novo tecido. (Jobin *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007).

Formação da matriz e fibroplasia;

A medida que conteúdo celular vai se diferenciando no tecido de granulação, a matriz extracelular também vai se tornando mais densa com o passar dos dias, adquirindo cada vez mais fibras colágenas. Estas fibras formam, a princípio, um padrão frouxo, mas pouco a pouco se dispõem em feixes paralelos, compactos, enquanto os vasos sanguíneos vão se tornando menos proeminentes podendo até desaparecer. Assim, o tecido de granulação acaba dando lugar a uma cicatriz fibrosa, dura, esbranquiçada e com tendência a retração para minimizar o tecido de granulação (Bernacchio, 2007).

Contração da área afetada;

Esta contração da área neoformada é definida como um movimento centrípeto das bordas colágenas de espessura grosseira a fim de facilitar o fechamento do defeito. A contração ocorre, em média, após 15 dias da injúria tecidual e é realizada por células de capacidade contráctil (miofibroblastos) e por suas conexões com a matriz especializada circunvizinha (Junqueira e Carneiro, 2004; Alberts *et al.*, 1989).

Remodelação de matriz e colágeno;

Os eventos na remodelação são responsáveis pelo aumento na força elástica, diminuição do eritema e volume do tecido, e a aparência final do tecido cicatrizado. O fibroblasto é a célula mais importante atrás da síntese do colágeno (Wong *et al.*, 1996). No entanto há eventos chaves no desenvolvimento do tecido de granulação, e que participam ativamente na contração da área afetada, na angiogênese e na remodelação da matriz de colágeno. Dentre esses eventos destaca-se a diferenciação e participação dos miofibroblastos (Kilarski *et al.*, 2005).

2.2. Miofibroblastos

Os miofibroblastos representam o fator chave na reconstrução fisiológica do tecido conjuntivo após uma injúria (Gabbiani *et al.*, 2003; Desmouliere *et al.*, 2004).

O desencadeamento do processo cicatricial depende da capacidade do tecido conjuntivo de se regenerar promovendo proliferação celular, que reconstitui o estroma do colágeno extracelular, importante para o desenvolvimento do tecido de granulação e consequente desenvolvimento homeostático da área agredida (Gabbiani *et al.*, 2003; Desmouliere *et al.*, 2004).

Após uma lesão tecidual, e início do processo inflamatório, ocorrem modificações vasculares que culminam em hemorragias e exsudato fibrinoso. Durante esta fase, ocorre o fenômeno de degranulação plaquetária, e consequente atração de células inflamatórias, particularmente monócitos e granulócitos por meio de quimiotaxia. Este conteúdo celular inflamatório é responsável por induzir a síntese de inúmeros fatores de crescimento, que estimulam diretamente o processo de reparo. Neste momento, a área agredida é composta por matriz extracelular provisória, que consiste em grande parte de fibrina. Esta matriz provisória permite a migração de células pré fibroblásticas que realizam o processo de reparação por fibrogênese e angiogênese (Phan, 2008).

Na matriz colagenosa, citocinas e fatores de crescimento incluindo TGF β -1 e PDGF, estimulam pré fibroblastos e/ou pericitos (células contráteis que delineiam vênulas e arteríolas) a alterarem seu fenótipo. Assim sendo, para que ocorra a atividade migratória para povoar tecidos danificados, há a necessidade desse novo fenótipo, por meio do desenvolvimento de feixes contráteis expressando uma proteína citoplasmática denominada de actina de músculo liso, cujo nome do conteúdo celular torna-se miofibroblasto (Hinz *et al.*, 2001).

Desmoulière (1993, 1995), e Gabianni (2004) relatam que o fator de crescimento TGF β é o principal fator de crescimento da indução de fenótipos de actina de músculo liso e consequentemente indutor da diferenciação de pericitos e fibroblastos em miofibroblastos. A diferenciação em miofibroblastos torna o este conteúdo celular, em seu aspecto ultraestrutural: (1) com um retículo endoplasmático granular, e aparelhos de Golgi bem desenvolvidos, conferindo a célula intenso poder de síntese, especialmente de proteínas da matriz extracelular; (2) vesículas de pinocitose, (3) junções do tipo “gap”, e (4) disposição de feixes de miofilamentos de actina localizados ao longo da

célula (fibras de estresse) ou ligando a domínios de matriz extracelular por meio de proteínas especializadas de membrana denominada de integrina. (Schurch *et al.*, 1998; Eyden, 1993).

Uma vez que esses miofibroblastos contêm feixes de microfilamentos de actina com mecanismo semelhante, mas não idênticos aos que ocorrem em células de musculatura lisa, desempenham um papel na contração e redução do tamanho da região injuriada (Grinnell, 1994, 2000). Para tal função, esses miofibroblastos produzem colágenos tipo I, III, V e fibronectina e se interligam as proteínas da matriz extracelular por uma estrutura denominada *fibronexus*, que consiste em um complexo tridimensional composto por uma área transmembrânica e área intracelular formando um complexo que apresenta continuidade e forte interação covalente entre as fibras da matriz extracelular e miofibroblasto (Eyden, 1993; Singer et al., 1984) e outra interação entre miofibroblasto-miofibroblasto por meio de junções *gap*. A estrutura do *fibronexu* e a interação entre células formam um composto organizado e entrelaçado de modo que quando ocorra a contração dos filamentos de actina dos miofibroblastos todo componente se retraia promovendo a remodelação da matriz extracelular e desta forma regressão do tecido de granulação. Assim, em condições fisiológicas, como a remodelação durante a cicatrização cutânea onde não ocorreu intensa perda epitelial, a atividade contrátil de miofibroblastos é a porção finalizadora do processo cicatricial, onde após este fenômeno, a expressão da actina de músculo liso diminui e os miofibroblastos desaparecem por sofrer apoptose.

Com a apoptose dos miofibroblastos, há síntese de metaloproteinases e colagenases, que são responsáveis pela degeneração do complexo fibroso restante e consequente indutor da neoformação de colágeno frouxo do tecido conjuntivo sadio, finalizando o quadro reparativo.

2.3 Persistência e ação patógena

Em ocasiões de intensa citotoxicidade, mediante a patógenos de alto peso molecular, ou mesmo de ação persistente e não degradável, o infiltrado inicial e o desencadeamento da atividade inflamação/reparo podem se modificar.

Duas possibilidades são comumente desencadeadas. A primeira ocorre diante da modificação do componente celular, onde a infiltração de linfócitos é substituída por macrófagos e células gigantes tipo corpo estranho, desencadeando um padrão de hipersensibilidade do tipo IV granulomatosa (Cotran *et al.*, 2000). A segunda possibilidade ocorre frente a um composto de intensa citotoxicidade genotípica onde o excesso de anticorpos produz complexos antígeno-anticorpos intravasculares, que se ligam ao complemento, causando aglutinação celular, dano endotelial e necrose vascular fruto do desencadeando uma reação humoral III, denominada reação de Arthus.

2.4 Cimentos Endodônticos e biocompatibilidade

Estudos experimentais em tecido subcutâneos de ratos têm sido realizado para avaliação de materiais utilizados em odontologia, especialmente quanto à biocompatibilidade (Orstavik e Mijor., 1988; Mittal *et al.*, 1995; Leonardo *et al.*, 2000; Gomes-filho, 2001;)

A compatibilidade biológica dos cimentos endodônticos é de grande importância devido ao contato direto com os tecidos periapicais. A resposta tecidual dos diversos cimentos influenciam no sucesso final do tratamento radicular (Waltimo *et al.*, 2001). Assim sendo, qualquer cimento não deve impedir o reparo tecidual, além do mais,

devem estimular a reorganização das estruturas periapicais injuriadas. Contudo, nem sempre esses efeitos acontecem. Estudos prévios mostram que a biocompatibilidade de diferentes classes e produtos dos cimentos endodônticos variam consideravelmente (Huang *et al.*, 2002a; Zmener, 2004).

Segundo Nassri *et al.*, (2003), a importância em se conhecer a compatibilidade biológica dos cimentos endodônticos, deve-se ao fato de que se esses cimentos forem demasiadamente irritantes aos tecidos periapicais, causarão inflamação de maior intensidade e podem até promover necrose extensa na área, corroborando com insucesso do tratamento endodôntico, e ainda como consequência, a capacidade de reparação da região periapical sofrerá interferências significativas.

2.4. 1 Cimento a Base de Óxido de Zinco Eugenol

Os cimentos a base de óxido de zinco eugenol foram introduzidos por Grossman em 1958, sofrendo alterações na sua formulação original, gradualmente, conforme a necessidade de uso devido ação tóxica e/ou radiopacidade. Embora a descoberta de outros materiais de cimentação endodôntica vieram a tona nesse período, o cimento de óxido de zinco e eugenol continua sendo bastante comercializado, devido seu baixo custo, fácil manipulação e boa radiopacidade (Tronstad *et al.*, 1981).

Em meados de 1971, Holland *et al.*, avaliaram possíveis reações em tecido subcutâneo de ratos induzidos por cimento de óxido de zinco e eugenol, pasta de Rickert, e o comparou a outros materiais. Neste estudo, o cimento de óxido de zinco foi o que apresentou maior resposta inflamatória, demonstrando assim, potencialização citotóxica dos componentes eugenol e zinco. Dois anos mais tarde, Holland *et al.*, (1973) reavaliou a resposta inflamatória dos cimentos de óxido de zinco e eugenol

utilizando modelo similar ao anterior, porém, neste novo estudo, diferentes consistências do cimento foram posto a prova. Os autores concluíram que em todos os casos ocorreram resposta citotóxica exuberante, porém havia direta proporcionalidade entre toxicidade e fluidez.

Corroborando com os testes realizados por Holland *et al.* (1971,1973), Benati-Neto *et al.*, (1986), avaliaram a reação tecidual em cães induzidos por cimento a base de oxido de zinco e eugenol puro, Fill Canal, Endomethasone e AH 26. O cimento AH 26 e o oxido de zinco e eugenol puro apresentaram um comportamento biológico favorável à remodelação, sendo que, o Fill canal, que é o cimento de maior similaridade ao Endofil, foi o que apresentou maior resposta inflamatória crônica.

Hipotetizando que a ação de injúria tecidual se refere ao efeito provocado pelo componente eugenol, Crane et al. (1980) avaliou o efeito da biocompatibilidade dos cimentos a base de óxido de zinco eugenol sem a presença do referido componente na manipulação do cimento, e o composto restante foi implantado em subcutâneo de rato. O autor verificou uma resposta inflamatória de menor intensidade quando comparado ao cimento associado ao eugenol.

A compatibilidade biológica do cimento Endofil foi comparada a cimentos Grossman e a um cimento a base de hidróxido de cálcio (Sealapex). O resultado demonstrou similaridades entre Endofil e o Sealapex, apresentando uma discreta resposta inflamatória quando comparado ao cimento de Grosman. (Yesilsoy *et al.*, 1988).

Scarparo et al., (2009), avaliaram a biocompatibilidade do Endofil, AH Plus e o Endorez. O cimento a base de oxido de zinco e eugenol (Endofil), e a base de resina metacrilato (Endorez), foram os que apresentaram aparentemente um maior potencial para a irritação dos tecidos, devido os resultados que mostraram maior número de

neutrófilos, células desencadeadoras da inflamação aguda, associado a um infiltrado linfoplasmocitário. Conclui-se então que estes cimentos desencadearam efeito tóxico persistente e duradouro, inclusive, promovendo reagudização de um processo crônico. Diferente dos demais, o cimento AH Plus exibiu infiltrado inflamatório crônico, sem efeito granulomatoso, tal qual foi encontrado no grupo controle. Além do mais, o Endofill revelou menor processo de condensação fibrosa após o período de 7 dias.

Segundo Pitt-Ford. (1985) os cimentos a base de óxido de zinco e eugenol apresentam citotoxicidade devido eugenol livre ou ions de zinco que não reagiram com a mistura do óxido de zinco e eugenol, por isso quanto mais homogênea a mistura melhor.

2.4.2 Cimentos a base de resina epóxica

Estes cimentos surgiram como alternativa aos cimentos já existentes no mercado e ganharam espaço no mercado devido as suas ótimas características de adesão as estruturas dentinárias, longo tempo de trabalho, facilidade de manipulação e bom escoamento (Leal et al.,1988).

Inicialmente, o cimento AH26 foi criado em 1957 e sua formulação deu origem a outros cimentos a base de resina epóxica como, por exemplo, o cimento AH Plus (Salles, 2001).

Este cimento é considerado uma mistura de epoxi-aminas, que resulta no desenvolvimento de produtos e é frequentemente utilizado como um material de controle em matéria de investigação (Ørstavik 2005)

A proporção deste cimento recomendada é de 1:1, em volume, tendo um tempo de trabalho de aproximadamente 4 horas a 23°C e o endurecimento se perfaz totalmente em 8 horas a 37°C segundo o fabricante.

Frente aos pontos positivos do AH Plus, são descritas propriedades de boa capacidade seladora apical e excelente comportamento biológico, permitindo que ocorra selamento do forame pela deposição de um tecido cementóide (Almeida, 1997). Neste trabalho o AH Plus foi avaliado em cães com polpa vital, sendo obturados por meio da técnica de condensação lateral ativa. Os resultados foram avaliados após 90 dias pós operatório, utilizando análise histológica. A micrografia do tecido induzido pelo AH Plus demonstrou ótima deposição de tecido mineralizado em região apical e reparo apical e periapical adequados, condizente com uma ação biocompatível do material.

Leonardo *et al.*, (1999b), avaliaram a biocompatibilidade do AH Plus por meio da quantificação de células inflamatória e área de necrose utilizando dentes exibindo polpa vitais (Pré molares de cães). Na análise histológica foi verificada presença de um infiltrado inflamatório discreto e ausência de áreas de necrose, além disso, o cimento induziu a formação de tecido mineralizado em região apical.

O efeito citotóxico do AH Plus foi analisado junto a dois outros cimentos (AH 26 e o óxido de zinco e eugenol), em estudo *in vitro* de fibroblastos humanos. O cimento de óxido de zinco e eugenol foi o que apresentou maior toxicidade em dois processos analisados: injúria celular e tempo de injúria. (Azar *et al.*, 2000).

Embora haja divergências sobre à biocompatibilidade do cimento AH Plus (Huang *et al.*, 2002b), a grande maioria dos trabalhos afirmam que os efeitos citotóxicos do Ah Plus são bastante reduzidos (Koulaouzidou *et al.*, 1998; Tai *et al.*, 2001; Miletic *et al.*, 2000, 2005; Schweikl *et al.*, 1998). Esses resultados satisfatórios parecem ser constantes tanto em análise em testes secundários intra-ósseo de ratos, como descrito

por Souza *et al.*, (2006), como em testes de aplicação clínica (Tanomaru filho *et al.*, 1998; Leonardo *et al.*, 2003). Esses efeitos benéficos são traduzidos pelo curto período de indução citotóxica, que desaparece rapidamente devido a liberação de formaldeído (Leonardo *et al.*, 1999b, Merdad *et al.*, 2007).

2.4.3 Cimento a base de hidróxido de cálcio

Os cimentos a base de hidróxido de cálcio são empregados devido aos vários efeitos biológicos benéficos apresentados pelo hidróxido de cálcio como, por exemplo, possui efeito de facilitar a difusão iônica da hidroxila e conseqüente aumentar o pH da superfície no interior do canal radicular do canal e tecidos periodontais favorecendo, desta forma, a ação de reparo (Trosntad *et al.*, 1981; Almeida, 1997).

Existem diversos cimentos endodônticos contendo hidroxido de cálcio na sua formulação, dentre eles o Acroseal.

Embora Acroseal já esteja disponível no mercado para uso clínico, há sugestões que este cimento possa induzir menor liberação de cálcio e íon de hidroxila, promovendo desvantagens em estudos *in vivo* (Eldeniz *et al.*, 2007a; Eldeniz *et al.*, 2007b).

Deve-se ressaltar que este cimento além de ser a base de hidróxido de cálcio, apresenta em sua composição a resina epóxica, fato que segundo Gambarini *et al.*, (2003) contribuiria para uma menor toxicidade deste material.

Gomes-filho *et al.*, (2008) compararam a resposta biológica do Sealapex e do Acroseal, em 7 e 30 dias e relataram que ambos os cimentos exibiram ligeira e moderada reação inflamatória no 7 ° dia, diminuindo consideravelmente após este

período. Além disso, o conteúdo histológico apresentava uma cápsula fibrosa que ia se tornando mais fina com o tempo. Foi possível observar, também, que a reação tecidual de ambos os materiais foi semelhante, exceto para a indução de mineralização, a qual não foi observado com Acroseal.

O Acroseal, segundo o fabricante, além de apresentar pH alcalino, libera cálcio que reage com gás carbônico e forma cristais de carbonato de cálcio que serve como um núcleo de calcificação e portanto favorece a mineralização.

2.4.4 Cimento a base de resina metacrilato;

O cimento Epiphany (Pentron Clinical Technologies, Wallingford, CT, EUA) é um compósito à base de resina de metacrilato de polimerização dual, que possui em sua composição partículas de carga como hidróxido de cálcio, sulfato de bário, vidro de bário e sílica (Versiani *et al.*, 2006). A sua apresentação para o uso se dá sob a forma de pasta/pasta, armazenadas em bisnagas individuais, com ponta que mistura os componentes no momento do uso.

Estes cimentos foram inicialmente desenvolvidos para utilização em cirurgias ortopédicas. Estudos preliminares demonstraram ótimos resultados tanto em relação à adesividade quanto a citotoxicidade, quando testado com a resina original. Porém, características desfavoráveis foram notadas como curto tempo de trabalho e proeminente infiltração apical, indicando pobre capacidade de selamento apical. A fim de melhorar estas características o cimento sofreu algumas modificações (Ahlberg & Tay, 1998).

Este cimento possui polimerização dual onde são caracterizados por uma polimerização química mais lenta aonde a luz não chega (Braga e Ferracane 2004).

As ótimas propriedades química-mecânica do Epiphany deve-se ao baixo nível de liberação de íons cálcio observado no estudo de Resende et al (2009).

Susini *et al.*, (2006), investigaram o efeito citotóxico do Epiphany e detectaram que nos dois primeiros dias a ação citotóxica foi aguda, mas esta ação diminuía gradativamente após este período. Em antítese, Bouillaguet *et al.*, (2006), compararam o AH Plus, Epiphany e GuttaFlow e constataram que a citotoxicidade, na verdade, aumentava com o tempo.

Em estudo em subcutâneo de ratos, o Epiphany apresentou resposta inflamatória classificada como leve, observando um tecido organizado e um pequeno número de células inflamatórias além de algum material disperso (Souza *et al.*, 2006).

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos Endofil®, AH Plus®, Epiphany® e Acroseal®, buscando avaliar o grau de citotoxicidade e injúria tecidual através da análise histopatológica e histomorfométrica e o reparo cicatricial do tecido subcutâneo no encapsulamento do tubo de polietileno por análise imunoistoquímica de miofibroblastos.

4. MATERIAL E METODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Positivo, Curitiba, Paraná, Brasil (144/2008), onde foram analisados todos os conceitos éticos para o uso de animais em experimentos laboratoriais seguindo a declaração de Helsink.

4.1 Amostragem

Para esse estudo foram utilizados 18 ratos (*Rattus norvegicus*, Albinus Wistar), sendo 6 para cada período experimental (5 ratos teste e 1 controle), machos, jovens, pesando entre 250 e 280 gramas, com aproximadamente 70 dias, os quais permaneceram em ambiente climatizado no Biotério da Universidade Positivo, dispostos em gaiolas apropriadas e recebendo água e uma dieta alimentar balanceada.

4.2 Procedimento cirúrgico

Para o procedimento cirúrgico, os animais, inicialmente, receberam injeção intramuscular de 0,008 mL/g de cloridrato de ketamina associado a 0,004 mL/g de xilazina. Em seguida, realizou-se a tricotomia dorsal, realizada manualmente para não deixar remanescentes de pelos, principalmente, na região eleita para a incisão. Após tricotomia, foi realizada a desinfecção da região cirúrgica, utilizando gaze estéril embebida em solução de Polivinilpirrolidona Iodo (PVPI).

A incisão cirúrgica foi realizada com lâmina de bisturi nº 23, devido o rato possuir um tecido bastante denso, seguida pela divulsão tecidual radial em 2 cm para o

lado da cabeça do animal as incisões superiores e para o lado contrario das incisões inferiores sendo realizadas com uma tesoura de ponta romba. Os cortes foram realizados com aproximadamente 5mm de distância entre si. Foram realizadas 4 incisões no grupo teste e 2 incisões no grupo controle. Para inserção dos cimentos endodônticos no tecido subcutâneo dos ratos, foram utilizados tubos de polietileno, esterilizados, com 10 mm de comprimento, 1,2 mm de diâmetro, com 0,8 mm de luz interna. Uma das extremidades dos tubos foi selada com o auxílio de uma pinça e uma lamparina (FIG 1, FIG 2, FIG 3).

Os cimentos foram manipulados de acordo com as orientações dos fabricantes, sendo inseridos nos tubos de polietileno com auxílio de uma lântulo #40 e adaptado ao motor X – Smart (Densply-Maillefer, Ballaigues, Suíça), para que não ocorressem bolhas no interior do tubo (FIG 4). Os tubos foram implantados no tecido com auxílio de uma pinça hemostática reta, sendo inseridos com a parte aberta para o interior do tecido, sendo padronizado para todos os cimentos.

Após a implantação dos tubos, os tecidos foram reposicionados e sutura foi realizada com um fio de nylon 5.0 e uma agulha de 1,6 cm.



Fig 1 – Demonstração das incisões nos grupos teste, com a inserção do tubo completo por cimento endodôntico.



Fig 2 – Demonstração da inserção dos cimentos endodônticos no grupo controle.



Fig 3 – Demonstrando os tubos de polietileno após esterelização



Fig 4 – Demonstrando a inserção dos cimentos nos tubos de polietileno

4.3 Cimentos endodônticos

Os materiais estudados foram os cimentos obturadores Endofill (Dentsply Maillefer, Brasil, Petrópolis, RJ), AH Plus (Dentsply De Trey, GmbH, Konstanz Germany), Epiphany (Pentron, Clinical Technologies, LLC, Wallingford, CT, USA), Acroseal (Septodont, Saint Maur des Fossés, Cedex, France). Estes cimentos endodônticos foram divididos em quatro grupos, mais um grupo controle, dispostos da seguinte forma:

Grupo I: Endofill (Implantado na região escapular esquerda)

Grupo II : AH Plus (Implantado na região pélvica direita)

Grupo III : Acroseal (Implantado na região pélvica esquerda)

Grupo IV : Epiphany (Implantado na região escapular direita)

Grupo V : Controle (Tubos de Polietileno vazios)

COMPOSIÇÃO DOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS

Grupo I - Endofil

O cimento é comercializado em pó e líquido, tendo na composição do Pó: Óxido de zinco, Resina hidrogenada, Subcarbonato de bismuto, sulfato de bário, Borato de sódio anidro; E do Líquido, Eugenol e Óleo de amêndoas (FIG 5).



Fig 5 – Representando o cimento Endofill (Grupo I).

Grupo II – AH Plus

Este cimento é comercializado em forma de duas pastas:

Pasta A: Bisphenol A, Bisphenol B – Resina Epóxica, Tungstato de Cálcio Óxido de Zircônio, Sílica, Pigmentos de óxido de ferro (FIG 6);

Pasta B: N N-Dibenzil Diamina -5, TCD Diamin, Tungstato de cálcio, óxido de zircônio, óleo de silicone e sílica (FIG 6).



Fig 6 – Representando cimento AH Plus (Grupo II)

Grupo III – Acroseal

O cimento segundo o fabricante, é composto por duas pastas, sendo elas, Pasta A composta por Methenamina (Antisséptico), Enoxolona (Antinflamatório), Agente radiopaco, e na Pasta B composta por DGEBA – (Resina Epóxica), Hidróxido de cálcio e um agente radiopaco (FIG 7).



Fig 7 – Representando o cimento Acroseal (Grupo III)

Grupo IV – Epiphany Self Echt (SE)

O cimento é comercializado através de uma seringa que compõe uma mistura de resinas BISGMA, EBPADMA, UDMA, PEGDMA, sulfato de bário, hidróxido de cálcio, peróxido, estabilizantes, pigmentos, foto iniciador, sílica tratada, aminas, óxido cloreto de bismuto e sílica de bário boro (FIG 8).



Fig 8 – Representando o cimento Epiphany SE (Grupo IV)

4.4 Controle pós-operatório e Eutanásia

Os animais receberam injeção de 0,1 mL de morfina subcutânea, logo após a cirurgia, e foram recolocados novamente nas gaiolas, mantidos sob observação

recebendo dose de 20 gotas/ 500 mL de água de Paracetamol infantil com sabor caramelo com finalidade analgésica.

Os animais foram eutanasiados após 7, 21 e 45 dias pós-cirúrgico, em câmara de gás carbônico. As áreas teciduais contendo os tubos de polietileno foram removidas com uma margem de segurança de 13,5cm³ (3;3;1,5), com uso de bisturi número 15 e tesoura reta sendo imediatamente imersas em frascos pré identificados contendo formol 10%, permanecendo nesta solução por um período de 24 horas para fixação tissular.

4.5 Procedimento laboratorial

Foi realizado exame macroscópico nas peças cirúrgicas necropsiadas, e as mesmas foram hemi-seccionadas de forma que a área de inclusão correspondesse a região tecidual peritubular para averiguação histológica em sentido transversal ao tubo.

seguida, os fragmentos cirúrgicos foram submetidos à desidratação em bateria ascendente de alcoóis, obedecendo à seguinte ordem: álcool 70°GL, 80 °GL e duas vezes em álcool absoluto, por uma hora de duração em cada um. Foram feitos banhos, por três horas, em xilol e duas horas em parafina, que foi o material de escolha para emblocamento.

Com a solidificação da parafina, os blocos foram levados ao micrótomo (Leica Microsystems, USA) para a realização de cortes seriados com 3 µm de espessura cada. Foram obtidos, em média, 6 cortes por espécime, os quais foram distendidos sobre lâmina de vidro, previamente limpa, e o material levado à estufa (Olides-cz, São Paulo, Brasil) a 60°C para secagem.

Para a remoção da parafina, foram realizados três banhos em xilol (5 minutos cada) e mais três banhos em álcool absoluto (5 minutos cada), seguindo uma bateria

descendente de álcool: etanol absoluto, etanol 80°GL e 50°GL, finalizando com a lavagem em água destilada. A seguir, foi realizada a coloração em hematoxilina por meio da imersão das lâminas, com os cortes montados, por 4 minutos e, a seguir, lavados em água corrente por 1 minuto para remoção do excesso do corante. Logo após, foi processada a diferenciação das lâminas em etanol 80°GL e estas foram imersas em eosina por trinta segundos, removendo-se o excesso deste corante com dois banhos de etanol 80°GL por vinte segundos cada. Depois de realizada a coloração, fez-se a desidratação do conjunto, mergulhando as lâminas por três vezes sucessivas em álcool absoluto por um minuto em cada vez, seguindo a diafanização em xilol por 2 minutos. As lamínulas foram montadas com a utilização de Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA) para análise em microscópio de luz, seguindo etiquetagem das lâminas.

4.6 Técnica de Imunoistoquímica

A imuno-expressão da proteína actina de músculo liso foi obtida por meio do método da streptoavidina-biotina imunoperoxidase. Foram obtidos cortes histológicos de 3 µm do material embocado em parafina os quais foram estendidos sobre lâminas de vidro. As lâminas foram previamente limpas, desidratadas e mergulhadas em solução de 3-aminopropiltriétoxi-silano (Sigma Chemical CO., St Louis, MO/USA), seguindo para estufa a 60°C para secagem e fixação do material.

Em seguida, os cortes histológicos contidos nessas lâminas foram desparafinadas em 2 banhos de xilol: (1) submersão por 30 minutos à 60°C, (2) imersão por 20 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram secos em papel de filtro e hidratados em cadeia descendente de etanol, respectivamente com três trocas de etanol absoluto, seguidos por

etanol 95°GL e 85°GL com 5 minutos cada. Foi realizado banho de 10 minutos em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol 95% para a remoção de pigmentos formólicos, seguindo-se então para a lavagem em água corrente por 10 minutos e uma passagem por água destilada.

Para a recuperação antigênica do tecido, com quebra das ligações cruzadas provocadas pelo formol, os cortes foram submetidos à solução de ácido cítrico na concentração de 0,01 M, pH 6,0, em banho-Maria à 95°C por 30 minutos, seguido de resfriamento à temperatura ambiente.

As lâminas foram lavadas em água corrente, seguida de passagem por água destilada, seguindo para bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (solução H₂O₂ a 6% em água destilada, na proporção de 1:1) por 30 minutos. A solução foi removida com lavagem em água corrente, seguida de duas trocas de água destilada durante 3 minutos.

Para que não houvesse alterações significativas de pH, os cortes foram submetidos à rápida incubação em solução tampão TRIS na concentração de 0,05 M e pH 7,4.

As lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-actina de músculo liso (DAKO, clone: 1A4, Isotopo: IgG2a, kappa) por 18 horas (“overnight”) a 4°C, em câmara úmida na diluição de 1:150 em solução de TRIS, pH 7,4, acrescido de albumina bovina a 1% contendo azida sódica a 0,1% (BSA- Biotest S/A, São Paulo, Brasil). Como controle negativo, foram utilizados os cortes de mesmo bloco, omitindo-se a incubação do anticorpo primário. Para controle positivo, utilizou-se controle interno que consistia na positividade de túnica média vascular.

Para a incubação do anticorpo secundário e complexo terciário (strepto avidina biotina com peroxidase), foi utilizado o “kit LSAB” (DAKO número KO, 690), segundo instruções do fabricante (30 minutos cada). Essas etapas foram realizadas em câmara úmida durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Para revelar a reação, as lâminas foram incubadas em 300 mg do cromógeno diaminobenzidina (3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical CO., St Louis, MO/USA) em 100 ml de tampão TRIS, pH 7,4, previamente filtrados e ativados sob indução de 600 µl de H₂O₂ a 6%, em temperatura ambiente, por três minutos em câmara escura. Após a incubação, foi realizada uma lavagem em tampão TRIS, seguida de uma lavagem em água corrente e água destilada por 5 minutos.

O conteúdo nas lâminas foram contra-corados com hematoxilina de Harris por 3 minutos e lavados brevemente em água corrente e água destilada. As lâminas foram desidratadas em bateria ascendente de etanol durante 5 minutos cada (respectivamente 70%, 80%, 95% e absoluto), seguida de diafanização em xilol e montagem com Permount[®] (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA) para análise em microscópio de luz.

Foram consideradas como positivas somente células que apresentaram coloração acastanhada, resultado da precipitação salina da diaminobenzidina, independente da intensidade da coloração, e com suficiência para diferenciação entre positivo e negativo.

4.7 Análise dos resultados

Como critério, as lâminas foram analisadas em um microscópio de luz por um examinador treinado e calibrado. Cada amostra foi avaliada em três cortes histológicos

seriados e analisadas qualitativamente seguindo os critérios apontados por Shahi, et al. (2006). Foram observados em cada lâmina histológica os seguintes componentes:

4.7.1. Critério tissular

Neste critério foram analisados:

- (1) componentes de inflamação aguda representado por neutrófilos;
- (2) componentes de inflamação crônica, representado por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, células gigantes tipo corpo estranho;
- (3) material disperso em permeio ao tecido conjuntivo;
- (4) necrose;

Cada critério avaliado recebeu escores sob os seguintes valores por análise visual:

- (0) Componente ausente (<1% do conteúdo presente na lâmina)
- (1) Componente discreto ou leve (entre $1 \leq e < 25\%$ do conteúdo presente na lâmina)
- (2) Componente moderado (entre $25 \leq e < 50\%$ do conteúdo presente na lâmina)
- (3) Componente intenso ou severo (acima de 50% do conteúdo presente na lâmina)

4.7.2. Condensação fibrosa

Para este parâmetro, os critérios estabelecidos foram:

- (1) Ausência de fibras colágenas que envolvia a área que continha o material em estudo;
- (2) Presença de uma fina camada de fibras colágenas envolvendo o material em estudo;
- (3) Presença de uma espessa camada de fibras colágenas envolvendo o material em estudo;

4.7.3. Presença de miofibroblastos

Foram contabilizados separadamente através da análise de imunoistoquímica a

(1) presença de miofibroblasto em angiogênese e (2) presença de miofibroblasto em cápsula de contração peritubular e foram contabilizados sob o seguinte critério:

- (1) Ausência de miofibroblastos;
- (2) Presença leve de miofibroblastos próximo ao tubo;
- (3) Presença moderada de miofibroblastos próximo ao tubo;
- (4) Presença severa de miofibroblastos próximo ao tubo;

Análise estatística dos resultados

As variáveis relacionadas aos eventos celulares da inflamação (linfócitos e plasmocitos, neutrófilos, células gigantes e macrófagos), e as características da condensação fibrosa 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).

Os resultados do grupo controle foram descritivos, devido um número reduzido de amostras. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, foi utilizado seguido das comparações múltiplas pelo teste de Dunn.

5. RESULTADOS

Os resultados foram analisados nos três períodos de tempo experimentais propostos. A apresentação dos resultados segue em dois diferentes formatos: **análise qualitativa** do conteúdo laminar referente aos eventos da inflamação, aspectos relacionados à condensação fibrosa, presença de miofibroblastos e degeneração neutrofílica e **análise quantitativa (histomorfométrica por escore)** dos aspectos descritos acima.

5.1 Análise qualitativa dos aspectos histopatológicos e imunoistoquímicos

Grupo I – Endofill

Avaliação em 7 dias

Aos sete dias foi verificado processo inflamatório crônico moderado composto predominantemente por linfócitos e plasmócitos em todos os casos estudados (FIG 9), sendo que células gigantes multinucleadas formadas em uma reação de corpo estranho e componente macrofágico faziam-se presentes em número reduzido, especialmente quando ocorria extravasamento de material.

Áreas de necrose e infiltrado neutrofílico (processo de agudização) foram identificados focalmente e restritos aos cortes histológicos.

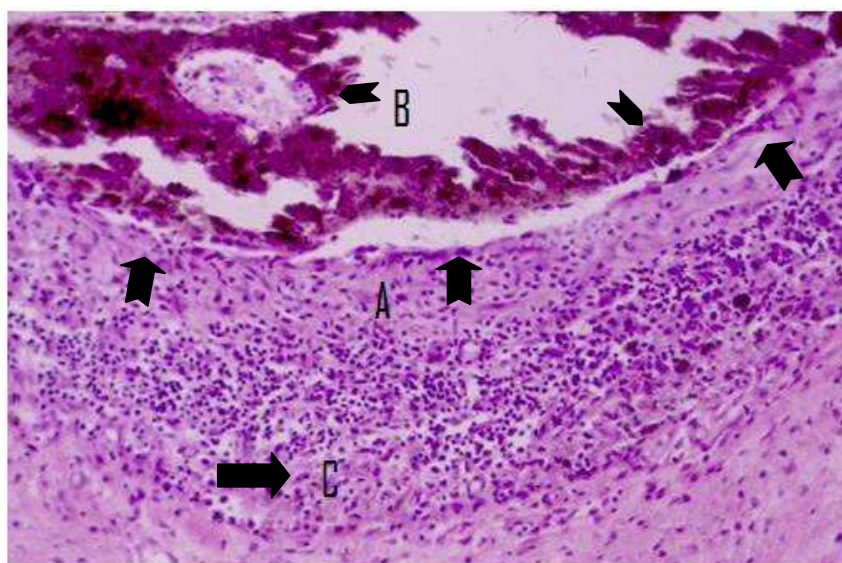


Figura 9 - Micrografia de amostra do grupo I corada em HE, em 7 dias, mostrando interior do tubo de polietileno(A), cimento endodôntico (B) e tecido de granulação contendo processo inflamatório crônico (C) em tecido conjuntivo denso. Aumento em 100×.

Na análise imunoistoquímica foi notada a presença leve de miofibroblastos dispostos difusamente ao tecido inflamatório, mimetizando área de neoangiogênese (FIG10).

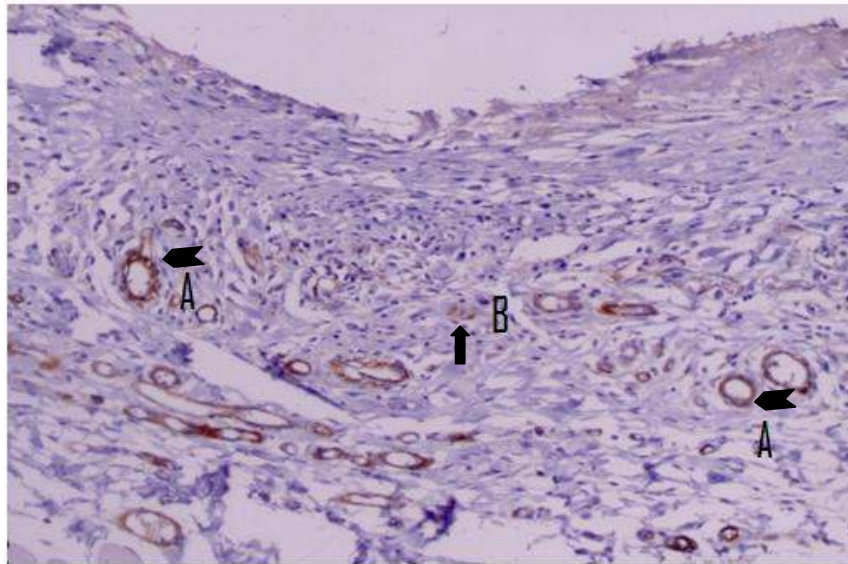


Figura 10 - Imunoistoquímica de actina de músculo liso mostrando miofibroblasto circundando área vascular bem formada (A) e a formação angiogênica (B). Aumento em 100×.

Avaliação em 21 dias

Aos vinte e um dias foi notória a persistência de processo inflamatório crônico, predominantemente linfo-plasmocitário, concentrado em região peritubular. Entretanto, identificou-se a presença de um tecido conjuntivo organizado e vascularizado, e a presença de condensação fibrosa em área circunvizinha ao tubo de polietileno.

Um espécime revelou intenso extravasamento e demonstrou processo inflamatório granulomatoso intenso, contendo grande quantidade de células gigantes, macrófagos epitelióides e neutrófilos. Uma área restrita de necrose permeada pelo cimento extravasado também foi encontrada (FIG 11).

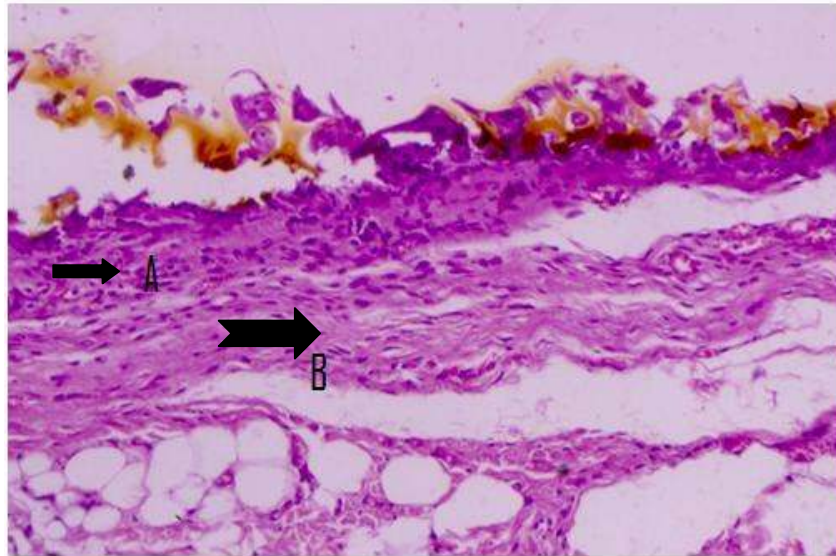


Figura 11 - Micrografia em HE aos 21 dias revelando discreto processo inflamatório na região peritubular (A). Nota-se tecido conjuntivo denso em área circunvizinha ao tubo de polietileno (B). Aumento em 100 \times .

Na análise imunoistoquímica verificou-se a presença de numerosos miofibroblastos, tanto na região vascular bem formada, quanto presente em uma cápsula fibrosa em formação (FIG 12).

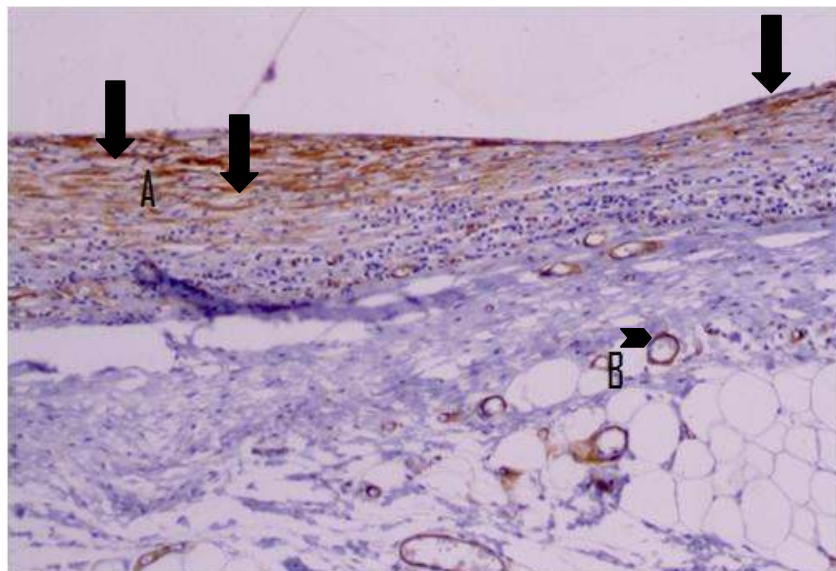


Figura 12 - Miofibroblastos em organização capsular (seta) em região peritubular, aos 21 dias, e delineando vasos sanguíneos (cabeça de seta) em um tecido conjuntivo organizado. Aumento em 100 \times .

Avaliação em 45 dias

Após um período de 45 dias, as amostras apresentaram ainda discreto processo linfo-plasmocitário conciso em área peritubular, formado por um tecido conjuntivo com intensa condensação fibrosa composta por inúmeros miofibroblastos que pareciam apresentar íntimo contato entre si (FIG 13 e 14).

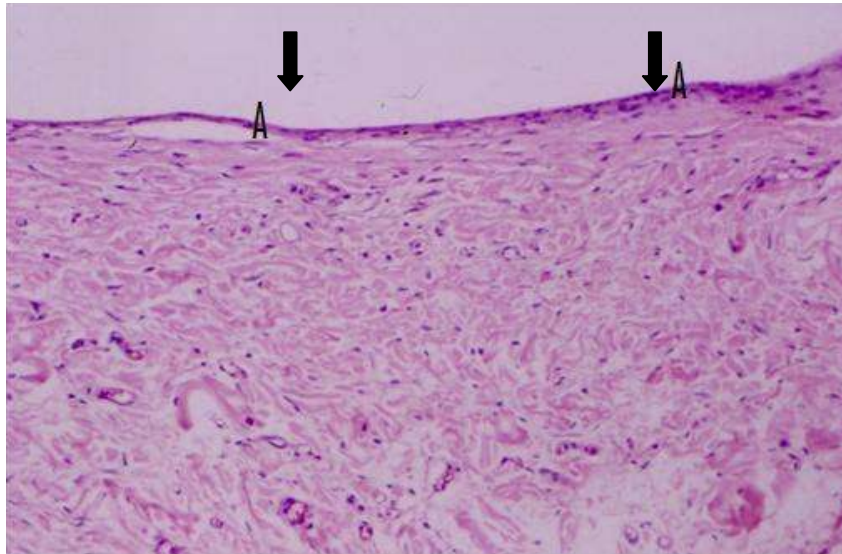


Figura 13 - Micrografia em 45 dias revelando reparo tecidual e cápsula fibrosa bem formada em região peritubular (A). Aumento em 100 \times .

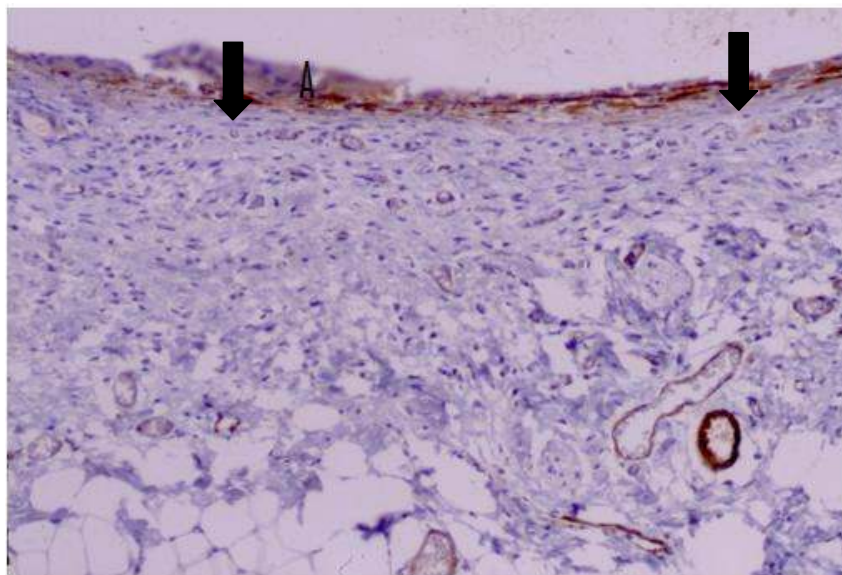


Figura 14 - Imunoistoquímica revelando intensa quantidade de miofibroblasto em região peritubular (A), consistente com retração do tecido de granulação. Aumento em 100×.

Grupo II – AH Plus

Avaliação em 7 dias

No período de sete dias, o grupo AH Plus revelou moderado processo inflamatório linfo-plasmocitário, área de evidente angiogênese e cápsula fibrosa bem formada delineando o tubo de polietileno.

Nos espécimes que apresentaram extravasamento, foi identificada área focal de tecido de granulação ricamente vascularizado, onde se encontravam linfócitos, plasmócitos, e a presença discreta de células gigantes, além de área focal de necrose, permeada por um componente macrofágico epitelióide (FIG 15).

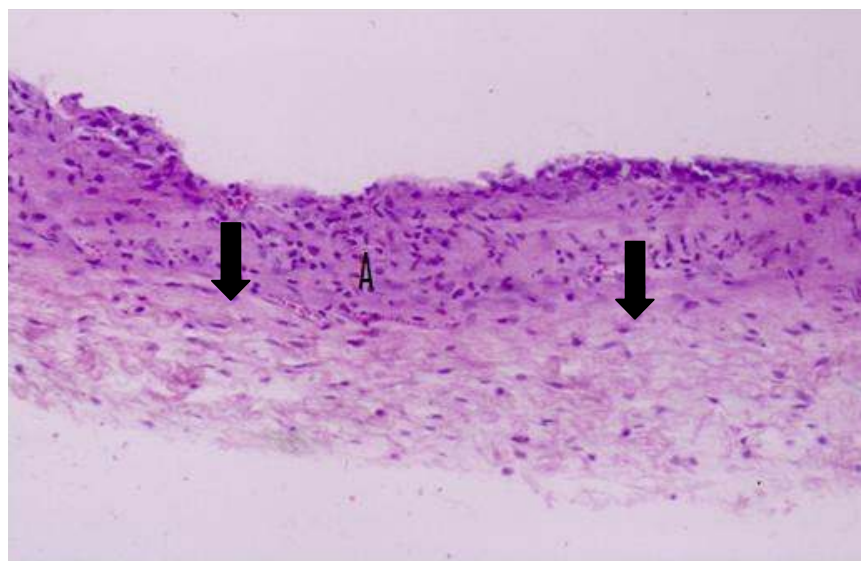


Figura 15 - Micrografia de amostra do grupo II corada em HE, em 7 dias, mostrando uma área de processo inflamatório crônico (A). Aumento em 100×.

A análise imunoistoquímica revelou presença de miofibroblastos, tanto delineando área de formação vascular em tecido de granulação, quanto compondo área capsular que circundava o tubo de polietileno (FIG 16).

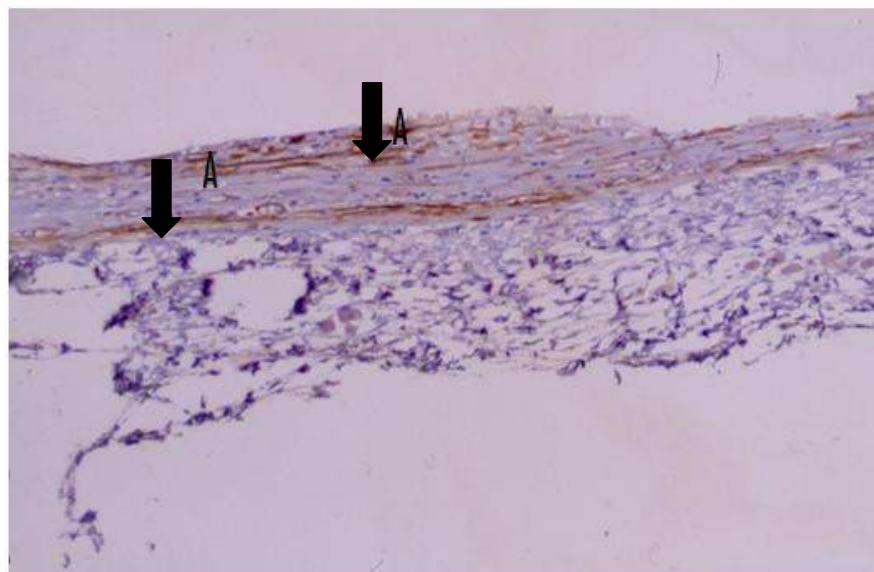


Figura 16 - Imunoistoquímica de actina de músculo liso mostrando miofibroblasto (A) em áreas de condensação fibrosa, que circundava o tubo. Aumento em 100×.

Avaliação em 21 dias

O AH Plus, aos vinte e um dias, apresentou organização de tecido conjuntivo e formação de fibrose circundando o tubo de polietileno (FIG 17).

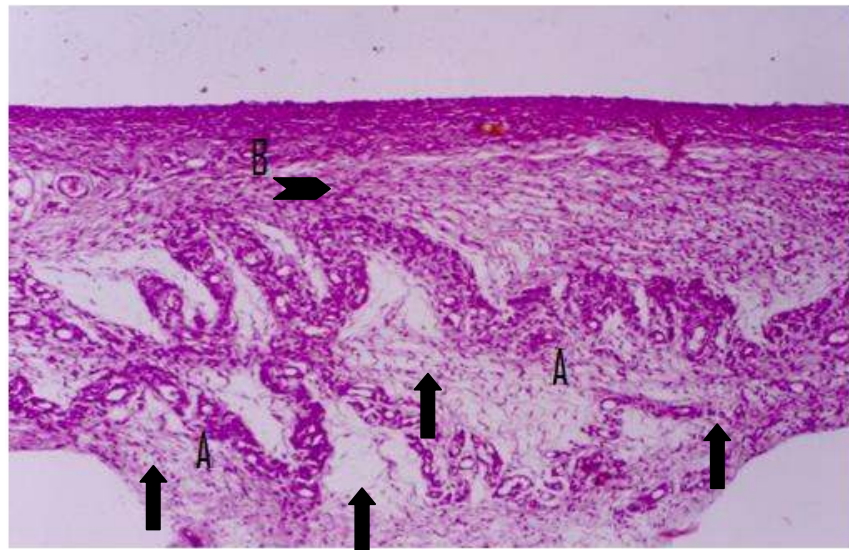


Figura 17 - Micrografia de amostra do grupo II corada em HE, aos 21 dias, revelando tecido conjuntivo em formação, áreas de angiogênese (A) e fibrose (B). Aumento em 100×.

Na análise imunoistoquímica, verificou-se intensa quantidade de miofibroblastos, tanto em área capsular, quanto em tecido conjuntivo. Em tecido conjuntivo, foi observada intensa evolução angiogênica (FIG 18)

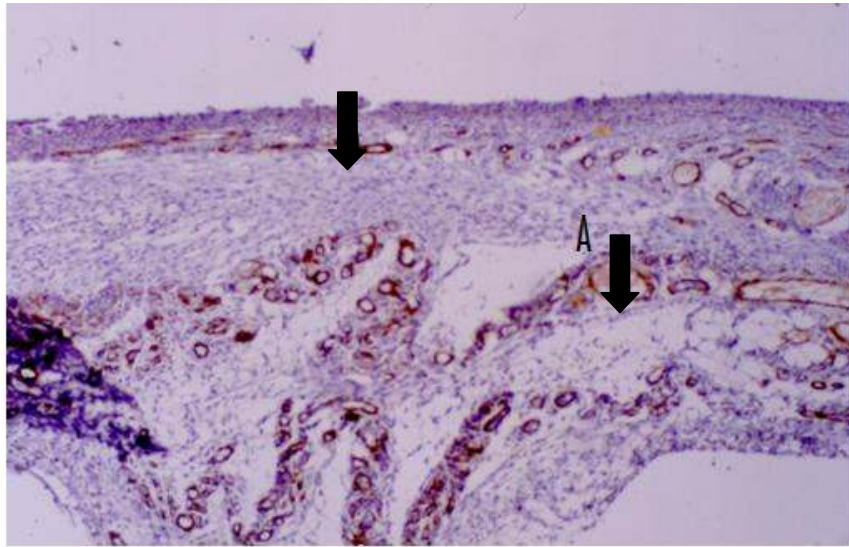


Figura 18 - Miofibroblasto em organização em região de contração aos 21 dias, e presença de conexão vascular (A). Aumento em 100×.

Avaliação em 45 dias

Após 45 dias, o AH Plus demonstrou formação cápsula de tecido conjuntivo denso organizado circundando o tubo de polietileno e área de tecido conjuntivo cicatricial em contigüidade à área de condensação fibrosa (FIG 19).

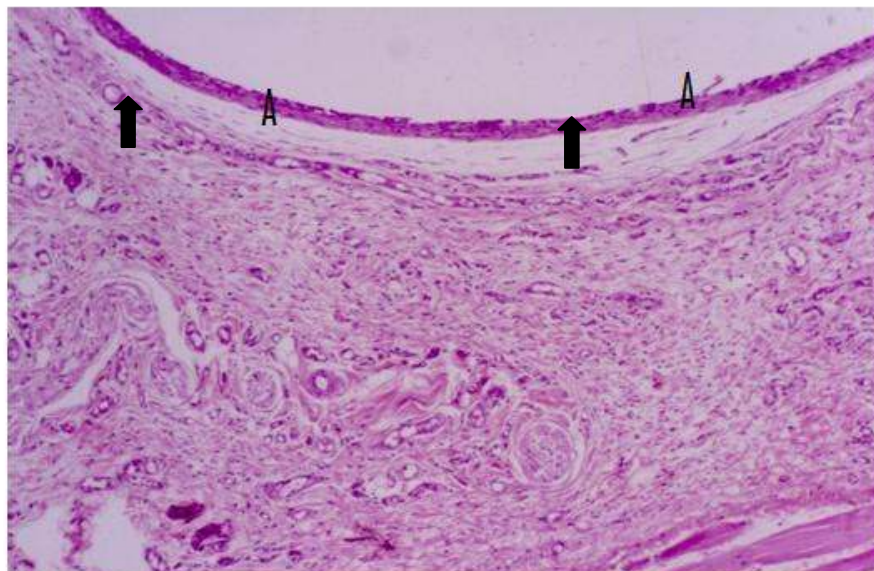


Figura 19 - Micrografia, revelando reparo e cápsula de tecido conjuntivo denso organizado (A) em 45 dias. Aumento em 100×.

Notou-se ainda a presença de células positivas para actina-músculo liso localizadas em cápsula fibrosa (FIG 20).

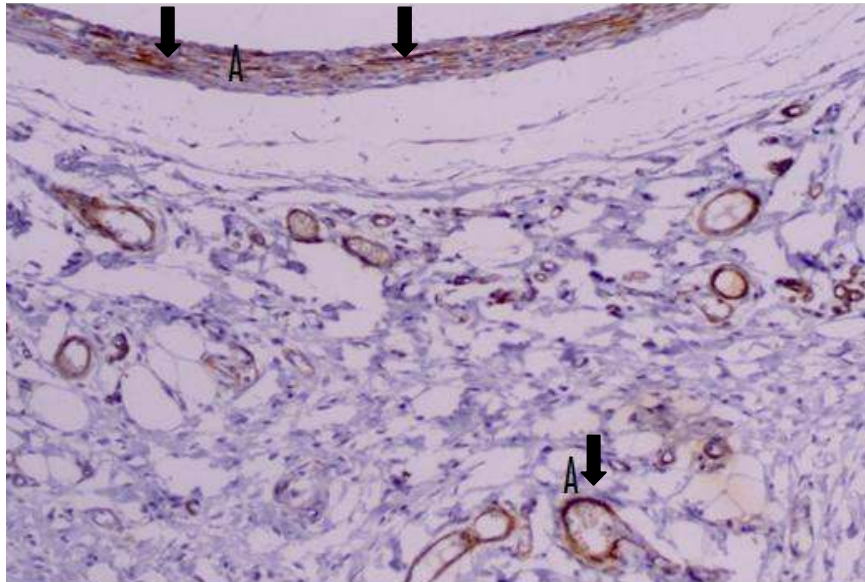


Figura 20 - Análise imunoistoquímica mostrando positividade de miofibroblasto (A) em região peritubular e na luz do vaso, consistente com retração do tecido de granulação. Aumento em 100×.

Grupo III – Acroseal

Avaliação em 7 dias

Aos sete dias, o Acroseal demonstrou formação de tecido de granulação exibindo intenso processo inflamatório linfo-plasmocitário difuso (FIG 21).

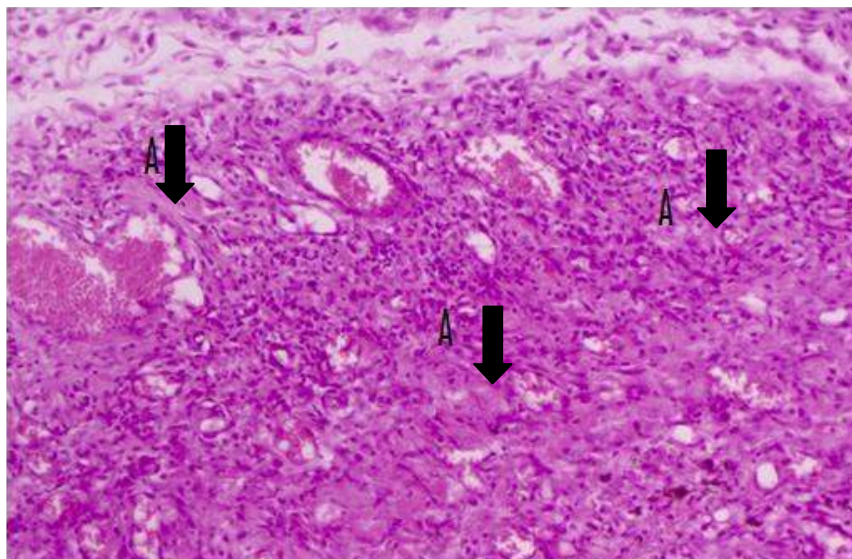


Figura 21 - Micrografia de amostra do grupo III corada em HE, em 7 dias, mostrando tecido de granulação contendo processo inflamatório crônico (A). Aumento em 100×.

Foi observada severa quantidade de miofibroblastos em tecido de granulação, no entanto, notou-se presença leve de cápsula fibrosa (FIG 22).

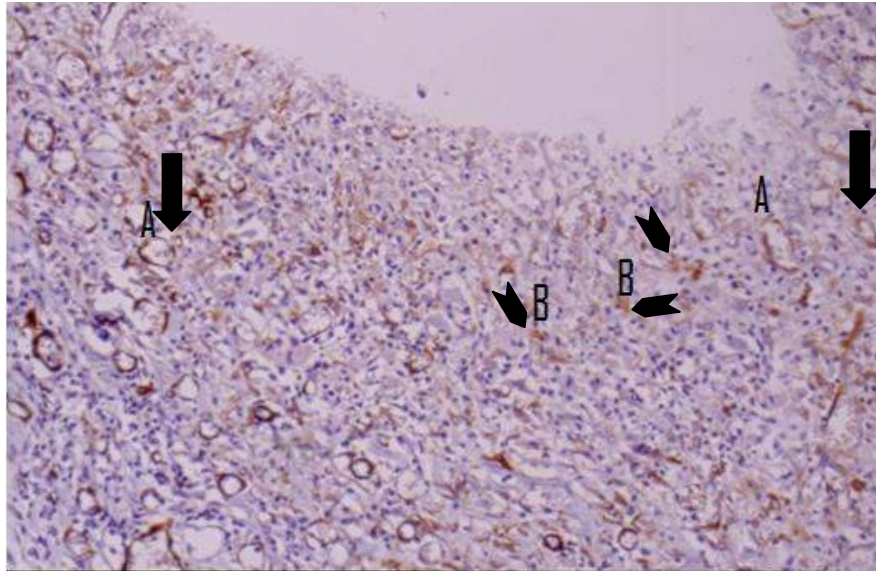


Figura 22 - Imunoistoquímica de actina de músculo liso mostrando miofibroblasto circundando área vascular (A) e disperso pelo tecido de granulação (B). Aumento em 100×.

Avaliação em 21 dias

Aos vinte e um dias, demonstrou persistente presença de tecido de granulação, revelando em seu permeio intenso processo inflamatório crônico linfo-plasmocitário. Um achado histopatológico importante foi à ausência de cápsula fibrosa peritubular neste período (FIG 23).

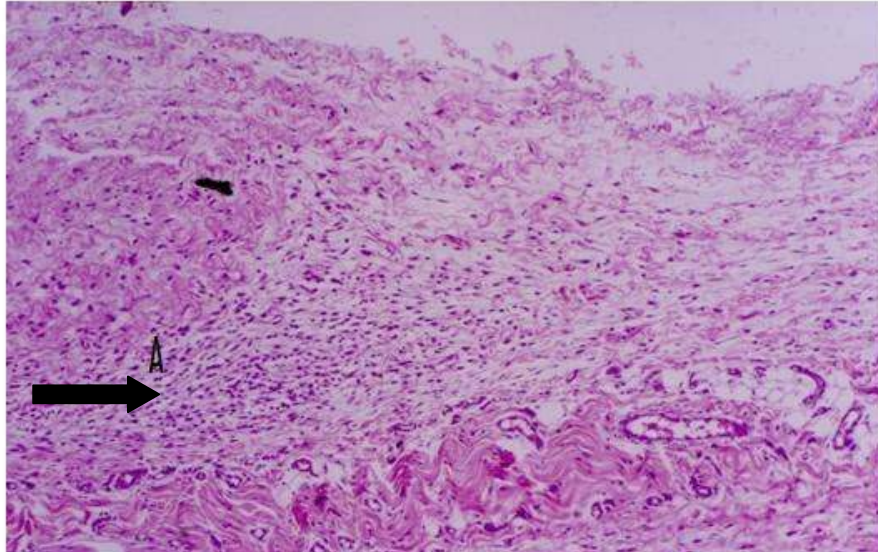


Figura 23 - Histoquímica em HE aos 21 dias, mostrando ausência de condensação fibrosa em área circunvizinha ao tubo de polietileno e persistência de tecido de granulação com processo inflamatório crônico (A). Aumento em 100×.

Miofibroblastos foram verificados somente dispersos no tecido de granulação, em formação de tecido vascular e migrantes a início de formação capsular. As ausências do componente miofibroblástico e presença de cápsula perotubular revelam atraso no processo de condensação fibrosa capsular e conseqüente atraso do reparo tecidual (FIG 24).

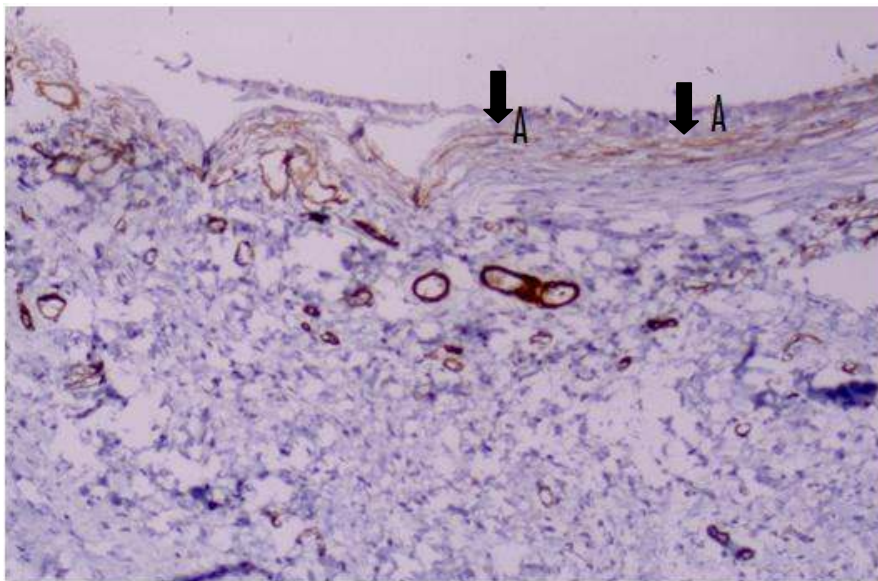


Figura 24 - Miofibroblasto em organização em região peritubular (A), aos 21 dias. Aumento em 100×.

Avaliação em 45 dias

Na avaliação aos 45 dias, verificou-se modelamento de tecido conjuntivo e organização de área capsular. Infiltrado inflamatório crônico concentrado em região pericapsular ainda foi identificado nas amostras deste grupo (FIG 25).

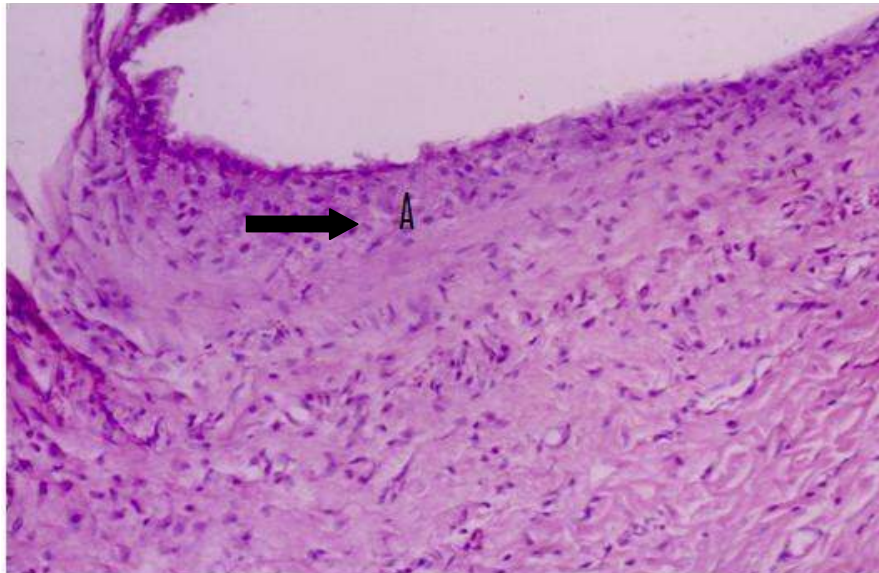


Figura 25 - Micrografia em 45 dias, revelando reparo tecidual e cápsula fibrosa (A) bem formada em região peritubular. Aumento em 100 \times .

A organização do tecido fibroso peritubular composto por intensa quantidade de células fusiformes e miofibroblastos confirmou a estruturação capsular, corroborando com encapsulamento tardio (FIG 26).

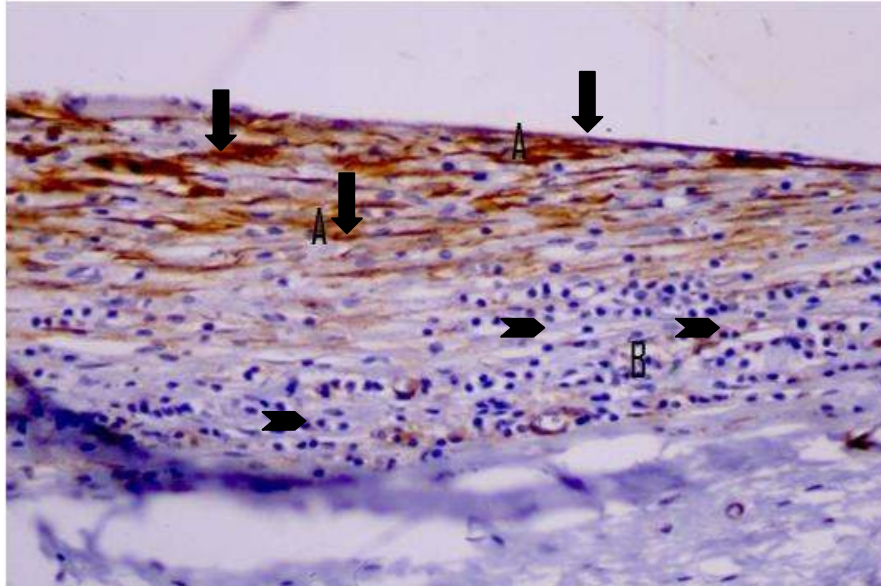


Figura 26 - Imunoistoquímica revelando intensa quantidade de miofibroblasto em região peritubular (A), consistente com retração do tecido de granulação e moderado processo inflamatório crônico (B) persistente em região adjacente ao tubo implantado. Aumento em 100×.

Grupo IV – Epiphany

Avaliação em 7 dias

No aspecto microscópico, em sete dias, o Epiphany induziu a presença de um infiltrado inflamatório agudo e crônico difuso nos cortes histológicos analisados. Área focal de edema e exsudato purulento, bem como discreta área de necrose, foram observadas em *loci* apresentando extravasamento de material e forma achados concomitantemente à presença de células gigantes multinucleadas formadas em razão da presença de corpo estranho e componente macrofágico (FIG 27).

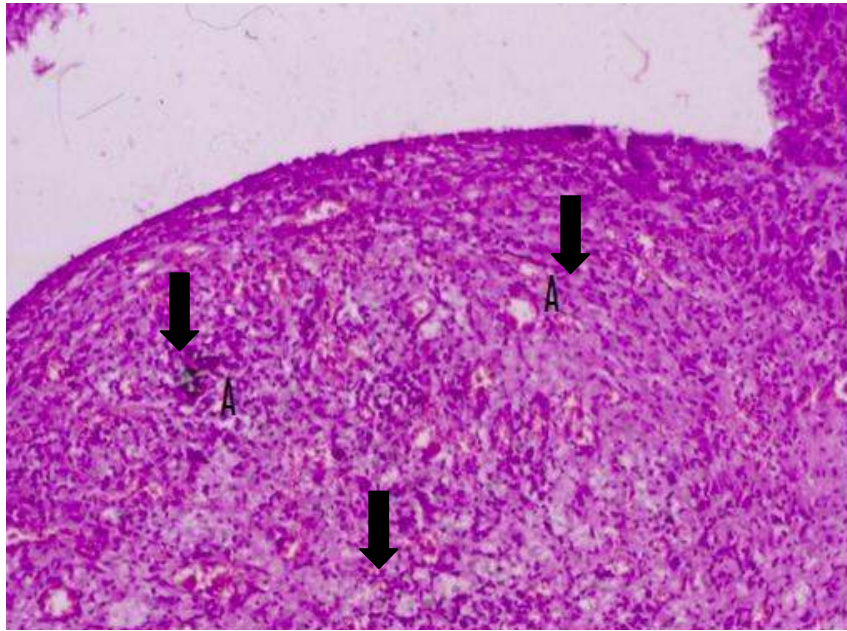


Figura 27 - Micrografia de amostra do grupo IV corada em HE, em 7 dias, mostrando empermeio ao tecido de granulação processo inflamatório crônico e agudo (A). Aumento em 100×.

Os aspectos imunoistoquímicos mais relevantes encontrados foram processos de fibroplasia e início de angiogênese revelados por arcabouço de luz vascular circundada por inúmeros miofibroblastos (FIG 28).

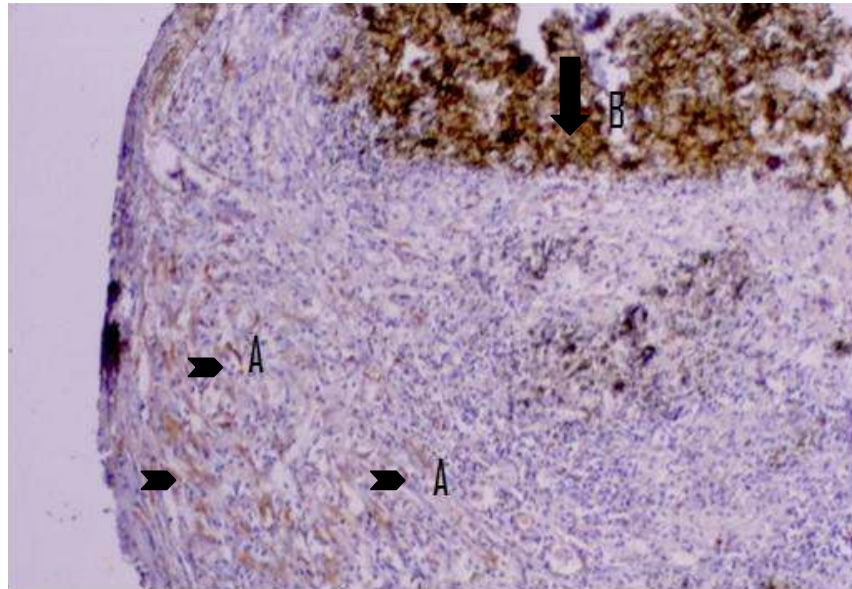


Figura 28 - Imunoistoquímica indicando positividade de actina de músculo liso em células dispersa ao tecido de granulação (A), constituindo ausência de estruturação angiogênica. Notar material disperso ao tecido conjuntivo (B). Aumento em 100 \times .

Avaliação em 21 dias

Aos vinte e um dias, foi identificado um processo inflamatório crônico com formação de tecido de granulação e angiogênese com predomínio de infiltração linplasmocitária. Porém, áreas de infiltrado agudo focal se faziam presentes. Neste período não foi observado em nenhuma das amostras analisadas a presença de cápsula peritubular (FIG 29).

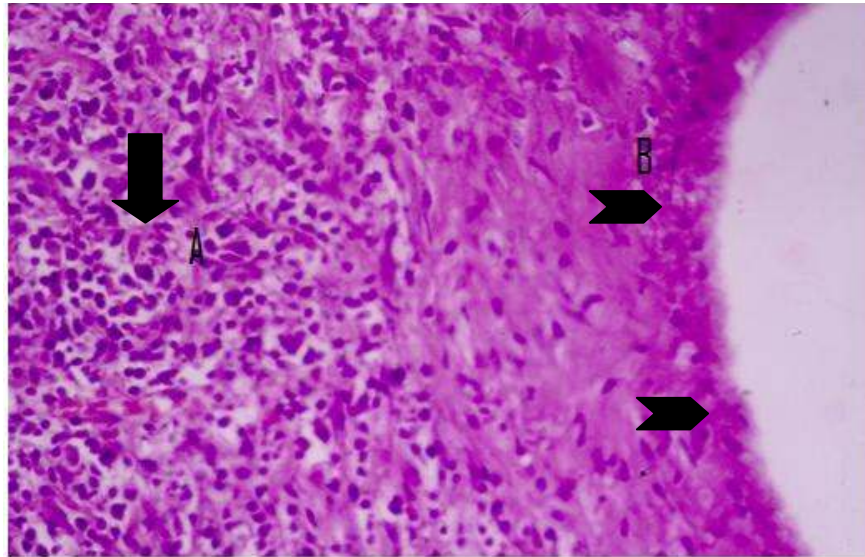


Figura 29 - Micrografia corada em HE, aos 21 dias, mostrando persistente tecido de granulação contendo infiltrado inflamatório crônico (A) e ausência de cápsula fibrosa em área circunvizinha ao tubo de polietileno (B). Aumento em 100 \times .

A ocorrência de miofibroblastos foi escassa e só foi verificada circundando a região de vasos bem formados (FIG 30).

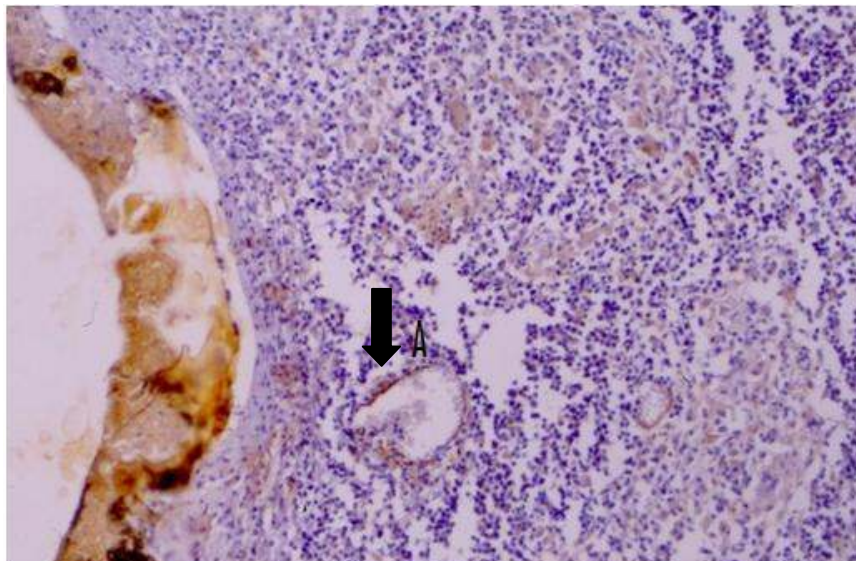


Figura 30 - Micrografia revelando miofibroblastos (A) restritos a vasos sanguíneos bem diferenciados aos 21 dias. Aumento em 100 \times .

Avaliação em 45 dias

Aos 45 dias, o tecido que foi encontrava-se em contato com o cimento Epiphany demonstrou organização tecidual de conjuntivo, contudo ainda se fazia presente

moderado processo inflamatório crônico (FIG 31). Miofibroblastos foram presentes em áreas de vasos sanguíneos bem formados e foram verificados também em área peritubular (FIG 32).

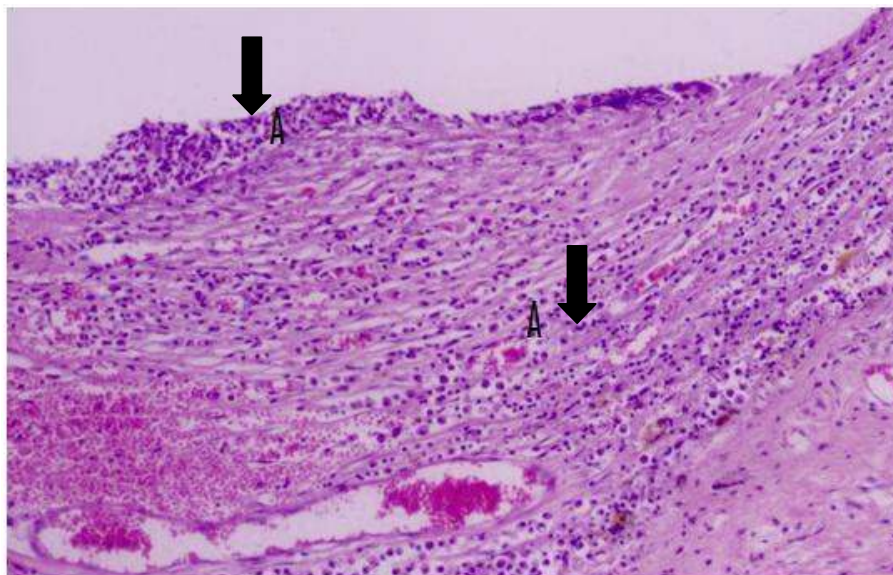


Figura 31 - Micrografia indicando a presença de tecido de granulação contendo intenso processo inflamatório crônico difuso ao tecido peritubular (A), em 45 dias. Aumento em 100 \times .

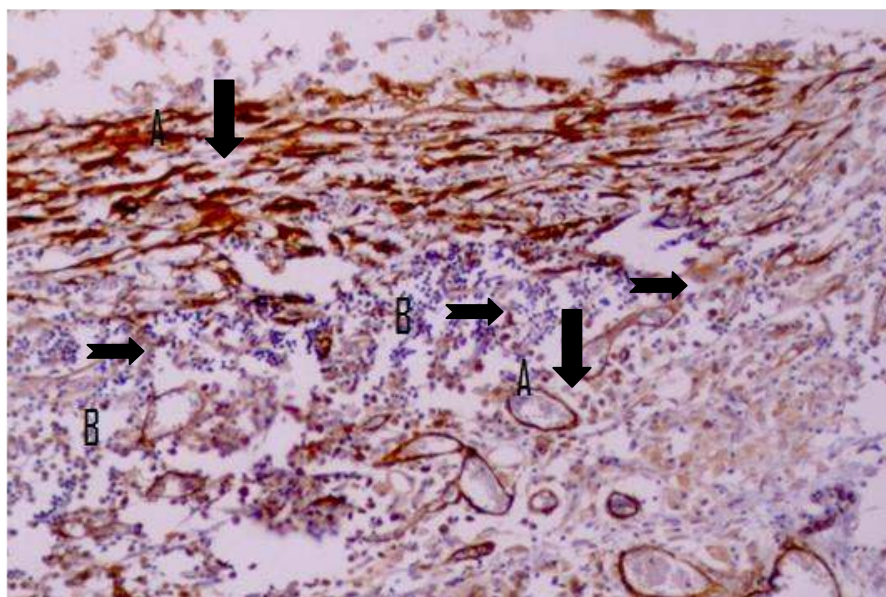


Figura 32 - Imunoistoquímica mostrando início de formação e diferenciação de miofibroblastos (A) em região peritubular e em vasos sanguíneos e persistência de processo inflamatório crônico difuso (B). Aumento em 100×.

Grupo V –Controle

Avaliação em 7 dias

Aos sete dias, o grupo de implantação do tubo de polietileno sem o preenchimento com material endodôntico apresentou discreto processo inflamatório crônico focal à área adjacente ao tubo, com início de produção de cápsula fibrosa revelada por moderado número de células miofibroblásticas em organização (FIG 33).

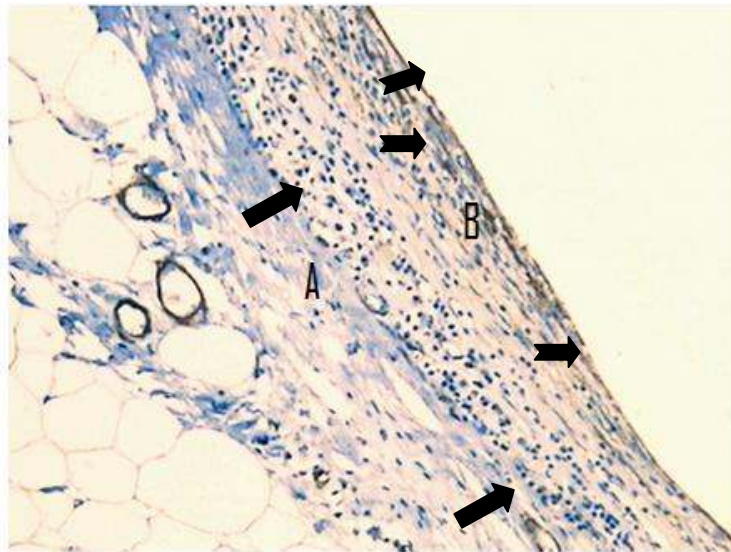


Figura 33 - Análise imunoistoquímica de amostra do grupo controle, revelando discreto processo inflamatório crônico (A) e início de estruturação pericapsular por miofibroblastos (cabeça de seta). Aumento de 100×.

Avaliação em 21 dias e 45 dias

O aspecto histológico demonstrado em 21 e 45 dias foi similar. Nestes períodos foi observada a presença de tecido conjuntivo denso não modelado com aspecto histológico de derme normal. Miofibroblastos foram verificados em cápsula fibrosa delineando o tubo (FIG 34).

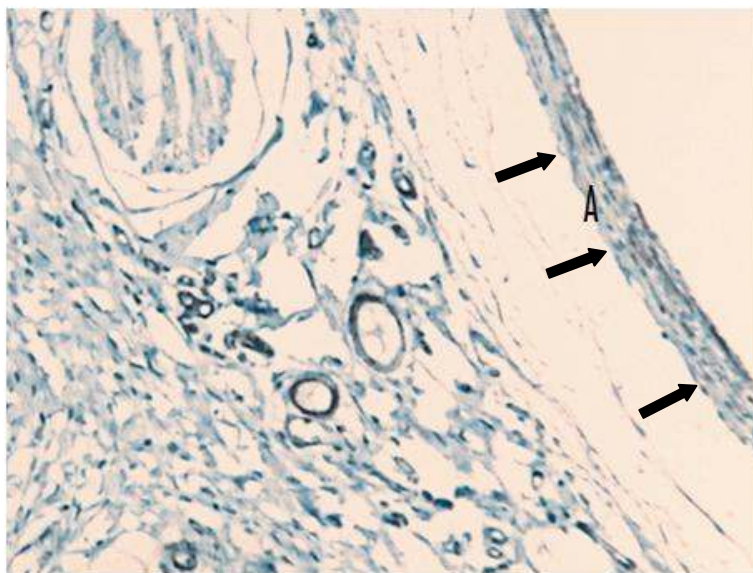


Figura 34 - Miofibroblastos (seta) concentrados em região peritubular e conjuntivo compatível com derme normal. Aumento de 100 \times .

5.2. Análise quantitativa (histomorfométrica)

Na análise quantitativa, foram analisados os aspectos relacionados ao conteúdo inflamatório, reparador e imunoistoquímico, sendo este último para analisar a quantidade de miofibroblastos. Serão apresentados os parâmetros histomorfométricos em forma de gráficos para melhor visualização e comparação entre os grupos, tomando-se como base os escores descritos na seção Material e Métodos.

5.2.1. Processo inflamatório

Na análise da biocompatibilidade e/ou citotoxicidade de um material restaurador, a presença ou mesmo a persistência de um processo inflamatório, especialmente agudo (neutrofílico), torna-se fator importante.

Os resultados deste trabalho evidenciaram escores semelhantes entre os grupos nos diversos períodos de tempo analisados, excetuando-se o grupo IV (Epiphany), que

revelou maior escore, apresentando infiltrado inflamatório moderado a intenso inclusive aos 45 dias.

A análise do componente inflamatório agudo (neutrofílico) é revelada na Figura 35 em 7, 21 e 45 dias pós-operatórios.

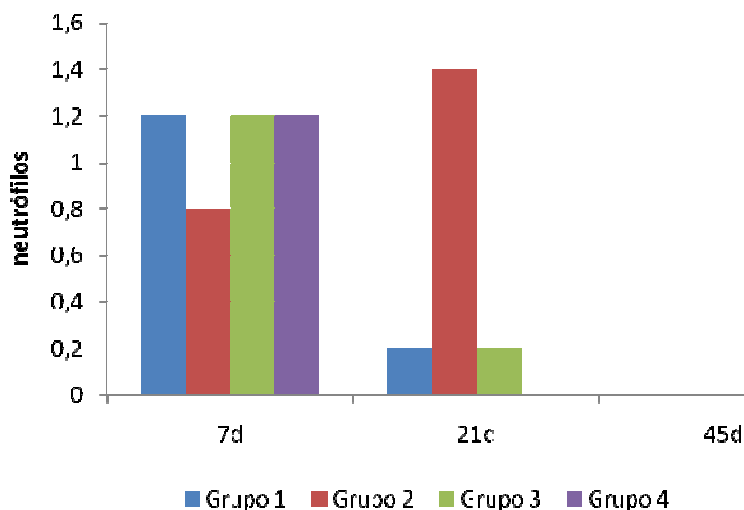


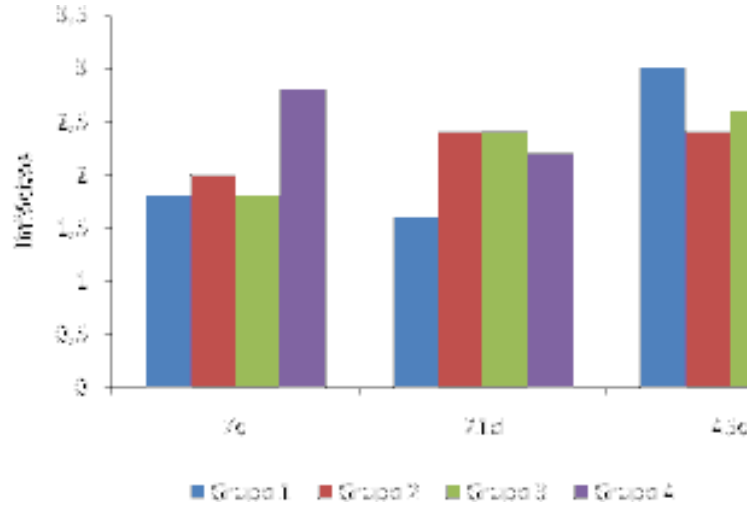
Figura 35 – Demonstrando a quantidade de neutrófilos nos quatro grupos e nos diferentes períodos estudados.

A cronicidade da inflamação consistiu em outro critério importante. A análise comparativa entre o desencadeamento apenas do infiltrado linfo-plasmocitário foi consistente com a evolução da hipersensibilidade tardia por linfócitos T. Já a presença de tecido granulomatoso, evidenciado pelo alto percentual de macrófagos e células gigantes multinucleadas, revelou a presença de cimento de alto peso molecular com baixa capacidade de ser degradado.

Os escores referentes à presença de linfócitos e plasmócitos foram agrupados em apenas um critério, uma vez que um componente inflamatório requer um percentual similar de células T e B, esta última manifestada por plasmócitos, uma vez que são anticorpos protéicos.

Inflamação linfo-plasmocitária foi evidenciada em todos os períodos analisados, exceto o grupo controle (grupo V), em que a inflamação só foi observada em 7 dias, provavelmente em decorrência do trauma cirúrgico e a reatividade ao polietileno.

Os escores são representados na Figura 36 e 37.



Figur

a 36 – Apresentação dos diferentes grupos e períodos do componente inflamatório crônico linfocitário.

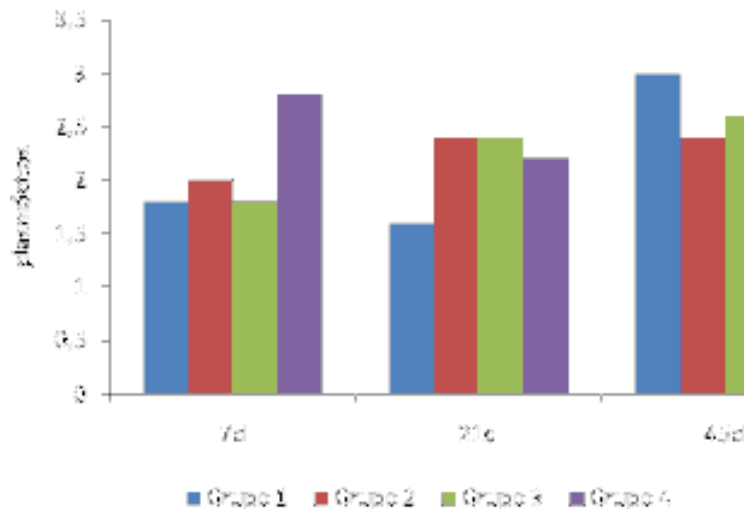
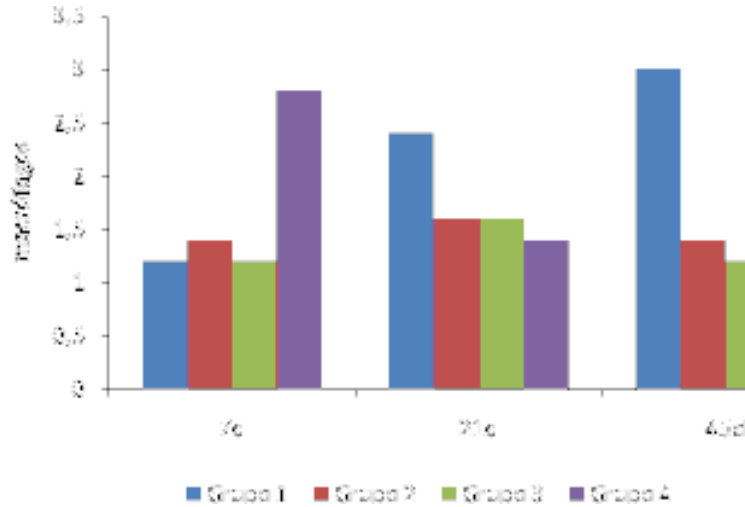


Figura 37 - Apresentação dos diferentes grupos e períodos do componente inflamatório crônico plasmocitário.

A interpretação deste trabalho quanto à presença de infiltrado macrofágico revelou percentuais homogêneos entre os grupos II, III, e IV. Os únicos grupos que se diferiram estatisticamente foram: grupo I, por apresentar intensa quantidade de macrófagos, e grupo V, que após 21 dias revelou ausência de infiltrado inflamatório. A figura 38 descreve os escores de macrófagos nos períodos de 7, 21 e 45 dias.



Figur

a 38 – Demonstrando conteúdo macrofágico nos três períodos testados.

A análise de células gigantes multinucleadas foi um critério difícil de ser analisado. De fato, o poder de indução de uma inflamação granulomatosa ocorreu apenas quando o extravasamento do cimento obturador se fazia presente. A mensuração média de escores de células gigantes é mostrada na figura 39.

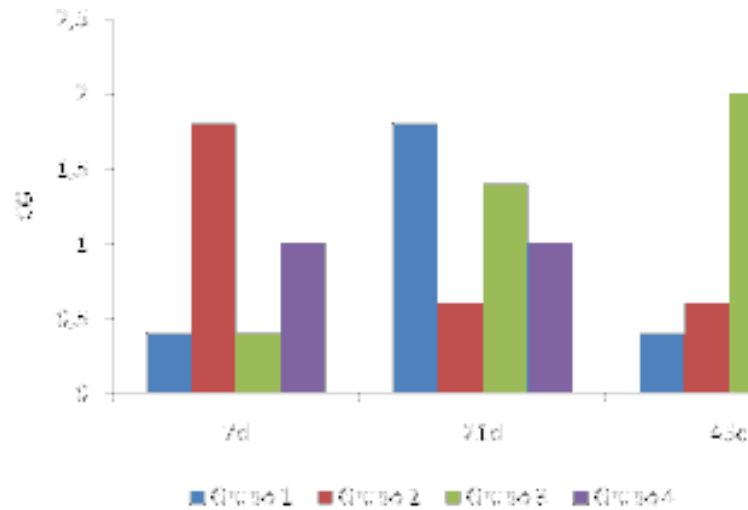


Figura 39 – Demonstração da quantidade de células gigantes nos três períodos testados.

A eficiência cicatricial, e possível isolamento do componente agressor, foram avaliados pela presença de condensação fibrosa peritubular e presença de miofibroblastos. Os dados de escore para cada grupo e sua respectiva análise estatística são sumarizados na Figura 40.

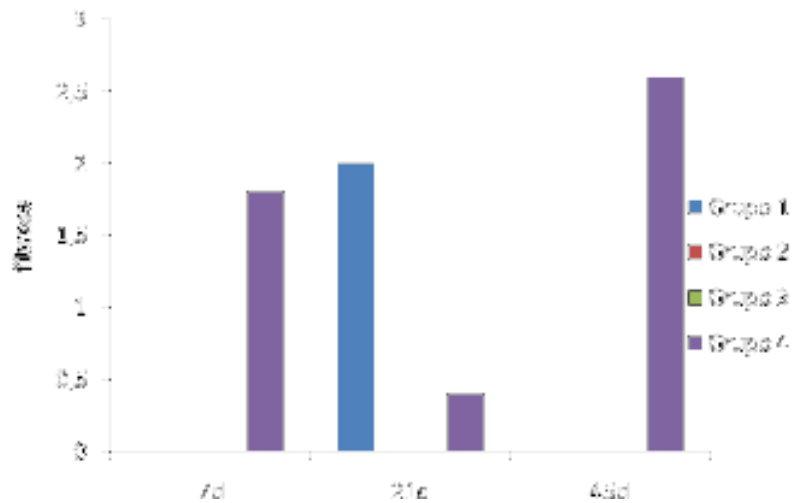


Figura 40 - Apresenta a quantidade de fibrose nos diferentes grupos e períodos.

A presença de miofibroblatos coincidiu com a deposição e condensação fibrosa. Os grupos controle e II revelaram intensa quantidade de miofibroblastos, identificando menor poder citotóxico do material AH Plus em relação aos demais. Efeito contrário parece exibir o material Epiphany. Esse material exibiu intensa quantidade de miofibroblastos difusos em tecido de granulação, promovendo apenas angiogênese. No entanto, escasso número deste conteúdo celular foi observado na região peritubular, revelando retardo no processo de reparo quando o Epiphany foi utilizado. Esses resultados, bem como as semelhanças e diferenças estatísticas, são sumarizadas na Figura 41.

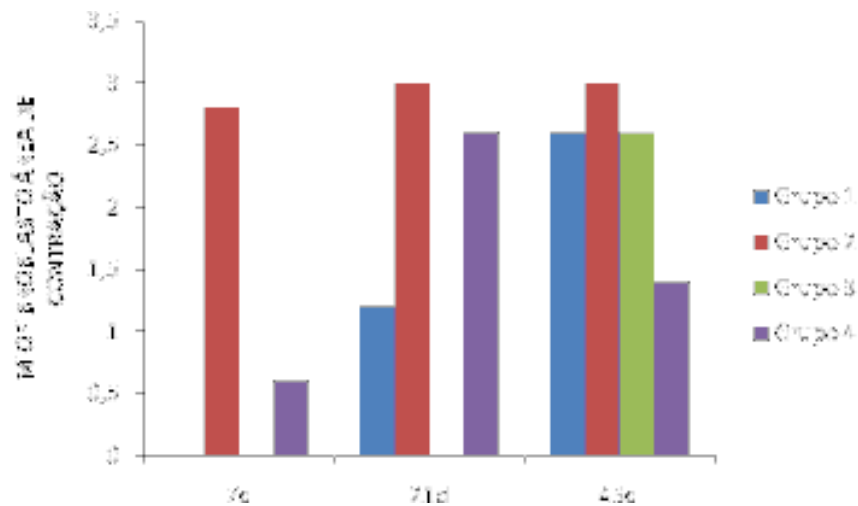


Figura 41 – Demonstra a quantidade de miofibroblastos nos diferentes grupos testados e nos diferentes períodos.

6. DISCUSSÃO

Para o estudo de um determinado material ser considerado importante, ele deve passar por algumas fases. A aplicação de teste *in vitro*, para avaliar a citotoxicidade dos materiais, é de extrema importância, pois se o material testado demonstrar bons resultados será encaminhado para testes *in vivo*, a fim de verificar sua biocompatibilidade e, posteriormente, sua aplicação clínica.

A avaliação da citotoxicidade dos materiais é de grande importância pois influenciam conseqüentemente na biocompatibilidade. Dano citotóxico não leva necessariamente à morte celular, porém, a outro evento observável *in vitro* ou *in vivo* (Brzovic et al., 2008).

Brackett et al. (2008), em seu estudo concluiu que testes de citotoxicidade revelam aspectos de comportamento biológico, porém, ensaios clínicos adicionais devem ser usado para confirmar estes resultados.

Segundo Khashaba et al. (2009), a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos possui uma importância particular devido ao contato direto com os tecidos periapicais, devido a degradação destes materiais causando então efeitos adversos.

Diferentes métodos, têm sido descritos avaliando a biocompatibilidade dos materiais endodônticos. Yesilsoy et al. (1988) preconizaram a injeção de materiais a serem testados diretamente no interior de tecidos subcutâneos dos animais para teste. Contudo, outros estudos recomendam uso de implantes de teflon e tubos de polietileno em tecidos subcutâneos ou em tecido ósseo dos animais de laboratório (Zmener et al., 1988, Molloy, 1992, Pertot et al., 1992, Kolokouris et al., 1998). O tubo de polietileno serve de carregador do material devido à sua biocompatibilidade, já que causa ação irritante insignificante, sendo que, a reação que o grupo controle demonstrou, no presente estudo, foi do trauma causado pelo ato cirúrgico. Esta técnica tem a

desvantagem do excesso de extravasamento do cimento causando diferentes reações no mesmo período de tempo, razão pela qual, uma das extremidades dos tubos foi selada. Neste estudo, de acordo com Economiades et al., (1995), outra possibilidade de falhas nesta metodologia é em relação ao diâmetro do tubo que está diretamente ligado ao extravasamento do material em subcutâneo de ratos; devido a este fato, o diâmetro escolhido neste estudo foi de 1,2mm, sendo considerado um tamanho médio onde não ocorre este tipo de extravasamento e também não limita a área a ser analisada.

A biocompatibilidade dos cimentos obturadores é um requisito importante porque o componente tóxico presente nestes materiais pode produzir irritação ou até mesmo a degeneração dos tecidos circundantes, especialmente quando acidentalmente extravasados nos tecidos periapicais (Huang et al., 2005). Além disso, seu efeito irritante aumenta sendo que quanto maior o volume de excesso de material prolongado, maior a superfície de contato entre o cimento e o tecido, e conseqüentemente maior a intensidade do dano químico (Siqueira, 2005).

O efeito irritante dos materiais endodônticos tem sido avaliado por meio de análise histopatológica que avaliam respostas teciduais aos materiais implantados.

Neste estudo não foi cogitado a injeção direta dos materiais no subcutâneo de ratos, devido à algumas dificuldade posteriores, como na hora do exame macroscópico, e histológico porque o material se espalha no tecido dificultando a leitura das lâminas, além do mais, excesso de material poderia causar reações indesejáveis que não mimetizassem as reações ocasionadas na clínica. A técnica empregada com os tubos de polietileno no conjuntivo de ratos foi selecionada devido à sua ampla utilização em diversos trabalhos onde se testaram a biocompatibilidade dos materiais.

Os animais mais utilizados para estes estudos são os ratos, (Economiades et al., 1995; Erasquin et al., 1970; Holland et al., 1971; Holland et al., 1973; Kolokouris et

al., 1988; Leal et al., 1988; Mittal et al., 1995; Olsson et al., 1981; Ostarvik et al., 1988; Valera et al., 1998), por serem animais considerados calmos, com um custo viável para tais estudos, e de tamanho adequado para inserção de tubos e dos materiais a serem testados.

Em relação aos cimentos, que foram empregados Endofil, AH Plus, Acroseal e Epiphany, o Endofil (Grupo I) é um cimento à base de óxido de zinco e eugenol, sua manipulação é crucial em relação à sua biocompatibilidade, devido à formação de uma matriz de eugenolato de sódio que, mesmo após a presa, apresenta 5% da quantidade de eugenol livre, onde acredita-se que seja a causa de reações indesejáveis aos tecidos periapicais (Molnar, 1967). Cimentos a base de óxido de zinco e Eugenol exercem efeitos citotóxicos e são considerados irritantes aos tecidos periapicais (Kolokouris et al., 1998), que também tem demonstrados inflamação persistente e reabsorção óssea in vivo (Souza et al., 2004)

No grupo I, observou-se componente inflamatório agudo (neutrófilos) leve. Excetuando-se o intervalo de 7 dias, os grupos I, II e III, tiveram comportamento similar quanto à presença de infiltrado agudo, não destacando diferenças estatísticas entre esses grupos 21 dias após o uso. O grupo I apresentou quantidade de edema significativo em 7 dias, diminuindo gradativamente nos períodos posteriores, demonstrando no período de 45 dias uma ausência de edema, o que é corroborado por Scarparo et al. (2009), onde observou-se também a presença de neutrófilos associado ao cimento Endofil, mesmo após o período de 7 dias, prolongando então a presença do processo agudo.

Além do eugenol, que apresenta atividade antimicrobiana, efeito analgésico e propriedade anti-inflamatória, os íons de zinco parecem constituir propriedade importante na formulação final do composto, principalmente no que se refere à atuação potencializadora da ação antimicrobiana. Embora a atividade séptica seja um fator no

critério de um cimento ideal, relatos na literatura descrevem que a presença de íons de zinco pode causar um efeito indesejado, especialmente desencadeando efeito tóxico (Molnar, 1967). Meryon e Jakeman (1985) demonstraram que, 14 dias após tratamento endodôntico, o cimento à base de óxido de zinco e eugenol continua liberando um percentual deste metal na forma iônica, o que representa demasiado poder citotóxico. Desta forma, se ocorrer extravasamento do material nos tecidos periapicais, isto pode desencadear uma difusão do eugenol livre e ou zinco exercendo propriedade deletéria no processo de reparo periapical. O comportamento, quanto à inflamação linfoplasmocitária, entre os grupos I, II, III e IV foi heterogêneo, havendo similaridades estatísticas entre I e II, os quais apresentaram escores de maior valor em relação aos grupos III e IV. Esses últimos revelaram comportamento citotóxico/biocompatível de intensidade análoga. O grupo I, apresentou uma alta quantidade de infiltrado linfoplasmocitário nos períodos de 7 e 45 dias, como demonstraram também outros autores (Yesilsoy et al., 1988; Hume, 1984; Holland et al., 1973).

Baseado nesta assertiva, Hume (1988) descreve que a ação tóxica do material é variável. O autor conclui que quando o cimento age em contato direto com o tecido pulpar vivo, a quantidade de eugenol liberada é maior, quando comparado ao contato direto em superfície dentinária, culminando em agressões, muitas vezes, irreversíveis às células. Lee et al., (2007), analisou o Eugenol em atividades com o Osteoblastos que são células que ajudam no reparo ósseo, e obteve como resultado que o uso do eugenol pode colaborar com o estado de patogenicidade da periodontite apical. Segundo, Jovanovic et al. (2007), complicações como osteonecrose causado pelo eugenol livre é raro, porem possível.

O eugenol também pode reagir com radicais livres muito mais rápido do que os fosfolípidos, os antioxidantes apresentados em células vivas (Fugisawa et al., 2002). O

eugenol é considerado em vários estudos como um agente anti-inflamatório (Raghavenra et al., 2006; Kim et al., 2003) e esta propriedade pode ter sido atribuída devido ao fato de que esta substância participa na indução de COX2 em osteoblastos (Allan et al., 2001).

Em relação ao componente macrofágico, Oliveira Mendes et al., (2003), avaliaram os efeitos do óxido de zinco e eugenol, e concluíram que eles não interferem com a viabilidade dos macrófagos, mas sim na aderência e potencial de fagocitose, que foram afetados. Neste estudo pode-se observar semelhança estatística dos grupos II, III e IV, e apenas o Endofil (grupo I), apresentou um excesso de macrófagos.

No que se refere à necrose, o Endofil demonstrou indícios apenas no período de 7 dias, demonstrando também ausência de fibrose neste período. Em sete dias pós-operatórios, somente o grupo II apresentou condensação fibrosa, enquanto os grupos I e IV apresentaram em 21 dias, e o grupo III, só apresentou arcabouço fibroso após 45 dias pós-operatório. No estudo de Perassi et al. (2008), foi encontrado no cimento Endofil uma camada de células necróticas no período de 7 dias, sendo que, no período mais tardio da pesquisa que foi de 50 dias houve uma diminuição destas células nos outros cimentos testados (EndoRez, Sealapex e Poliquill) e apenas no Endofil e no EndoRez houve persistência de leve infiltrado inflamatório com presença de fina cápsula fibrosa e delgada faixa de tecido amorfo na abertura do tubo.

Segundo alguns autores, todos os cimentos a base de óxido de zinco e eugenol não são favoráveis no que se refere à biocompatibilidade (Barbosa et al., 1993; Yesilsoy et al., 1988), sendo que, quando eles entram em contato com o tecido úmido apresenta comportamentos desfavoráveis, elevando os níveis tóxicos (Wilson et al., 1970). No estudo de Perassi et al. (2008), aos 7 dias, verificou-se que a cápsula fibrosa ao redor do Endofil, apresentava-se menos organizada, com presença de polimorfonucleares, em

sua maior parte em degeneração. No tecido conjuntivo adjacente, observou-se infiltrado inflamatório moderado com presença de mononucleares, sendo que neste estudo notou-se ausência de um conjuntivo organizado, que exibisse condensação fibrosa, sendo notada também a presença de miofibroblastos esparsos de forma difusa ao tecido inflamatório granulomatoso, mimetizando área de neoangiogênese.

Segundo Gabbiani et al (2003), os miofibroblastos representam fatores importantes na reconstrução fisiológica do tecido conjuntivo após ferimento e nas deformações do tecido patológico que caracterizam a fibrose.

Neste estudo, o grupo II que representa o cimento AH Plus, apresentou resposta tecidual considerável em relação à biocompatibilidade, como também demonstraram diversos trabalhos na literatura (Almeida, 1997; Leonardo et al., 1999a; Azar et al., 2000; Souza et al., 2006). Leonardo et al., (2003), realizaram uma pesquisa onde verificaram que este material é biocompatível com os tecidos apicais e periapicais, demonstrando também formação de tecido mineralizado e falta de inflamação, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo.

Scarparo et al. (2009), demonstraram que o cimento AH Plus exibiu infiltrado inflamatório semelhante quando comparado com o grupo controle, após períodos mais longos, o que também é reforçado por outros estudos (Souza et al., 2006; Zafalon et al., 2007). A tendência do processo inflamatório ser reduzido durante o período experimental foi observada. No entanto, ele não apresentou uma redução estatisticamente significativa em linfócitos e plasmócitos em períodos diferentes, como apresentado também neste estudo (Scarparo et al., 2009).

A reação inflamatória foi diminuindo gradativamente em relação aos períodos utilizados. Autores concluem que isto ocorre devido a um maior tempo de presa do AH Plus (Grossman, 1976; Orstavik e Mijor, 1988). Por outro lado, outros autores

demonstram que esta reação inicial deve-se às aminas, presentes na composição do AH Plus, que aceleram a polimerização (Zmener et al., 1997).

O cimento Ah Plus, demonstrou uma severa quantidade de miofibroblastos, como revelou o grupo controle, identificando um menor poder citotóxico do material em relação aos demais testados. Efeito contrário parece evidenciou o material Epiphany, pois este material exibiu uma quantidade severa de miofibroblastos em tecido de granulação promovendo intensa angiogênese. Entretanto, um escasso número deste conteúdo celular foi observado na região peritubular, revelando retardo no processo de reparo quando Epiphany foi utilizado.

Esta reação do cimento Epiphany pode ser explicada pelo dispositivo de mistura, do sistema que, apesar da proposta do fabricante não promove a perfeita homogeneização de seus componentes, podendo ser este um dos fatores prejudiciais que afeta diretamente a biocompatibilidade deste cimento. Porém, autores acreditam que o Epiphany contém vários compostos que podem ser considerados de alto potencial citotóxico antes das primeiras 24 horas, devido à ação dos monômeros, à base de metacrilato liberados na reação da polimerização (Merdad et al., 2007). No entanto, há controvérsias devido à liberação de íons cálcio deste cimento, fazendo que ocorra um aumento no ph causando efeitos bioquímicos que culminam na aceleração do processo de reparo (Seux et al., 1991). No estudo de Gambarini et al., (2009), os autores analisaram a citotoxicidade através de fibroblastos semeados e cultivados, demonstrando que o cimento Epiphany foi considerado biocompatível com resultados semelhantes ao cimento de óxido de zinco e eugenol tradicional, e não obtendo diferenças estatísticas do grupo controle.

Mathias-Junior et al (2009), realizaram um estudo analisando a espectrometria de absorção atômica da água no teste de solubilidade e demonstraram significativa

liberação de íons cálcio, resultado esperado por apresentar estes componentes na composição de Epiphany o que pode explicar a redução da Periodontite apical (Shipper et al, 2005) e biocompatibilidade intra óssea (Souza et al., 2006).

No estudo de Campos-Pinto et al., (2008), no período de 7 dias observou tecido conjuntivo que apresentou ligeira reação inflamatória crônica, predominantemente formados por linfócitos e vasos sangüíneos. Escassez de leucócitos e neutrófilos, pequenos focos de necrose, macrófagos e células de tipo corpo estranho também foram notados, diferenciando este estudo neste período, o cimento Epiphany induziu a presença de um infiltrado inflamatório agudo e crônico, predominantemente neutrofílico e linfo-plasmocitário difuso aos cortes histológicos analisados. No período de 21 dias houve uma ligeira reação inflamatória crônica, predominantemente linfocitária. No corpo estranho e células gigantes multinucleadas macrófagos foram observados.

O Acroseal demonstrou reações não muito favoráveis em relação à biocompatibilidade. Este cimento parece ter menor solubilidade do que outros cimentos a base de hidróxido de cálcio, provavelmente por causa de seus componentes como a resina epóxica (Eldeniz et al., 2007a). Este cimento possui capacidade antimicrobiana e induz a formação de tecido duro, quando colocados no sistema de canais radiculares, pH alcalino (Fraga et al., 1996; Safavii e Nichols, 1993) e dissociação de íons cálcio e hidroxila, que tornam o ambiente desfavorável a proliferação bacteriana (Soares et al., 1990; JOE Editorial Board, 2008).

No estudo de Pinheiro et al., (2009), onde analisou a atividade antimicrobiana através de teste em difusão em ágar do cimentos Epiphany, Polifil e Acroseal, e obteve como resultados a não atividade antimicrobiana contra o microrganismos teste do cimento Epiphany e do Polifil e em contrapartida o cimento Acroseal foi eficaz contra o microrganismos (*Enterococcus faecalis*), em relação a formação de uma zona de

inibição do crescimento microbiano. Em nossa pesquisa foi encontrado um resultado em relação a biocompatibilidade semelhante, porém o cimento Polifil que é a base de óxido de zinco e eugenol como o Endofil não demonstrou resultados favoráveis, como o nosso.

Os cimentos contendo hidróxido de cálcio são biologicamente ativos se íons de cálcio e hidroxila são liberados ao longo do tempo (Estrela et al., 1995; Tager et al., 1988). Na formulação o aumento do PH foi mostrado para o cimento se tornar mais bactericida possível, interferindo então com a atividade dos osteoclastos e promovendo uma alcalinização nos tecidos adjacente (Tronstad et al., 1981). Acontece também uma reação com o gás carbônico para formar cristais de carbonato de cálcio, que servem como um núcleo de calcificação, e torna possível a observação de mineralização (Estrela et al., 1995; Seux et al., 1991). Estas atividades biológicas podem explicar os bons resultados clínicos observados com a utilização de alguns cimentos contendo hidróxido de cálcio, que estimulam o fechamento do forame de tecido mineralizado determinando assim o selamento biológico. (Holland et al., 1998; Holland et al., 2003; Tagger e Tagger., 1989).

Gomes-Filho et al., (2008), analisaram o Acroseal e observaram moderada área de necrose e com ligeira área de inflamação, principalmente macrófagos, sendo observado no período de 30 dias uma fina camada de cápsula fibrosa com poucas células inflamatórias crônicas. Deste estudo o que corrobora os resultados o Acroseal teve comportamento similar, diferenciando com o índice de macrófagos.

Os resultados demonstraram que, embora haja contato íntimo de cimentos com o tecido conjuntivo, como ocorre no coto pulpar, por exemplo, para uma agressão de maior intensidade e promoção de inflamação granulomatosa, maior contato por área como o fato de extravasamento, torna-se fundamental.

CONCLUSÕES

- O AH Plus foi considerado o cimento mais biocompatível, sendo menos citotóxico em dorso de ratos, apresentando um maior número de fibras colágenas em um tempo mais reduzido comparado com os outros grupos.
- O cimento que apresentou maior toxicidade foi o Epiphany a qual mostrou persistente inflamação e um tardio encapsulamento do tubo.
- Em ordem crescente de biocompatibilidade, os cimentos testados podem ser ordenados em Epiphany, Acroseal, Endofil e Ah Plus.

REFERÊNCIAS

- Allan NA, Walton RC, Schaeffer MA. Setting times for endodontic sealers under clinical usage and in vitro conditions. *J Endod* 2001;27:421–3
- Ahlberg KM, Tay WM. A methacrylate – based cement used as a root canal sealer. *Int Endod J* 1998; 31(1): 15-21.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Waton J. *Molecular Biology of The Cell*. New York: 1º edição; 1989.
- Almeida WA. Cimentos obturadores de canais radiculares. Avaliação histológica da resposta dos tecidos apicais e perapicais em dentes de cães após biopulpectomia. Estudo da infiltração marginal apical [tese de doutorado]. Araraquara (SP): UNESP; 1997.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard generic biological test methods for materials and device. [ASTM Designation] F: 748-791, 2006.
- Azar NG, Heidari M, Bahrami ZS, Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J Endod* 2000;26(8):462-5.
- Barbosa SV, Araki K, Spangberg LS. Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;75(3):357-61.
- Benatti neto C, *et al.*, Materiais obturadores de canais radiculares: avaliacao do comportamento tecidual das reacoes apicais e periapicais em dentes de caes de alguns produtos comerciais empregados em obturacoes em canais radiculares. *Rev gaúcha odontologia* 1986; 34(5): 376-380.
- Bernacchio RMG. Quantificação de miofibroblastos em tecido cutâneo de ratos submetidos à incisão cirúrgica com lasers de CO2 e diodo, bisturi elétrico e convencional. IPEN (tese) 2007, SP
- Birman EG, Magalhães J. Estudo histopatológico do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos frente a implantes de lamínulas de vidro revestidas por cinco cimentos obturadores de canal. *Rev Faculd Odont São Paulo* 1984; 22(1)
- Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *J Endod* 2006; 32(10):989–92.
- Braga RR, Ferracane JL. Alternatives in polymerization contraction stress management. *Crit Rev in Oral Biol Med* 2004; 15 (3):176–84.

Brackett MG, Marshall A, Lockwood PE, Lewis JB, Messer RLW, Bouillaguet S, Wataha JC. Cytotoxicity of endodontic materials over 6 weeks ex vivo. *Int Endod J* 2008; 41(12): 1072-78.

Brzovic V, Miletic I, Zeljezic D, Mladinic M, Kasuba V, Ramic S, Anic I. In vitro genotoxicity of root canal sealer. *Int Endod J* 2009; 42 (3): 253-63.

Campos-Pinto MMD, De Oliveira DA, Versiani MA, Souza YTCSS, Souza-Neto MD, Perez DEC. Assessment of the biocompatibility of Epiphany root canal sealer in rat subcutaneous tissues. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Rad and Endod* 2008; 105 (5): 77-81.

Cotran RS, Kumar V & Collins T. *ROBBINS: Patologia Estrutural e Funcional*. RJ; Ed Guanabara Koogan; 2000.

Crane DL, Heuer MA, Kaminski EJ, Moser JB. Biological and physical properties of an experimental root canal sealers without eugenol. *J Endod* 1980;6(2):438-45.

Desmouliere A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993;122(1):103-11.

Desmouliere A, Redard I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995;146(1):56-66.

Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G. The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 2004;48(5-6):509-17.

Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Rep Reg* 2005;13(1):7-12.

Economiades N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod* 1995;21(3):122-7

Eldeniz AU, Erdemir A, Kurtoglu F, Esener T. Evaluation of pH and calcium ion release of Acroseal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007a;103(3):e86-91.

Eldeniz AU, Mustafa K, Ørstavik D, Dahl JE.. Cytotoxicity of new resin- calcium hydroxide- and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cell lines. *Int Endod J* 2007b;40(5):329-37.

Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Junior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria, *Braz Dent J* 1995; 6(2): 85-90

Eyden BP. Brief review of the fibronexus and its significance for myofibroblastic differentiation and tumor diagnosis. Ultrastruct Pathol. 1993;17(6):611-22.

Erausquin J; Muruzabal M. Tissue reaction to root canal fillings with plastic cements. Oral Surg Oral Pathol Oral Med 1970; 29 (1): 91-101.

Fraga RC, Siqueira JF, De Uzeda M. *In vitro* evaluation of antibacterial effects of photo-cured glass ionomer liners and dentin bonding agents during setting. J Prosthet Dent 1996;76(5):483-486

Fujisawa S, Atsumi T, Kadoma Y, Sakagami H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. Toxicology 2002; 177(1): 39 –54.

Gabbiani G, Darby IA, Desmouliere A. Normal and Pathologic Soft Tissue Remodeling: Role of the Myofibroblast, with Special Emphasis on Liver and Kidney Fibrosis. Laboratory Investigation 2003; 83(12):1689-707/

Gabbiani G. The Evolution of the Myofibroblast Concept: a Key Cell for Wound Healing and fibrotic diseases. G Gerontol 2004;52(1): 280-282.

Gambarini G, Andreasi-Bassi M, Bolognini G, Testarelli L, Nocca G, Ceccarelli L, Scatena R, Lupi A, Castagnola M. Cytotoxicity of a new endodontic filling material. Aust Endodont J 2003; 29 (1): 17-9.

Gambarini G, Romeo U, Tucci E, Gerosa R, Nocca G, Lupi A, De Luca M, Quaranta M; Gagliani M, Testarelli L. Cytotoxicity of epiphany SE endodontic sealer: a comparative in vitro study. Med Sci Monit 2009; 15(4): 15-8

Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts and wound contraction. J Cell Biol 1994;124(4):401-4.

Grinnell F. Fibroblast-collagen-matrix contraction: Growth-factor signalling and mechanical loading. Trends Cell Biol 2000;10(9):362-5.

Gomes-filho JE. Avaliação histológica da reação do tecido subcutâneo de ratos após a implantação de cimentos endodônticos. (tese de doutorado). Piracicaba (SP)-UNICAMP; 2001.

Gomes-filho JD, Nery MJ, Costa MMTM, Watanabe S, Gomes AC. Reaction of rat connective tissue to a new calcium hydroxide-based sealer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Oral Endod 2008; 106 (2): 71-6.

Grossman LI. Tratamento de canais radiculares. (Trad.S.Bevilacqua). Rio de Janeiro: Atheneu; 1956.

Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. Mol Biol Cell 2001;12(9):2730-41.

Holland R, Souza V, Milanezi LA. Comportamento do tecido subcutâneo de ratos ao implante de tubos de polietileno preenchidos parcial ou totalmente com alguns materiais obturadores de canais. *Revista brasileira de odontologia* 1971; 28(171).

Holland R. et al., Resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao implante de alguns materiais obturadores de canais. *Rev Fac Odont Araçatuba* 1973; 2(2):217 -35.

Holland R, Souza V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endod* 1985;11(12):535-43.

Holland R, Otoboni Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Dezan Junior E. Calcium hydroxide and a corticosteroid-antibiotic association as dressings in cases of biopulpectomy: A comparative study in dogs' teeth. *Braz Dent J* 1998; 9(2): 67–76.

Holland R, Filho JAO, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PFE, Dezan Jr E. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2003; 29(2): 121–124.

Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomaterials* 2002a;23(1):77-83.

Huang FM, Tai KW, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of resin, zinc oxide–eugenol, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J* 2002b; 35(2):153-8.

Huang FM, Tsai CH, Yang SF, Chang YC. Induction of interleukin-6 and interleukin-8 gene expression by root canal sealers in human osteoblastic cells. *J Endod* 2005;31(9):679–83

Ignatowicz L, Kappler J, Marrack P. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* 1996;84(4):521-9.

International Standards Organization. Biological testing of medical and dental materials and device. Geneve (ISO 10993draft), 1991.

International Standard Organization. Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry – Test Methods for Dental Materials. Geneve (ISO 7405 draft), 1997.

Jobim FC, Schwartsmann G, Xavier NL, Uchoa DM, Saciloto M, Chemello N. Expression of MMP-9 and VEGF in breast cancer: correlation with other prognostic indicators. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008; 30(6):342-7.

JOE Editorial Board. Uses of calcium hydroxide: an online study guide. *J Endod* 2008;34:87-84

Jovanovic G, Buric N, Kronic N, Mihajlovic D. Maxillary osteonecrosis caused by toxic effect of zinc-oxide-eugenol paste. *Stomatologia (Mosk)* 2007; 86(2): 47-50.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2004.

Khashaba RM, Chutkan NB, Borke JL. Comparative study of biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers on fibroblasts derived from primary human gingival and a mouse L929 cell line. *Inter Endod J* 2009; 42(8):711-18.

Kilarski WW, Jura N, Gbuwins P. An ex vivo model for function studies of myofibroblasts. *Laboratory Investigation* 2005; 85(5): 643-54.

Kim SS, Oh OJ, Min HY. Eugenol suppresses cyclooxygenase-2 expression in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Life Sci* 2003;73(3):337- 48.

Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Beltes P, Geromichalos GD, Kortsaris AH. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. *Endod Dent Traumatol* 1998;14(4):182-5.

Kolokouris I, Economides N, Beltes P, Vlemmas I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod* 1998;24(2):82-5.

Kumar V, Fausto N. *Robins e Cotran – Patologia, bases patológicas*. São Paulo: Elsevier; 2007.

Leal JM, Holland R, Esberard RM. Sealapex, CRCS, Fill Canal and N Rickert, study of biocompatibility in subcutaneous connective tissue of rats. *Odontol Clin* 1988; 2 (1): 7-14.

Lee YY, Yang SF, Ho WH, Lee YH, Hung SL. Eugenol Modulates Cyclooxygenase-2 Expression Through the Activation of Nuclear Factor Kappa B in Human Osteoblasts. *J Endod* 2007; 33(10):1177-82.

Leonardo MR, Leal JM. *Endodontia. Tratamento de canais radiculares*. São Paulo: Panamericana; 1991.

Leonardo MR, Bezerra da Silva LA, Filho MT, Santana da Silva R. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod* 1999a;88(2):221-5.

Leonardo MR, Silva LAB, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol* 1999b;15:28-32.

Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of cell culture cytotoxicity of five root canal sealers. *J Endod* 2000; 26(6):328-30.

Leonardo MR, Salgado AA, da Silva LA, Tanomaru Filho M. Apical and periapical repair of dogs' teeth with periapical lesions after endodontic treatment with different root canal sealers. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(1):69-74.

Liu R, Pu DM, Cheng YX, Yin L. Expressions of receptor-binding cancer antigen expressed on SiSo cells, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in cervical carcinoma and correlation thereof with the invasion and metastasis of the cancerous tissues. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2007;87(19):1326-9.

Magino, G. Chronic Inflammation. *American Journal of Pathology* 1998; 153 (4).

Mathias-Junior O, Souza-Gabriel AE, Miranda CES, Pécora JD, Silva-Souza YTC, Souza-Neto MD. Solubility of Epiphany Endodontic Sealer Prepared with Resinous Solvent. *J Endod* 2009; 35(5):715-18.

Mazinis E, Eliades G, Lambrianides T. An FTIR study of various endodontic sealers. *J Endod* 2007;33(5):616-20.

Merdad K, Pascon AE, Kulkarni G, Santerre P, Friedman S. Short-term cytotoxicity assessment of components of the Epiphany resin-percha obturating system by indirect and direct contact Millipore filter assay. *J Endod* 2007; 33(1):24-7.

Meryon SD, Jakeman KJ. The effect in vitro of zinc released from dental restorative materials. *Int Endodont J* 1985; 18(3): 191-8.

Miletić I, Anić I, Karlović Z, Marsan T, Pezelj-Ribarić S, Osmak M. Cytotoxic effect of four root filling materials. *Endod Dent Traumatol* 2000;16(6):287-90.

Miletić I, Devčić N, Anić I, Borčić J, Karlović Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH Plus compared during different setting periods. *J Endod* 2005;31(4):307-9.

Mittal M, Chandra S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. *J Endod* 1995;21(12):622-4.

Molnar EJ. Residual eugenol from zinc eugenol compounds. *J Dent Res* 1967; 46(4): 645-9.

Nassri MRG, Lia RCC, Bombana AC. Análise da resposta tecidual de dois cimentos endodônticos. *J Appl Oral Scienc* 2003; 11(1): 9-14.

Oliveira Mendes ST, Ribeiro Sobrinho AP, Carvalho AT, Souza Côrtes MI, Vieira LQ. In vitro evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. *J Endod* 2003;29(2):95-9.

Olsson B, Sliwkowski A, Langeland K. Intraosseous implantation for biological evaluation of endodontic materials. *J endod* 1981; 7 (6): 253-65.

Orstavik D, Mijor IA. Histopathology and x-ray microanalysis of the subcutaneous tissue response to endodontic sealers. *J Endod* 1988;14(1):13-6

Orstavik D. Materials used for root canal obturation:technical, biological and clinical testing. *Endodontic Topics* 2005;12: 25-38.

Perassi FT, Pappen FG, Bonetti-filho I, Leonardo RL, Ykeda F, Ramalho LTO. Estudo morfológico da resposta tecidual a quatro cimentos endodônticos. *Revista de Odontologia da UNESP* 2008; 37(2): 117-124

Pertot WJ, Camps J, Remusat M, Proust JP. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the mandibular bone of rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73(5):613-20.

Phan MD. Biology of Fibroblasts and Myofibroblasts. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:334-7.

Pinheiro CR, Guinesi AS, Pizzolitto AC, Bonetti-Filho I. In vitro antimicrobial activity of Acroseal, Polifil, and Epiphany against enterococcus faecalis. *Brazilian Dental Journal* 2009; 20 (2): 107-111.

Pitt-ford TR. Tissue Reaction to two root canal sealers containing formaldehyde. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60(6):661-5.

Raghavenra H, Diwakr BT, Lokesh BR, Naidu KA. Eugenol—the active principle from cloves inhibits 5-lipoxygenase activity and leukotriene-C4 in human PMNL cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006;74: 23-7

Resende LM, Rached-Junior FJA, Versiani MA, Souza-Gabriel AE, Miranda CES, Silva-Souza YTC, Souza-Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus, Epiphany, and Epiphany SE root canal sealers. *Int Endod J* 2009; 42: 785-93.

Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod* 1993;19:76-78.

Salles AA. Influência do tratamento com E.D.T.A no embricamento de dois cimentos resinosos às paredes dos canais radiculares. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica- Endodontia. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2001.

Scarparo RK, Grecca FS, Fachin EV Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. *J Endod* 2009;35(2):229-32.

Schilder H. Filling root canals in three dimensions. *Dent Clin North Am* 1967;11:723-44.

Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am* 1974;18:269-96.

Schurch W, Seemayer TA, Gabbiani G. The myofibroblast. A quarter century after its discovery. *Am J Surg Pathol* 1998;22(2):141-7.

Schweikl H, Schmalz G, Federlin M. Mutagenicity of the root canal sealer AH Plus in the Ames test. *Clin Oral Investig* 1998;2(3):125-9.

Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol* 1991;36: 117–128

Shahi R, Navarro A, Quach N. Implementing evidence-based decision-making: forming a student extracurricular evidence-based journal club. *J Evid Based Dent Pract* 2006;6(3):209-11.

Shipper G, Teixeira FB, Arnold RR, et al. Periapical inflammation after coronal microbial inoculation of dog roots filled with gutta-percha or Resilon. *J Endod* 2005;31:91–6.

Silva PT, Pappen FG, Souza EM, Dias JE, Bonetti filho I, Carlos IZ, Leonardo RT. Citotoxicity evaluation of four endodontics sealers. *Braz Dent J*. 2008;19(3): 228-231.

Singer II, Kawka DW, Kazazis DM, Clark RA. In vivo codistribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: Immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface. *J Cell Biol* 1984;98(6):2091-106.

Siqueira JF Jr. Reaction of periradicular tissues to root canal treatment: benefits and drawbacks. *Endod Topics* 2005;10:123– 47.

Soares I, Goldberg F, Massone EJ, Soares IM. Periapical tissue response to two calcium hydroxide-containing endodontic sealers. *J Endod* 1990;16:166-169

Souza CJ, Loyola AM, Versiani MA, et al. A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. *Int Endod J* 2004;37:738–48.

Souza CJ, Montes CR, Pascon EA, Loyola AM, Versiani MA. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ and Epiphany root canal sealers. *J Endod* 2006;32(7):656-62.

Stites WE. Protein-protein interactions: interface structure, binding thermodynamics, and mutational analysis. *Chem Rev* 1997; 97: 1233–1250.

Susini G, About I, Tran-hung L, Camps J. Cytotoxicity of Epiphany and Resilon with a root model. *Int Endod J* 2006; 39:940-4.

Tagger M, Tagger E, Kfir A. Release of calcium and hydroxyl ions from set endodontic sealers containing calcium hydroxide. *J Endod* 1988;14: 588–591.

Tagger M, Tagger E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH 26 in monkeys. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5: 139–146.

Tai KW, Huang FM, Chang YC. Cytotoxic evaluation of root canal filling materials on primary human oral fibroblast cultures and a permanent hamster cell line. *J Endod* 2001;27(9):571-3

Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA, Utrilla LS. Effect of different root canal sealers on periapical repair of teeth with chronic periradicular periodontitis. *Int Endod J* 1998;31(2):85-9.

Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. PH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981;7:17-21.

Valera MC, Leonardo MR, Bonetti Filho I. Cimentos endodônticos – selamento marginal apical imediato e após armazenamento de seis meses. *Rev Odonto Univ São Paulo* 1998; 12(4): 355-60.

Versiani MA, Carvalho-Junior JR, Padilha MI, Lacey S, Pascon EA, Sousa-Neto MD. A comparative study of physicochemical properties of AH Plus and Epiphany root canal sealants. *Int Endod J* 2006;39(6):464-71

Yesilsoy C, Koren LZ, Morse DR, Kobayashi C.. A comparative tissue toxicity evaluation of established and newer root canal sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;65(4):459-67

Waltimo TM, Boiesen J, Eriksen HM, Ørstavik D. Clinical performance of 3 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Oral Endod* 2001;92(1):89-92

Wilson AD, Batchelor RF. Zinc oxide-eugenol cements: II. Study of erosion and disintegration. *J Dent Res* 1970;49:593-8.

Wong MEK, Hollinger JO, Pinero GJ. Integrated processes responsible for soft tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1996; 82(5): 475-92.

Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated T cell epitopes within a single protein. *J Immuno*1995;155.

Zafalon EJ, Versiani MA, de Souza CJ, Moura CC, Dechichi P. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod* 2007;103:88 –94.

Zmener O, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Biocompatibility of two calcium hydroxide-based endodontic sealers: a quantitative study in the subcutaneous connective tissue of the rat. *J Endod* 1988; 14(5):229-35

Zmener O, Spielberg C, Lamberghini F, Rucci M. Sealing properties of a new epoxy resin-based root-canal sealer. *Int Endod J* 1997; 30 (5): 332-4

Zmener O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod* 2004;30(5):348-51.