



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**WALDÉCIO DOS SANTOS VITA**

**DINÂMICA DA FORMAÇÃO DE COMPONENTES DA  
MATRIZ CONJUNTIVA EXTRACELULAR EM TORNO DE  
MATERIAIS RETROBTURADORES IMPLANTADOS EM  
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

Feira de Santana-Ba  
2012

**WALDÉCIO DOS SANTOS VITA**

**DINÂMICA DA FORMAÇÃO DE COMPONENTES DA  
MATRIZ CONJUNTIVA EXTRACELULAR EM TORNO DE  
MATERIAIS RETROBTURADORES IMPLANTADOS EM  
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da  
Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos  
Co-Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Feira de Santana, Ba  
2012

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pois sua presença em minha vida se traduz em fé e força para que eu possa superar todos os obstáculos.

À minha amada esposa Karine Vita, por preencher minha vida com paz, compreensão, apoio e amor.

Ao Prof. Dr. Eduardo Ramos pela orientação, confiança e amizade que sempre estiveram presentes nesta jornada.

Ao Prof. Dr. Mitermayer Galvão, pelo incentivo e apoio para a realização desta pesquisa.

Às Técnicas Ana Carvalho e Cristina Vasconcelos, pelo apoio laboratorial durante a realização das técnicas de HE, Picrosirius, Von Kossa e Imunofluorescência Indireta.

A todos os funcionários do laboratório de Histopatologia do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, em especial a Claudia, Elmir e Márcio pelo apoio técnico durante a realização da histotecnologia.

A todos do Laboratório de Patologia Biomolecular (LPBM), em especial a Eliana e Telmira, pela gentileza de dispor alguns reagentes, quando necessário, para realização deste trabalho.

À Plataforma de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, em especial a Adriana e Cláudio que sempre estiveram à disposição de me ajudar durante a realização das fotomicrografias das lâminas desta pesquisa.

A Cleiton (LPBM), que teve papel importante na orientação e empenho administrativo durante as cotações e compras dos reagentes e anticorpos para realização desta pesquisa.

Ao Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana, em especial ao veterinário Orestes e ao funcionário Júnior, que na fase inicial desta pesquisa ajudaram na realização dos procedimentos cirúrgicos experimentais.

À Fapesb, pelo apoio financeiro regular concedido a essa pesquisa.

Aos funcionários do Biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, em especial à veterinária Rejane, pelo manejo e cuidados com os animais experimentais.

A todos os professores deste programa, que colaboraram na obtenção dos conhecimentos necessários para realização desta pesquisa e para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (Fiocruz-Ba), pelo apoio em todas as fases desta pesquisa, pois, do contrário, esta não poderia ter sido realizada. Em todos os laboratórios desta instituição, sempre fui bem recebido e a ajuda estava sempre disponível, quando necessária.

A Théo Santos, pelas discussões científicas e apoio na organização e aplicação dos testes estatísticos.

A Helton Carneiro, secretário do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da UEFS, pela assessoria técnico-administrativa.

À empresa Ângelus, na aquisição do MTA cinza, material retrobturador usado nesta pesquisa.

À empresa Vigodent, na aquisição dos pincéis descartáveis utilizados para obtenção dos tubos de polietileno.

## RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar as alterações dos componentes da matriz conjuntiva extracelular em torno de dois materiais retrobturadores, MTA e Sealapex Consistente (SC), implantados no tecido subcutâneo de ratos, pesquisando a expressão, pela imunofluorescência indireta (IFI), de fibronectina, laminina, colágeno tipo III e tipo I. Também foi avaliada a reação histomorfológica e a capacidade de mineralização desses materiais através das técnicas de coloração H&E, PIFG e Von Kossa. Foram utilizados 24 ratos distribuídos em dois protocolos. Para o estudo dos colágenos e glicoproteínas, pela IFI, foram utilizados seis ratos distribuídos em três grupos, SC, MTA e tubo vazio (controle) e período de observação de sete e 90 dias. Para o protocolo de estudo em cortes histológicos, foram utilizados 18 ratos, divididos em grupo de seis animais, para cada material, nos períodos de sete, 60 e 90 dias. A resposta do tecido conjuntivo em contato com os materiais foi avaliada de forma descritiva e semi-quantitativa através de escores (0=ausente; 1=discreto; 2=moderado; 3=intenso), analisando-se a inflamação, tecido de granulação, fibrose e calcificação. Na comparação entre os pontos de avaliação, o grupo do MTA apresentou maior inflamação com sete dias, quando comparado com 60 dias ( $p=0,0360$ ); o grupo Sealapex Consistente apresentou mais tecido de granulação com sete dias, quando comparado com 60 dias ( $p=0,0321$ ). Quanto à calcificação, em todos os grupos experimentais foram observadas granulações Von Kossa positivas em todos os períodos experimentais. No grupo Sealapex Consistente, a calcificação foi mais evidente com sete dias, comparando-se com 60 dias de evolução ( $p=0,0217$ ). Não foi observada diferença estatística na imunomarcagem das glicoproteínas e colágenos estudados, quando comparada entre os grupos e entre os períodos de observação. Após análise dos resultados, concluímos que, com o passar do tempo, os materiais provocaram o mesmo tipo de reação tecidual, ambos promoveram calcificação e fibrose, houve redução de expressão de fibronectina, aumento de laminina, colágeno tipo III e tipo I.

Palavras Chaves: Agregado de Trióxido Mineral (MTA). Biocompatibilidade. Matriz Extracelular. Sealapex. Reparo.

## ABSTRACT

The objective of this research was to study the changes in the components of ECM around two retro filling materials, MTA and Consistent Sealapex (SC), implanted in the subcutaneous tissue of rats, researching the expression, by indirect immunofluorescence (IFI), the presence of fibronectin, laminin, collagen, type III and type I. It was also evaluated the histological reaction and the ability of mineralization of these materials through the staining techniques of H&E, PIFG and Von Kossa. 24 rats were distributed in two protocols: For the study of collagens and glycoproteins, using IFI, six rats were placed in groups of three animals for each experimental material, SC, MTA and control during the periods of seven and 90 days. The histological protocol was done in 18 rats, divided in groups of six animals sacrificed in seven, 60 and 90 days of experiment. The response of the connective tissue in contact with the materials was evaluated in a descriptive and semi-quantitative ways and through the scores (0 = absent; 1= discreet; 2= moderate; 3 = intense), analyzing the inflammation, granulation tissue, fibrosis and calcification. The comparison between the different periods of study, the MTA group showed greater inflammation in seven days than in 60 days ( $p=0.0360$ ), the Consistently Sealapex groups showed more granulation tissue between 7 and 60 days ( $p=0.0321$ ). As the calcification, in all experimental groups it was observed positive granulations Von Kossa in all experimental periods. In the Group Consistent Sealapex calcification was more evident in 60 days when compared to seven days ( $p= 0.0217$ ). Statistical differences were not observed in immunolabeling of glycoproteins and collagens, when compared between groups and between the periods of observation. After analysis of the results we conclude that, during the experimental time, the materials caused the same kind of histological reaction, both promoted calcification and fibrosis, there was a reduction of expression of fibronectin, increase of laminin, collagen type III and type I.

Keywords: Mineral Trioxide aggregate (MTA). Biocompatibility. Extracellular Matrix. Sealapex. Repair.

## LISTA DE FIGURA

- Figura 1** Tubos de polietileno obtidos a partir de pincéis descartáveis. 52
- Figura 2** Sequência do procedimento cirúrgico. (A) Tricotomia e antissepsia da pele com PVPI; 57  
(B) Incisão da pele e divulsão do tecido celular subcutâneo; (C) Implantes do tubo com o material experimental ou tubo vazio no espaço divulsionado; (D) Sutura da loja cirúrgica com fio de nylon nº 5.
- Figura 3** **Fotomicrografia da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo controle (tubo vazio) – 7 dias.** (A=10x; B=200x; C=400x; HE) parede conjuntiva contendo grau discreto de infiltrado inflamatório crônico e grau discreto de tecido de granulação, observa-se formação de novos vasos. (D=100x; E=200x; PIFG), presença de tecido conjuntivo fibroso em grau discreto próximo à abertura do tubo. (F=200x; VK), ausência de granulações Von Kossa positiva próximas à abertura do tubo. 65
- Figura 4** **Fotomicrografia da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo Sealapex Consistente – 7 dias.** (A=10x; B=200x; C=400x; HE), presença de infiltrado inflamatório crônico em grau discreto e de tecido de granulação também em grau discreto. (D=100x; E=200x; PIFG), presença de tecido conjuntivo fibroso em grau moderado. (F=200x; VK), granulações Von Kossa positiva em grau discreto. 67
- Figura 5** **Fotomicrografia da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo MTA – 7 dias.** (A=10x; B=200x; C=400x; HE), presença de inflamação crônica e tecido de granulação em grau discreto. (D=100x; E=200x; PIFG), presença de tecido conjuntivo fibroso em grau discreto. (F=200x; VK), granulações Von Kossa positiva em grau discreto. 69
- Figura 6** **Fotomicrografia da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo controle (tubo vazio) – 60 dias.** (A= 10x; B=200x; C=400x; HE), ausência de inflamação e presença de tecido de granulação em grau discreto. (D=100x; E=200x; PIFG), parede fibrosa evidenciando matriz colagênica em grau discreto. 71
- Figura 7** **Fotomicrografia da reação do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao implante do grupo Sealapex Consistente – 60 dias.** (A=10x; B=200x; C=400x; HE), infiltrado inflamatório mononuclear em grau discreto e tecido de granulação também em grau discreto, com redução do número de vasos. (D=100x; E=200x; PIFG), parede fibrosa, evidenciando-se matriz colagênica em grau moderado. (F= 200X;VK). Próximo à área de contato com o material, observaram-se granulações Von Kossa positiva em grau 73

moderado.

- Figura 8 Fotomicrografia da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo MTA – 60 dias.** (A=10x; B=200x; C=400x; HE), inflamação crônica em grau discreto com predomínio de macrófago e tecido de granulação também em grau discreto, próxima à área ocupada pelo material. (D=100x; E=200x; PIFG), presença de parede fibrosa em grau moderado. (F=200x; VK), granulações Von Kossa positiva em grau discreto, próximas à abertura do tubo. 75
- Figura 9 Fotomicrografia da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo controle (tubo vazio) – 90 dias.** (A=10x; B=200x; C=400x; HE), próximo à abertura do tubo, observou-se infiltrado inflamatório crônico em grau discreto com diminuição do número de vasos sanguíneos. (D=100x; E=200x; PIFG), presença de parede fibrosa evidenciando-se matriz colagênica em grau moderado. ( F=200x; VK), ausência de granulações Von Kossa positiva. 77
- Figura 10 Fotomicrografia da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo Sealapex Consistente – 90 dias.** (A=10x; B=200x; C=400x; HE), material exógeno dentro da parede fibrosa, apresentando infiltrado inflamatório crônico em grau discreto e presença de tecido de granulação também em grau discreto. (D=100x; E= 200x; PIFG), presença de parede fibrosa em grau discreto. ( F=200x; VK), granulações Von Kossa positiva em grau discreto. 79
- Figura 11 Fotomicrografia da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo MTA – 90 dias.** ( A=10x; B=200x; C=400x; HE), presença de infiltrado inflamatório crônico em grau discreto, assim como o tecido de granulação. ( D=100x; E=200x; PIFG), parede fibrosa, apresentando matriz colagênica em grau discreto. (F=200x,VK), presença de granulações Von Kossa positiva em grau discreto. 81
- Figura 12 Fotomicrografia da imunofluorescência indireta da matriz conjuntiva extracelular em torno de materiais retrobturadores implantados no tecido subcutâneo de ratos nos períodos de sete e 90 dias: Análise da fibronectina** Imunofluorescência com rabbit polyclonal antibody to human fibronectin e goat anti-mouse igG Dylight488 (verde). Grupo controle (TV): (A) grau de intensidade moderado; (B) grau de intensidade discreto. Sealapex Consistente (SC): ( C) grau de intensidade moderado; ( D) grau de intensidade discreto. MTA: (E) grau de intensidade moderado; (F) grau de intensidade discreto. 84

- Figura 13** Fotomicrografia da imunofluorescência indireta da matriz conjuntiva extracelular em torno de materiais retrobturadores implantados no tecido subcutâneo de ratos nos períodos de sete e 90 dias: Análise da laminina. Imunofluorescência com polyclonal rabbit anti-Laminin e goat anti-mouse igG Dylight488 (verde). Grupo controle (TV): (A) grau de intensidade moderado; (B) grau de intensidade discreto. Sealapex Consistente (SC): ( C) grau de intensidade discreta; ( D) grau de intensidade moderado. MTA: ( E ) grau de intensidade moderado; ( F ) grau de intensidade intenso. 86
- Figura 14** Fotomicrografia da imunofluorescência indireta da matriz conjuntiva extracelular em torno de materiais retrobturadores implantados no tecido subcutâneo de ratos nos períodos de sete e 90 dias: Análise do colágeno tipo III. Imunofluorescência com rabbit I antibody to rat collagen type III e goat anti-mouse igG Dylight488 (verde). Grupo controle (TV): ( A e B) grau de intensidade moderado. Sealapex Consistente (SC): (C e D) grau de intensidade discreto. MTA: (E) grau de intensidade discreto; ( F) grau de intensidade moderado. 88
- Figura 15** Fotomicrografia da imunofluorescência indireta da matriz conjuntiva extracelular em torno de materiais retrobturadores implantados no tecido subcutâneo de ratos nos períodos de sete e 90 dias: Análise do colágeno tipo I. Imunofluorescência com rabbit antibody to rat collagen, type I e goat anti-mouse igG Dylight488 (verde). Grupo controle (TV): (A e B) ausência de expressão de colágeno tipo I. Sealapex Consistente (SC): (C) grau de intensidade discreto; (D) grau de intensidade intenso. MTA: (E) grau de intensidade moderado; (F) grau de intensidade intenso. 90
- Figura 16** Representação gráfica em escores dos eventos histomorfológicos analisados no grupo controle (TV) e nos grupos experimentais ( SC– MTA) após período de sete dias. Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa. 94
- Figura 17** Representação gráfica em escores dos eventos histomorfológicos analisados no grupo controle (TV) e nos grupos experimentais (SC–MTA) após período de 60 dias. Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa. 94
- Figura 18** Representação gráfica em escores dos eventos histomorfológicos analisados no grupo controle (TV) e nos grupos experimentais ( SC – MTA) após período de 90 dias. 95

- Figura 19** Representação gráfica em escores dos eventos histológicos analisados, quando comparados entre os períodos de 7, 60 e 90 dias. Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa. 95
- Figura 20** Representação gráfica em escores da marcação pela imunofluorescência indireta dos anticorpos estudados no grupo controle (TV) e nos grupos experimentais ( SC – MTA) após período de 07dias. Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa. 99
- Figura 21** Representação gráfica da marcação pela imunofluorescência Indireta dos Anticorpos estudados no grupo controle (TV) e nos grupos experimentais (SC – MTA) após período de 90 dias. Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa. 97
- Figura 22** Representação gráfica da marcação pela imunofluorescência Indireta das glicoproteínas adesivas (fibronectina e laminina) e proteínas estruturais (colágeno tipo III e I), quando comparadas entre os períodos de 7 e 90 dias. Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa. 98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Anticorpos primários utilizados na análise, pela técnica de Imunofluorescência, da resposta tecidual aos implantes de materiais retrobturadores, em tecido subcutâneo de ratos.	61
--	----

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> Distribuição dos animais e amostras em função dos períodos experimentais e materiais analisados – Protocolo Histológico.	54
<b>Quadro 2</b> Distribuição dos animais e amostras em função dos períodos experimentais e materiais analisados - Protocolo de imunofluorescência indireta.	54
<b>Quadro 3</b> Resultados dos eventos histomorfológicos analisados.	82
<b>Quadro 4</b> Marcação e graduação das proteínas avaliadas utilizando a técnica de imunofluorescência indireta no período de sete dias.	91
<b>Quadro 5</b> Marcação e graduação das proteínas avaliadas utilizando a técnica de imunofluorescência indireta no período de 90 dias.	92

## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\alpha$  - alfa

$\beta$  – beta

AP -1 – Ativador de Proteína 1

BSA – Soro Albumina Bovina

CER - Cimento Endodôntico Rápido

CEUA - Comitê de Ética Uso de Animais

CG – Células Gigantes

CGMIs – Células Gigantes Multinucleadas Inflamatórias

cm – centímetro

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

COX- 2 – Ciclogenase 2

CPM – Cimento Portland Modificado

CPqGM – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

CRCS – Calciobiototic Root Canal Sealer

EBA – Ácido Étoxi Benzoico

FGF – Fator de crescimento dos Fibroblastos

FN - Fibronectina

FNc – Fibronectina Celular

FNp – Fibronectina do plasma

GMTA – Agregado de Trióxido Mineral Cinza

GRT – Reação Tecidual Granulomatosa

g – grama

H&E – Hematoxilina e Eosina

IFI – Imunofluorescência Indireta

IL – Interleucinas

IRM- Intermediate Restorative Material

INOS –Óxido Sintase Induzível

mm – milímetro

MEC – Matriz Extracelular

MPO - Mieloperoxidase

MTA – Agregado de Trióxido Mineral

OZE – Óxido de Zinco e Eugenol  
p – Valor de Probabilidade  
PAF – Fator Ativador das Plaquetas  
PBS – Tampão Fosfato Salino  
PCR – Reação em cadeia da polimerase  
PDGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas  
pH – Potencial Hidrogênio  
PIFG- Picro Sírius Fast Green  
PMN – Polimorfo Nucleares  
PVPI - Polivinil Pirrolidona Iodo  
TGF $\beta$  – Fator de Crescimento  $\beta$  Transformador  
SC – Sealapex Consistente  
TNF – Fator de Necrose Tumoral  
TV – Tubo Vazio  
VEGF – Fator de crescimento Endotelial Vascular  
ZnO – Óxido de Zinco

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	16
2	<b>JUSTIFICATIVA</b>	19
3	<b>HIPÓTESE</b>	19
4	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	20
4.1	CIRURGIA PARENDODÔNTICA	20
4.2	CIMENTOS	21
4.2.1	AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL (MTA)	21
4.2.2	SEALAPEX	30
4.2.3	MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)	38
4.2.4	DINÂMICA DAS FASES DO REPARO	42
5	<b>OBJETIVOS</b>	49
5.1	GERAL	49
5.2	ESPECÍFICO	49
6	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	50
6.1	DESENHO EXPERIMENTAL IN VIVO	50
6.2	CIMENTOS	51
6.2.1	MTA CINZA	51
6.2.2	SEALAPEX	51
6.2.3	SEALAPEX CONSISTENTE	51
6.3	OBTENÇÃO DOS TUBOS	52
6.4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	52
6.5	SELEÇÃO DOS ANIMAIS	52
6.6	GRUPOS EXPERIMENTAIS	53
6.7	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	55
6.8	MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS TECIDUAIS	58
6.9	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	58
6.10	PROCESSAMENTO LABORATORIAL	59
6.10.1	PROTÓCOLO HISTOTÉCNICO PARA CORTES HISTOLÓGICOS	59
6.10.2	CONGELAMENTO DE TECIDO PARA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	60
6.10.3	TÉCNICA DA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA CORTES DE TECIDOS CONGELADOS	61
6.11	ANÁLISE MICROSCÓPICA	62
6.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	63

7	<b>RESULTADOS</b>	64
7.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA E DESCRITIVA DO PROCESSO REPARATIVO E CALCIFICAÇÃO EM TORNO DOS MATERIAIS RETROBTURADORES IMPLANTADOS NO TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS	64
7.2	ANÁLISE DESCRITIVA DA PRESENÇA DE ALGUNS COMPONENTES DA MEC EM CONTATO COM OS MATERIAIS RETROBTURADORES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IFI EM CORTES DE CONGELAÇÃO.	83
7.2.1	FIBRONECTINA	84
7.2.2	LAMININA	86
7.2.3	COLÁGENO TIPO III	88
7.2.4	COLÁGENO TIPO I	90
7.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	93
8	<b>DISCUSSÃO</b>	99
9	<b>CONCLUSÃO</b>	108
10	<b>PERSPECTIVAS</b>	109
11	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	110
12	<b>ANEXOS</b>	117
	ANEXO A – TÉCNICA VON KOSSA	
	ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UEFS	
	ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA FIOCRUZ	

## 1 INTRODUÇÃO

A cirurgia pararendodôntica é um conjunto de procedimentos que tem como objetivo resolver complicações do tratamento endodôntico quando o retratamento falha ou é impossível de ser realizado. A apicectomia com obturação retrógrada é uma modalidade da cirurgia pararendodôntica que envolve a exposição da área, remoção apical da raiz, preparo de uma cavidade e preenchimento com material retrobturador de propriedades físico-químicas e biológicas adequadas. O sucesso definitivo da cirurgia depende da regeneração das estruturas da região periapical, incluindo cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. Após a obturação retrógrada, células mesenquimais participam do processo de cicatrização diferenciando-se em células maduras como fibroblastos, osteoblastos ou cementoblastos (TORABINEJAD; PITT FORD, 1996; SHARI, et al., 2006).

A biocompatibilidade dos materiais retrobturadores abrange vários aspectos do material, incluindo seu potencial citotóxico, alergênico e mutagênico, não devendo apresentar efeitos tóxicos ou causar danos teciduais (COSTA, 2001a). Existe ampla variedade de critérios utilizados na análise histológica para determinação da biocompatibilidade de um material. Dentre eles podemos citar a reação inflamatória em cada período pós-implantação avaliado, a presença de cápsula conjuntiva em torno do implante e a sua capacidade de estimular formação de tecido mineralizado. Outro critério que pode ser utilizado são as modificações da matriz extracelular, porém poucas pesquisas têm dado ênfase a este aspecto, ou seja, avaliar a dinâmica da matriz extracelular (MEC) em torno de materiais retrobturadores.

A MEC representa um ambiente complexo e dinâmico, atuando como um reservatório de fatores de crescimento, controlando a proliferação celular. A constituição básica da matriz é de proteínas fibrosas como o colágeno e elastina, e de glicoproteínas alongadas como a fibronectina e laminina, que têm uma função de proporcionar adesão célula-matriz, além de ácido hialurônico, glicosaminoglicanas e proteoglicanas que formam um leito constituído por um gel, onde se encontram imersos todos os constituintes da matriz. (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PERERIRA, et al., 2005). A reparação do tecido após uma lesão depende da síntese de uma matriz extracelular fibrosa para substituir o tecido perdido ou danificado. A matriz extracelular guia a reparação regulando o comportamento de grandes variedades de

tipos de células que são mobilizadas para a área danificada na reconstrução do tecido. A MEC de tecidos cicatriciais passa, na verdade, por mudanças muito rápidas. A fibrina do tampão, por exemplo, é substituída por fibronectina (FN) e ácido hialurônico, e depois por colágeno III e I. Dentre as mudanças citadas, está a remodelação, ou seja, um conjunto de processos de síntese e degradação de proteínas que permite a substituição do tecido de granulação por cicatriz fibrosa (MIDWOOD; WILLIAMS; SCHWARZBAUER, 2004; RAITZ, 2008).

A região perirradicular normal consiste de diferentes tecidos, incluindo cimento, ligamento periodontal e osso. Logo, o sucesso da cirurgia parodontal, quando se utiliza um material retrobturador, está na dependência do comportamento biológico deste material, ou seja, ele deve permitir ou induzir a regeneração desses tecidos. Quando se realiza a obturação retrógrada, o material retrobturador, além de promover bom selamento, deve permitir a formação de periodonto normal sobre a superfície cortada e obturada da raiz. (SHARI et al., 2010). Assim, o material retrobturador torna-se importante no remodelamento dos tecidos periapicais, atuando nos componentes da MEC, que modulam o crescimento e diferenciação celular tanto na osteogênese (HOLLAND; SOUSA 1985; TANOMARU FILHO et al., 2006; ASGARY; EGHBAL; EHSANI, 2010) como na cementogênese (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993; LUIZ, 2003; BERNABÉ, et al., 2007). A técnica e o tipo de material retrobturador assumem papel importante no sucesso do tratamento cirúrgico. Diversos materiais têm sido utilizados como retrobturadores: amálgama de prata, resina, cimento de ionômero de vidro, óxido de zinco e eugenol, super EBA, MTA e o Sealapex Consistente (GASELLA; FERLINTO 2006; MOTA, et al, 2010).

O Agregado de Trióxido Mineral (MTA) cinza foi desenvolvido na Universidade de Loma Linda (Califórnia, EUA) pelo professor Mahmoud Torabinejad, cujas principais indicações estão relacionadas com a retrobturação e obturação de perfurações radiculares (TORABINEJAD, et al., 1995; LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993). Segundo Holland et al., (2001), após avaliarem a reação do tecido subcutâneo de rato ao implante de tubos de dentina contendo o MTA, cimento de Portland e hidróxido de cálcio, sugerem que o mecanismo de ação do MTA seja semelhante ao do hidróxido de cálcio. A biocompatibilidade do MTA tem sido demonstrada através de reações teciduais (HOLLAND et al., 2001; HOLLAND et al., 2002(b); MENEZES, et al, 2005; BERNABÉ et al., 2007; GOMES FILHO et al., 2009a; GOMES FILHO et al., 2009b; GOMES FILHO, et al., 2011). Apesar das suas excelentes capacidades biológicas, o MTA apresenta algumas desvantagens: questionável atividade antimicrobiana, dificuldade na técnica de manipulação e inserção, potencial de

descoloração e alto preço. Por isso, alguns materiais de custo menor, fácil manipulação, boas propriedades biológicas e físico-químicas têm sido pesquisados.

O Sealapex puro é um cimento à base de hidróxido de cálcio composto por uma pasta base e outra catalisadora, além de pigmentos. Surgiu em 1984 para selamento de canais radiculares, apresentando boas propriedades biológicas e físicas. Seu lançamento teve respaldo biológico no trabalho publicado por Holland & Souza (1885), quando avaliou em canais radiculares de cães e macacos a capacidade deste cimento de induzir a neoformação de tecido duro. Segundo Holland et al 2002(b), devido à presença de óxido de cálcio em sua composição, os autores sugerem que o mecanismo de ação do Sealapex seja semelhante ao do MTA. Entretanto, para o Sealapex ser usado como material retrobturador, deve-se acrescentar óxido de zinco, até que o cimento fique com a consistência de massa de vidraceiro, passando a ser denominado de Sealapex Consistente (LUIZ, 2003; BERNABÉ; HOLLAND,2004; TANOMARU FILHO et al., 2006; LEAL; BAMPA;NETO, 2008; VITA et al., 2008; CUNHA,2011). Além de apresentar biocompatibilidade, o Sealapex Consistente é capaz de estimular a deposição de tecido mineralizado na região periapical (LUIZ, 2003; TANOMARU FILHO et al., 2006).

Os processos de reconstrução dos tecidos lesados, independentemente de ser por reparação ou regeneração, têm sido eventualmente alcançados através da bioengenharia ou engenharia tecidual. Esses dois últimos são empregados, principalmente, quando houver interferência do homem como a colocação de materiais e outros produtos com objetivo de acelerar ou melhorar o processo de reparo tecidual (CONSOLARO, 2009).

Assim, esta pesquisa tem como objetivo avaliar a biocompatibilidade do Sealapex Consistente e MTA, através da análise da reação tecidual ao implante desses dois materiais retrobturadores, utilizando-se dos seguintes critérios histológicos: reação inflamatória, presença de cápsula conjuntiva e de mineralização. Por outro lado, pouco se sabe acerca da dinâmica da formação de diferentes integrantes da MEC em torno de materiais retrobturadores. Portanto, esse trabalho visa também a contribuir, de modo original, para o melhor entendimento do processo reparatório de algumas proteínas da matriz extracelular em torno do MTA e Sealapex Consistente.

## **2 JUSTIFICATIVA**

Com o avanço da biotecnologia, faz-se necessário compreender, através do emprego de novas metodologias, o processo de diferenciação celular, modificações temporárias da matriz extracelular e as reações teciduais provenientes dos materiais retrobturadores. Assim, vamos poder correlacionar os aspectos celulares da matriz ao reparo dos tecidos envolvidos, favorecendo uma estratégia terapêutica. O desenvolvimento de um cimento retrobturador menos oneroso e de biocompatibilidade investigada é de suma importância para a classe odontológica, pois assim os profissionais poderão oferecer um tratamento clínico mais acessível à população. Apesar de alguns estudos avaliando o reparo tecidual na presença de materiais retrobturadores, pouco se sabe sobre a dinâmica da matriz extracelular em contato com estes materiais. Sendo assim, esta pesquisa, sobre a expressão temporal de alguns tipos de colágeno e glicoproteínas da matriz durante o processo de reparo, torna-se importante no entendimento sobre a influência desses materiais nestas macromoléculas.

## **3 HIPÓTESE**

A reação tecidual, as modificações na laminina, fibronectina, colágeno tipo I e tipo III da MEC e a mineralização ocorrem de maneira semelhante no modelo experimental, que envolve implantes de tubos de polietilenos contendo MTA e Sealapex Consistente no tecido subcutâneo de ratos.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 CIRURGIA PARENDODÔNTICA

A cirurgia parendodôntica é o tratamento de escolha quando a resposta do dente ao tratamento endodôntico convencional falha, ou quando ele não pode ser tratado adequadamente por meio de meios não cirúrgicos. O termo cirurgia parendodôntica abrange, de modo geral e preciso, todos os procedimentos cirúrgicos que envolvem as áreas do endodonto ou as raízes dentárias. Como modalidades desta cirurgia podem-se citar: drenagens cirúrgicas, a fistulização artificial, curetagem periapical, apicectomia, apicetomia e obturação retrógrada, tratamento endodôntico simultâneo ao tratamento cirúrgico, tratamento endodôntico via retrógrada, rizectomia parcial, hemisseção dentária, cirurgia de cistos periapicais e reimplante intencional (BERNABÉ;HOLLAND, 2004).

**[S1] Comentário:** Observe que coloquei acento toda vez que essa palavra aparece. Existe, na sua área, o termo retrograda, significando outra coisa? Ou é mesmo retrógrada?

Dentre as várias modalidades cirúrgicas, encontra-se a apicectomia com obturação retrógrada, que consiste na exposição da área envolvida, remoção da porção apical da raiz, seguida do preparo de uma cavidade, e inserção de um material retrobturador, com propriedades físicas, químicas e biológicas adequadas. (TORABINEJAD;PITT FORD, 1996).

**[S2] Comentário:** Ver caso do acento.

Um material retrobturador ideal deve ser biocompatível, aderir ao tecido dental e selar tridimensionalmente a cavidade apical, não permitir e, de preferência, inibir o crescimento de microorganismos patogênicos, ser dimensionalmente estável, ser bem tolerado pelos tecidos e estimular a regeneração da região periapical, permitir ou induzir o reparo ósseo, não ser tóxico, não manchar o dente ou tecido periradiculares, ser facilmente distinguível na radiografia, fácil manipulação e inserção (CHONG;PITT FORD, 2005).

Alguns materiais têm sido empregados como materiais retrobturadores: o amálgama de prata, derivados de óxido de zinco e eugenol (cimento Super EBA® e cimento IRM®), as resinas compostas fotopolimerizáveis, os cimentos de ionômero de vidro, os cimentos à base de hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>] e a guta percha. Porém, apresentam algumas desvantagens, como o cimento IRM® e o cimento Super EBA® que são sensíveis à umidade, são irritantes aos tecidos, apresentam solubilidade e dificuldade de manipulação; já o amálgama de prata sofre infiltração inicial, corrosão secundária, contaminação pelo mercúrio, sensibilidade à umidade e tem necessidade de um preparo retentivo (TORABINEJAD;WATSON;PITT-FORD, 1993).

O material usado na obturação retrógrada está em íntimo contato com o tecido perirradicular, logo é essencial que ele seja biocompatível e tenha a capacidade de permitir ou induzir a regeneração de cimento, ligamento periodontal e osso alveolar.

Segundo Costa 2001, a biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem causar danos ou prejuízo ao mesmo.

## 4.2 CIMENTOS

### 4.2.1 Agregado de Trióxido Mineral (MTA)

O MTA foi desenvolvido em 1993, na Universidade Loma Linda, Califórnia, pelo Dr. Mahmoud Torabinejad, cujas principais indicações estão relacionadas com a retrobturação em cirurgias pararendodônticas e obturação de perfurações radiculares ( BUSATO et al., 1999; CAMILLERI et al., 2005 ; CAMILLERI ;PITT FORD 2006 ; HOLLAND, et al., 1999 ; HOLLAND et al., 2001; HOLLAND et al., 2002b ; MORAES et al., 2006 ; LEE ; MONSEF;TORABINEJAD, 1993; LOPES et al., 2003; PELLICCIONI et al., 2004 ; ASGARY ; EGHBAL;EHSANI, 2010 ; BAEK, et al., 2010 ; MOTA, et al., 2010 ; CINTRA, et al., 2012 ; DREGER, et al, 2012 ; WALIVAARA et al, 2012). Foi lançado no mercado com o nome de ProRoot MTA® (Dentsply, Tulsa Dental, Tulsa, Oklahoma, USA) em 1999, depois de aprovado pela *Food and Drugs Administration* (FDA), em 1998. Em 2001, uma empresa dentária nacional (Ângelus) lançou no mercado brasileiro, com custo inferior, o MTA nacional, concorrendo com Pro-Root MTA da Dentsply. Segundo a bula do fabricante, apresenta em sua composição: Dióxido de Silício (SiO<sub>2</sub>), Potássio (K<sub>2</sub>O), Alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), Óxido de Sódio (Na<sub>2</sub>O), Óxido de ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), Trióxido de Enxofre (SO<sub>3</sub>), Óxido de Cálcio (CaO), Óxido de Bismuto (Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), Óxido de Magnésio (MgO) e resíduos insolúveis (sílica cristalina, óxido de cálcio, sulfato de potássio e sódio).

Atualmente novas pesquisas o têm indicado em diferentes condições clínicas tais como em pulpotomias e capeamento pulpar, como material estimulador da apicificação, como barreira intra-coronária prévia ao clareamento dental, como tampão apical em casos de dificuldades de travamento do cone principal de guta-percha, como cimento endodôntico no tratamento de dentes decíduos e permanentes (TORABINEJAD; CHIVIAN, 1999; HOLLAND et al 2002b; RUIZ, 2003; BERNABÉ; HOLLAND, 2004; FELIPPE, M. C. S; FELIPPE, W. T., ROCHA, 2006; GASELA;FERLITO, 2006; ZARRABI et al, 2010).

Holland et al. (1999) avaliaram a reação do tecido conjuntivo de rato ao implantes de tubos de dentina obturados com MTA ou hidróxido de cálcio. Os animais foram sacrificados após sete e 30 dias e os espécimes foram preparados para estudo morfológico. Alguns espécimes não descalcificados foram preparados para análise com luz polarizada e técnica Von Kossa para cálcio. Os resultados foram similares para ambos os materiais estudados. Notaram que, com o hidróxido de cálcio, havia formação de calcita, birrefringentes à luz polarizada, junto à luz do tubo. Abaixo dessas granulações, formou-se uma ponte de tecido duro Von Kossa positivo. Com o MTA, o mesmo foi observado, notando-se apenas que o número de granulações de calcita era um pouco menor do que o observado com o hidróxido de cálcio e que essas granulações estavam em contato com o material estudado, o que não ocorria com o hidróxido de cálcio. O tecido conjuntivo ao redor dessas estruturas mostrou proliferação de fibroblastos e uma reação inflamatória crônica de leve a moderada, assim como algumas células gigantes. Após 30 dias, as secções não descalcificadas mostraram resultados semelhantes ao de sete dias, granulações birrefringentes e tecido irregular altamente Von kossa positivo. Ao redor destas estruturas, observou-se tecido conjuntivo fibroso com discreta inflamação crônica e algumas células gigantes.

HOLLAND et al., (2001) avaliaram a reação do tecido subcutâneo de rato ao implante de tubos de dentina contendo o Agregado de Trióxido Mineral, cimento Portland e hidróxido de cálcio. Os animais foram sacrificados após sete e 30 dias e os espécimes, não descalcificados, foram preparados para análise histológica com luz polarizada e técnica de Von Kossa para tecidos mineralizados. Os resultados foram similares para os três materiais estudados, com sete e 30 dias. Próximo à abertura dos tubos, foram observadas granulações Von Kossa positivas, birrefringentes à luz polarizada. Próximo a estas granulações, observou-se um tecido irregular na forma de uma ponte, também Von Kossa positivo. As paredes de dentina dos tubos exibiram uma estrutura altamente birrefringente à luz polarizada, no interior dos túbulos, formando uma camada em diferentes profundidades. Diante do observado, é possível que os mecanismos de ação dos materiais estudados sejam similares.

Numa revisão de literatura sobre o MTA, Holland et al. (2002b) sintetizou as características químicas e biológicas, mecanismo de ação, bem como os diferentes empregos clínicos desse material. Observou-se que o material exibe um bom comportamento biológico, caracterizado pelo estímulo à neoformação de tecido duro, aliado à usual ausência de

infiltrado inflamatório. Verificou-se ainda que seu mecanismo de ação seja semelhante ao do hidróxido de cálcio. Ambos materiais determinam a formação de granulações de calcita e uma ponte de tecido duro subjacente. O óxido de cálcio do pó do MTA, ao realizar-se a preparação da pasta com água, seria convertido em hidróxido de cálcio. Este, por sua vez, em contato com os fluidos tissulares, dissociaria-se em íons cálcio e hidroxila. Os íons cálcio, reagindo com o gás carbônico do tecido, dariam origem às granulações de calcita. As mesmas granulações foram descritas por Seux et al., (1991) em experimentação *in vitro*. Estes autores notaram também um acúmulo de fibronectina, em íntimo contato com os cristais de calcita, em meio de cultura sem células. Quando colocavam células da polpa em contato com esse ambiente, havia neoformação de células com aspecto morfológico de odontoblastos. Na ausência de granulação de calcita, havia apenas proliferação de fibroblastos. Esses achados constituíram forte evidência do papel da granulações de calcita e da fibronectina como ponto de partida inicial na formação de uma barreira de tecido duro.

A avaliação do pH e liberação do íon cálcio de dois materiais utilizados em obturação retrógrada e reparo de perfuração foram estudadas por Duarte et al., (2000). MTA ProRoot e MTA-Angelus foram colocados em tubos plásticos e imergidos em frascos de vidro contendo água deionizada. Após 3, 24, 72 e 168 horas, a água em que cada material havia sido imergido foi testada para determinar a mudança de pH e liberação de cálcio. Os valores para o pH e íon de cálcio liberados foram levemente superiores para o MTA-Angelus do que o ProRoot. O cálcio e a liberação do pH de ambos os materiais foram inicialmente mais elevados.

Um estudo foi realizado por Lopes et al., em (2003), para avaliar a reação do tecido subcutâneo de ratos ao implante de tubos de polietileno preenchidos com MTA e uma pasta de hidróxido de cálcio (Calen). Os animais foram sacrificados nos períodos de sete, 14 e 30 dias. A maioria dos espécimes foi corada com hematoxilina e eosina, os demais com a técnica de Von Kossa. No grupo do MTA, no período de sete dias, observou-se reação moderada com infiltrado inflamatório mononuclear, com predomínio de macrófagos, com necrose e a presença de neutrófilos juntos à abertura do tubo. Em contato com o material implantado, encontrou-se grande quantidade de vasos sanguíneos de pequeno calibre, material particulado enegrecido, e presença de células gigantes, tipo corpo estranho. Aos 14 dias, observou-se menor extensão da reação inflamatória na maioria dos tubos implantados, com a presença ainda de células gigantes multinucleadas, vasos sanguíneos e um aumento de fibras colágenas. A reação foi considerada moderada. Aos 30 dias, observou-se diminuição da

extensão da área reacional com a presença de poucas células mononucleares e aumento do número de fibroblastos e da quantidade de fibras colágenas, formando uma cápsula fibrosa. A reação foi considerada leve. Nos espécimes tratados pela técnica de Von Kossa, somente foram encontradas áreas positivas nos que continham hidróxido de cálcio, enquanto no MTA não foi observada a formação de áreas basófilas calcificadas.

A reação do tecido conjuntivo ao implante de MTA (ProRoot/Dentsply) e amálgama dentro de tubos de polietileno foi avaliada por Yaltirik et al (2004). Estes materiais juntos com os tubos de polietileno foram implantados na região dorsal de ratos albinos Wistar. Após os períodos de sete, 15, 30, 60 e 90 dias do procedimento de implantação, os tecidos foram removidos e examinados histologicamente. A presença de inflamação, tipo celular predominante, calcificação e espessura de fibra do tecido conjuntivo foram avaliadas. No grupo do MTA com sete dias, necrose de coagulação e calcificação distrófica foram observadas junto com moderado infiltrado celular inflamatório, principalmente macrófagos e células gigantes. Estas reações também foram observadas com 15 dias. Com 30 dias, o infiltrado inflamatório tinha diminuído, uma fina cápsula fibrosa e calcificação distrófica também foram observadas. Com 60 dias, um infiltrado inflamatório moderado e células gigantes foram vistos contínuos ao lado de uma atividade fibroblástica na forma de cápsula. Com 90 dias, não houve inflamação e a presença de calcificação distrófica, no período de 60 e 90 dias, também foi observada. Ambos os materiais foram bem tolerados pelos tecidos no período de avaliação de noventa dias.

A avaliação da reação dos tecidos subcutâneos de ratos ao MTA (Ângelus), cimento Portland e cimento Portland branco acrescido de resina epóxica dentro de tubos de polietileno foi realizada por Menezes et al., (2005). Trinta e seis ratos *norvegicus* foram randomicamente divididos em três grupos de acordo ao cimento e ao período experimental. Os animais foram sacrificados aos sete, 30 e 60 dias e amostras da pele contendo os tubos foram removidas e processadas para exame histológico. Aos sete dias, um tecido granulomatoso foi observado próximo à extremidade do tubo, caracterizado por linfócitos, células gigantes multinucleadas e abundantes macrófagos em torno de uma área necrótica. Aos 30 dias, o tecido em torno do tubo apresentava sinais iniciais de reparo, caracterizado por fibrócitos e fibras colágenas. Detectou-se igualmente um infiltrado inflamatório, caracterizado por muitos macrófagos e alguns linfócitos. Aos 60 dias, um processo avançado de reparo foi observado. Foram observadas mais áreas com tecido granulomatoso e fibrócitos nos grupos cimento Portland

quando comparado com os outros cimentos. Linfócitos foram observados em número maior no grupo do cimento Portland acrescido e resina epóxica. Os materiais não foram irritantes na área estudada, principalmente nos maiores tempos de permanência e não interferiram com o processo natural de cicatrização.

A biocompatibilidade do MTA e do Cimento Portland com Iodofórmio foi avaliada por Moraes et al., (2006). Dezoito ratos *Wistar* albino foram divididos em três grupos de seis animais cada. Tubos de polietileno foram obturados com os materiais manipulados recentemente e depois implantados no tecido subcutâneo dos animais. Tubos vazios foram usados como controle e, após sete, 30, e 60 dias, os implantes junto com o tecido foram removidos em blocos. No grupo do MTA observou-se, no período de sete dias, a presença de necrose com predomínio de macrófagos. Após 30 dias do implante no grupo do MTA, notou-se presença de áreas hialina, delgado tecido basofílico sugerindo calcificação distrófica. O tecido conjuntivo foi maturando ao redor do tubo obturado com o MTA, mas uma moderada reação inflamatória ainda estava presente. O cimento Portland com Iodofórmio produziu reação tecidual similar, mas a cápsula fibrosa apareceu mais organizada do que aquela ao redor dos implantes com o MTA. Com 60 dias, existia ainda uma significativa reação tecidual aumentada nos dois cimentos comparados com o grupo controle.

Felippe, Felipe e Rocha (2006) avaliaram a influência do MTA na apicificação e reparo periodontal de cachorros com formação apical incompleta, e com canal previamente contaminado, verificando-se também a necessidade do uso da pasta de hidróxido de cálcio antes do uso do MTA. Foi formada uma barreira apical mineralizada no interior do canal, somente no grupo de canais obturados com MTA. No grupo em que foi usada a pasta de hidróxido de cálcio com propileno glicol, esta barreira formou-se bem acima do limite apical. Entretanto, o MTA usado após o preparo do conduto favoreceu o reparo periapical e a apicificação. Não foi necessário o uso prévio da pasta de hidróxido de cálcio para ocorrer a apicificação.

Bernabé et al., (2007) avaliaram a resposta histológica do agregado trióxido mineral cinza (GMA) e o óxido de zinco e eugenol (ZOE) como materiais retrobturadores em dentes de cães. Lesões periapicais foram desenvolvidas em 24 dentes pré-molares de três cães. Os canais radiculares foram preparados e metade deles foram secos, preenchidos e o acesso coronal restaurado (fechado). Os dentes restantes não foram obturados e nenhuma restauração

coronária foi colocada (aberta). Após cortes dos ápices radiculares, cavidades de 3 mm foram realizadas utilizando pontas de ultrassom. Estas foram aleatoriamente retroobturadas, utilizando dispositivo MAPSYSTEM, quer com OZE ou GMTA, obtendo os mesmos números de amostras. Após 180 dias, os animais foram sacrificados e os blocos de tecidos removidos e processados para exame histológico, reação perirradicular foi avaliada, incluindo a severidade da inflamação e formação cemento. Uma diferença significativa foi encontrada entre os níveis de inflamação nos tecidos perirradiculares do grupo GMTA / fechado, em comparação com o grupo OZE / aberto e ZOE fechados ( $P < 0,05$ ), mas não entre o grupo GMTA fechado e GMTA aberto.

Formação de cemento não foi encontrada sobre qualquer espécime de ZOE, mas foi encontrada em todos espécimes de MTA. Os autores concluíram que o grupo GMTA teve menos inflamação periapical quando utilizado como material retroobturador, mesmo quando os canais radiculares ficaram sem preenchimentos e as cavidades coronárias abertas.

Gomes Filho et al., (2009a) avaliaram a resposta do tecido subcutâneo de ratos ao implantes dos cimentos Endo-CPM Sealer (Portland Cement Modified), Sealapex (SybronEnd, Glendora, CA) e MTA (Angelus, Londrina, Brasil). Estes materiais foram colocados em tubos de polietileno e dentina, depois implantados no tecido conjuntivo dorsal de ratos wistar por sete, 15, 30, 60 e 90 dias. Os espécimes foram preparados e corados pelas técnicas hematoxilina e eosina, von kossa ou ficaram sem coloração para luz polarizada. Tubos vazios foram utilizados como controle. Os resultados mostraram que no grupo do Sealapex com sete, 15 e 30 dias foi observada uma moderada infiltração de células inflamatórias consistindo de linfócitos e macrófagos e uma cápsula fibrosa estava presente. A intensidade da inflamação foi reduzida com 60 e 90 dias e uma fina cápsula fibrosa próxima à abertura do tubo foi observada, semelhante ao grupo controle. Granulações Von kossa positiva foram observadas perto da abertura do tubo. No grupo do MTA Angelus com sete dias, uma moderada inflamação consistindo de linfócitos e macrófagos foi observada na cápsula fibrosa. A intensidade da inflamação foi reduzida com 15, 30, 60 e 90 dias com uma fina cápsula fibrosa. Quase não havia células inflamatórias. Granulações von kossa positiva foram observadas perto da abertura do tubo. No grupo controle com sete e 15 dias uma moderada inflamação crônica consistindo de linfócitos e macrófagos estavam presentes em uma cápsula fibrosa. Com 30, 60 e 90 dias, poucas células inflamatórias crônicas foram observadas e a cápsula que envolvia o tubo era fina, os tubos vazios não foram Von Kossa

positivo. Após análise dos resultados, os autores concluíram que os materiais testados são similares, biocompatíveis e estimulam a mineralização.

Gomes Filho et al., (2009b) avaliaram a resposta no tecido subcutâneo de rato do Cimento endodôntico rápido (CER) e o MTA Angelus. O CER é o cimento Portland em gel. Os materiais foram colocados em tubos de polietileno e implantados no tecido conjuntivo dorsal de ratos Wistar por sete, 30, e 60 dias. Tubos vazios foram usados como controle. Os espécimes foram preparados para serem corados com hematoxilina-eosina ou Von Kossa ou não corados para luz polarizada. A presença de inflamação, tipo celular predominante, calcificação e espessura do tecido conjuntivo fibroso foram observados. Necrose e formação de calcificação foram ambas registradas. Os resultados mostraram que ambos os materiais, MTA Angelus e CER, causaram reações moderadas com sete dias diminuindo com o passar do tempo. No grupo do MTA aos sete dias, uma moderada infiltração de células inflamatórias consistindo de linfócitos e macrófagos foi observada em uma cápsula fibrosa. Houve redução de intensidade da inflamação com 30 e 60 dias, com fina cápsula fibrosa perto do tubo e quase sem células inflamatórias. Presença de calcificação distrófica, perto da abertura do tubo, foi observada no período de 30 e 60 dias. A resposta do MTA e CER foi semelhante ao do grupo controle com 30 e 60 dias, caracterizada por tecido conjuntivo organizado e presença de algumas células inflamatórias crônicas. Mineralização e granulações birrefringentes à luz polarizada foram observadas com ambos os materiais. Os autores concluíram que o CER foi biocompatível e estimulou mineralização.

Bernabé et al., (2010) avaliaram o reparo periapical após o uso de membrana, enxerto ósseo em cirurgia apical de dentes de cães. Após acesso coronal e remoção pulpar, lesões apicais foram induzidas em 48 raízes de 6 cães. Cirurgia apical consistia de osteotomia, seguido por apicectomia, curetagem, preparação de retrocavidade com o auxílio do dispositivo de ultra-som. O agregado de trióxido mineral (MTA) foi utilizado como material retrobturador. Os sítios cirúrgicos foram divididos em: Grupo 1 – Preenchidos com sangue; Grupo 2 – preenchidos com sangue e recoberto com membrana; Grupo 3 - preenchido com enxerto ósseo; e Grupo 4 - preenchido com enxerto ósseo e recoberto com membrana. Os resultados mostraram que o infiltrado inflamatório, o processo de cicatrização periapical e o comportamento do MTA foram os mesmos em todos os grupos, incluindo estímulo à mineralização. Os autores concluíram que o uso de membranas e materiais de enxerto ósseo

isolado ou associado em cirurgia apical não alterou periapical o processo de reparo após retrobturação com o MTA.

Reyes-Carmona et al., (2010) avaliaram o efeito do MTA na sinalização molecular inflamatória e habilidade de biomineralização. Para quantificar os níveis de citocinas e análise imuno-histoquímica, tubos de dentina humana foram preenchidos com ProRoot MTA (Dentsply, Dental, Tulsa, OK) ou mantido vazio e foram implantados no tecido subcutâneo de ratos. Após 12 horas, 1, 3 e sete dias após a implantação, os animais foram eutanizados e os tubos com o tecido ao redor foram removidos para realização do processamento histológico e análise imunohistoquímica. Após os períodos experimentais, os tubos foram removidos e posteriormente observados através da microscopia eletrônica de varredura. Na análise dos resultados, no primeiro dia, o MTA induziu aumento, por tempo-dependente, das citocinas pro-inflamatórias até 3 dias. Análise de imuno-histoquímica mostrou um aumento da expressão da mieloperoxidase (MPO), Fator nuclear kappa B (NF-kB), Fator ativador de proteína-1, (AP-1) ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido sintase induzível (iNOS ) e Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). O exame de Microscópica eletrônica de varredura revelou, no período de 12 horas, a presença de clusters de apatita, como a fibrilas de colágeno sobre a superfície dos tubos contendo MTA. Com o passar do tempo, após o implante, após sete dias, foi observada uma mineralização mais ampla, formando uma compacta camada de apatita. Os autores concluíram que o MTA induziu um ambiente pro-inflamatório e de cura da ferida. O processo de biomineralização ocorre simultaneamente, na interface do material-dentina-tecido, com a resposta inflamatória aguda, isso promoveu a integração do biomaterial com o ambiente.

Shahi et al., (2010) avaliaram o efeito do Agregado de Trióxido Mineral Cinza e Branco e do cimento de Portland também cinza e branco em células inflamatórias de ratos, após serem implantados dentro de tubos de polietileno no tecido subcutâneo de 60 ratos Sprague-Dawley, tubos vazios foram usados como controle. As amostras de tecido foram coletadas nos períodos de sete, 15, 30, 60, 90 dias, depois foram fixadas, coradas e avaliadas microscopicamente. Reações inflamatórias foram classificadas como grau 0: ausência de células inflamatórias, grau I: infiltração esporádica de células inflamatórias crônica, grau II: inflamação crônica moderada, grau III: infiltração densa e severa de células inflamatórias crônicas e grau IV: infiltração muito densa e severa de células inflamatórias crônicas. Os resultados mostraram que todos os grupos apresentaram inflamação grau III após os períodos

de observação de sete e 15 dias, houve uma diminuição no processo inflamatório após 30, 60 e 90 dias. Depois de 90 dias, o MTA cinza e branco e o grupo controle tiveram grau de inflamação zero (0). Já o grupo do cimento Portland cinza e branco mostrou grau de zero (0) para I de inflamação. Os autores concluíram que os cimentos MTAs foram mais biocompatíveis.

Gomes Filho, et al., (2010) investigaram o efeito do MTA, Sealapex e a combinação de Sealapex e MTA (Sealapex Plus) no tecido conjuntivo subcutâneo de rato, na viabilidade celular e na produção de citocinas em fibroblastos de ratos. A reação tecidual foi verificada com tubos de dentina contendo os materiais e implantados no tecido conjuntivo dorsal de ratos. A análise histológica foi realizada após sete e 30 dias. Com sete dias, no grupo controle, os tubos implantados foram cercados por uma parede de exsudato com neutrófilos, sobre esta área observaram-se fibroblastos jovens e uma quantidade moderada de células inflamatórias crônicas. Com trinta dias, as amostras deste grupo mostraram tecido conjuntivo com poucas células inflamatórias crônicas preenchendo o espaço do tubo. Por fora, os tubos foram cercados por uma fina cápsula fibrosa exibindo leve reação inflamatória crônica. Nos grupos experimentais, os resultados observados com os implantes dos tubos obturados com os materiais foram similares com sete e 30 dias. Com sete dias, todos os materiais exibiram uma moderada reação inflamatória crônica que tornou-se suave com 30 dias, similar a observada no grupo controle. A formação de tecido mineralizado e granulações birrefringentes à luz polarizada foram observadas em todos os materiais nos tempos de 7 e 30 dias.

Para a análise da viabilidade celular e liberação de citocinas, os fibroblastos foram semeados nos poços e estimulados por tubos de polietileno preenchidos com os cimentos. Tubos vazios foram utilizados como controle. Após 24 horas, a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio colorimétrico de redução de MTT. O ensaio ELISA foi utilizado para avaliação da produção de IL-1 $\beta$  e IL-6 por fibroblastos estimulados com os materiais. Os materiais foram inseridos no fundo da placa de 24 poços, condensados e deixados tomar presa por duas semanas em meio de cultura. Fibroblastos da linhagem L929 foram semeados e, após 24 horas, os meios foram coletados e analisados para IL-6 e IL-1 $\beta$  através do método de ensaio imunoenzimático (ELISA). MTA, Sealapex e Sealapex plus não foram citotóxicos. A produção de IL-6 e IL-1 $\beta$  mostrou-se aumentada em todos os grupos em relação ao grupo controle. Em conclusão, MTA, Sealapex e Sealapex plus foram biocompatíveis em cultura de fibroblastos. Além disso, sugere-se que os materiais possam favorecer o processo de reparo pela liberação de IL-6 e IL-1 $\beta$ .

Gomes Filho et al., (2011) avaliaram a reação do tecido subcutâneo de rato ao implantes de tubos de polietileno preenchidos com agregado de trióxido mineral (MTA) FILLAPEX, Sealapex ou MTA Angelus. Estes materiais foram implantados no tecido conjuntivo dorsal de ratos Wistar por sete, 15, 30, 60, e 90 dias. Os espécimes obtidos foram corados pelas técnicas hematoxilina e eosina ou Von Kossa ou deixados sem corar para exames sob luz polarizada. Avaliações qualitativas e quantitativas das reações foram realizadas. Com sete dias, moderado infiltrado de células inflamatórias consistindo de linfócitos e macrófagos foi observado na cápsula fibrosa de todos os materiais testados. A intensidade da inflamação diminuiu com 15, 30, 60 e 90 dias onde se observou, nas proximidades da abertura do tubo, uma cápsula fibrosa fina e quase ausência de células inflamatórias para todos os materiais testados, exceto o Sealapex, que tinha intensidade da inflamação reduzida a partir de 30 dias. Granulações birrefringentes à luz polarizada e positividade Von Kossa foram observadas perto da abertura do tubo em todos os materiais testados. No grupo controle (tubos vazios), com sete e 15 dias, moderado infiltrado de células crônicas, consistindo de linfócitos e macrófagos, foi observado na cápsula fibrosa. A cápsula fibrosa ao redor dos tubos era fina, com poucas células inflamatórias crônicas após 30, 60 e 90 dias. Não foi observada positividade Von Kossa ou estruturas birrefringentes. Os autores concluíram que o MTA FILLAPEX foi biocompatível e estimulou a mineralização.

#### 4.2.2 Sealapex

Sealapex (SybronEndo, Orange, CA, EUA) é um cimento endodôntico à base de hidróxido de cálcio composto por uma pasta base e uma pasta catalisadora, que tem demonstrado excelentes propriedades biológicas e capacidade de induzir deposição de tecido mineralizado ao nível do forame apical (HOLLAND;DE SOUZA,1985; LEONARDO et al.,2003, TANOMARU FILHO et al., 2006) e selamento apical capacidade (ESTRELA, 2004). Entretanto, para sua utilização como material retrobturador, faz-se necessário acrescentar óxido de zinco, até que o cimento fique com a consistência de massa de vidraceiro, passando a ser denominado de sealapex consistente (LUIZ, 2003; BERNABÉ; HOLLAND, 2004; TANOMARU FILHO et al., 2006, LEAL;BAMPA;NETO, 2008 ), favorecendo desta forma sua colocação nas retrocavidades (LEAL;BAMPA;NETO,2008). O óxido de zinco (ZnO), utilizado para dar consistência ao Sealapex, é um óxido anfótero, ou seja, de metais de transição e semi-metais capazes de reagir tanto com ácidos quanto com

bases, fornecendo sal e água. Industrialmente é obtido principalmente pela oxidação dos vapores de zinco, produzindo partículas de diversas formas. O óxido de zinco é considerado não tóxico, é o mais conhecido e utilizado industrialmente, especialmente como base de pigmentos brancos para pintura, também na indústria de borracha e em cremes solares. Na Odontologia é usado para preparo de cimentos dentais em combinação com o eugenol. O óxido de zinco é uma substância que pode atuar conferindo radiopacidade à mistura à qual é agregado, sendo empregado com esta finalidade na fabricação de pastas, além de participar também da composição de cimentos endodônticos. (KIRK OTHMER, 1984; VALERA et al., 2005)

Em um estudo utilizando 160 canais radiculares de oito cães e 80 canais de quatro macacos, Holland e Souza (1985) avaliaram a capacidade do Sealapex de induzir a neoformação de tecido duro. Realizada pulpectomia a 1 mm aquém do ápice radiográfico e pulpectomia total ao nível do ápice radiográfico, utilizou-se o Sealapex, hidróxido de cálcio com água destilada e o cimento Pul Canal Sealer para obturação dos canais radiculares. O grupo controle teve os canais preparados, porém não foram obturados. Após seis meses, os animais foram mortos. Nos resultados observados em dentes de cães e em dentes de macacos, o Sealapex e o hidróxido de cálcio induziram o fechamento apical pela deposição de cimento. Nos casos de pulpectomia aquém do ápice, o Sealapex e hidróxido de cálcio tiveram a mesma percentagem (70%) de fechamento. Já nos casos de pulpectomia ao nível do ápice, os grupos com o cimento Sealapex mostraram 33,3% de fechamento do ápice enquanto os com hidróxido de cálcio tiveram 10% de fechamento parcial. Quando houve extravasamento do cimento Sealapex e do Pulp Canal Sealer, estes promoveram reação inflamatória crônica, embora com o Sealapex tenha ocorrido depósito de tecido osteoide na área de extravasamento, ou reabsorvido com facilidade.

A liberação de íons cálcio e o pH dos cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio Sealapex, Sealer 26 e Apexit foram avaliados por Duarte et al., (2000). Após a espatulação, os cimentos foram colocados em tubos com 01 cm de altura por 04 mm de diâmetro e imersos em frascos de vidro contendo 10ml de água destilada e estocados a 37°C. Os tubos foram removidos e a água na qual eles foram imersos foi testada para verificar o pH e para verificar a liberação de cálcio pelo espectômetro de observação atômica. Os autores mensuraram a liberação dos íons cálcio e o pH em quatro períodos, 24 horas, 48 horas, sete dias e 30 dias após a espatulação. O Sealapex produziu um pH alcalino e apresentou a maior liberação de

cálcio e o íon hidroxila, especialmente após longos períodos. O Sealer 26 mostrou a maior liberação durante o período inicial e o Apexit apresentou os piores resultados.

Holland, et al., (2002a) analisou a presença de depósitos de sais de cálcio em tecido conjuntivo de ratos, após implantes de tubos de dentina, contendo cimentos à base de hidróxido de cálcio. Os seguintes cimentos foram utilizados nesta pesquisa: MTA, Sealapex, CRCS, Sealer 26 e Sealer Plus. Os tubos preenchidos com os cimentos foram implantados na região dorsal, em cada lado da linha média de 60 animais, os quais foram mortos após sete e 30 dias. Nos animais do grupo controle, nos quais não se utilizaram cimentos nos tubos, observou-se após sete dias ligeira inflamação tecidual, porém, com 30 dias, formou-se uma cápsula fibrosa com poucas células inflamatórias. Nos grupos experimentais, com sete dias, observou-se um exsudato com neutrófilos ao redor dos materiais implantados. Trinta dias após o implante, a população celular próxima ao material obturador apresentava fibroblastos jovens e moderada inflamação crônica. O MTA e o Sealapex, em contato com o tecido, provocaram granulações mais numerosas do que os outros materiais. Próximo a estas granulações, havia uma área extensa de tecido irregular semelhante a uma ponte, mais positiva para a técnica Von Kossa do que granulações birrefringentes. Estas estruturas Von Kossa positiva foram largas e mais extensas com o MTA e Sealapex do que os outros materiais. O CRCS foi o único material que não exibiu nenhuma estrutura calcificada que fosse Von Kossa positiva ou birrefringente para luz polarizada. As seções descalcificadas exibiram uma estrutura basófila e irregular. Com sete dias, o tecido conjuntivo ao redor destas estruturas mostrou proliferação fibroblástica, uma reação inflamatória crônica de suave a moderada e algumas células gigantes. Após 30 dias, a estrutura Von Kossa positiva foi observada como uma área basofílica e tecido irregular com inclusões celulares. Ao redor desta estrutura, existia um tecido conjuntivo fibroso com uma suave reação inflamatória crônica e algumas células gigantes.

A reparação apical e periapical após obturação retrógrada em dentes de cães com reação periapical crônica foi avaliada por Luiz (2003) empregando diferentes materiais retrobturadores.. Foram utilizados 48 canais radiculares com lesões periapicais de 4 cães, de ambos os sexos, sem raça definida, com aproximadamente 1 ano de idade e pesando entre 10 e 15 kg. Os canais foram parcialmente obturados sem a realização do preparo biomecânico, em seguida foi realizada a cirurgia parendodôntica com obturação retrógrada empregando como materiais retrobturadores o Sealer 26, o Sealapex acrescido de óxido de zinco (Sealapex

Consistente) ou o Mineral Trióxido Agregado (MTA). Decorrido o período de 180 dias, os animais foram mortos e as peças submetidas ao processamento histológico. No grupo do Sealapex acrescido de óxido de zinco, a região periapical mostrava discreta quantidade de células inflamatórias predominantemente mononucleadas. Sobre a superfície radicular seccionada, deposição de tecido cementário foi observada sobre toda extensão dentinária. Os resultados da análise microscópica demonstraram que os grupos que empregaram o Sealer 26, Sealapex consistente ou MTA apresentaram resultados semelhantes de reparação apical e periapical. O autor conclui que os três cimentos estudados apresentaram potencial para serem empregados com materiais retrobturadores.

A resposta, em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, ao Sealapex puro e acrescido de iodorfórmio ou óxido de zinco, que confere radiopacidade desejada, foi avaliada por Valera et al., (2005). Utilizaram-se trinta animais nos quais os tubos de polietileno, contendo os três materiais, foram implantados. Após períodos de observação de 14 ou 90 dias, os animais foram mortos e os espécimes foram encaminhados para preparação histológica de rotina. No grupo Sealapex acrescido de óxido de zinco, observou-se hiperemia em todos os animais mortos no menor período. Neste, o infiltrado inflamatório era constituído por poucas células gigantes multinucleadas e grande quantidade de macrófagos, ambos carregados de partículas do material no citoplasma. Fibrosamento com formação capsular ao redor do material estava presente em vários espécimes. Nos grupos mortos após 90 dias, verificou-se maior intensidade da resposta inflamatória, com presença de alguns eosinófilos e, em vários animais, fibrosamento com formação de cápsula mais delgada do que aos 14 dias. A combinação Sealapex com óxido de zinco foi a que apresentou a menor inflamação mesmo quando comparada ao cimento puro, nos dois períodos estudados. Os autores concluem que o acréscimo de óxido de zinco não altera suas propriedades biológicas.

Em um estudo para avaliar o reparo periapical de dentes de cães com lesão apical, Tanomaru Filho et al., (2006) usou três diferentes materiais retrobturadores. Quatro cães da raça mongrel, macho e fêmea, com aproximadamente um ano de idade, foram selecionados. Após indução de lesões periapicais, 48 canais radiculares de dentes caninos foram parcialmente obturados. Cirurgia endodôntica foi realizada e os cimentos Sealer 26, Sealapex acrescido de óxido de zinco ou Agregado trióxido mineral (MTA) foram usados como material retrobturador. Após 180 dias, os animais foram mortos, as maxilas e mandíbulas removidas e submetidas a processamento histológico. Análise histológica revelou reparo

periapical similar para os grupos dos três materiais retrobturadores usados nesta pesquisa. O Sealapex acrescido de óxido de zinco apresentou bons resultados neste estudo, entretanto somente uma leve deposição de tecido mineralizado pôde ser observada.

Eldeniz et al. 2007 avaliaram o nível do pH e a liberação do íon cálcio de três cimentos a base de hidróxido de cálcio, acroseal, apexit e sealapex, nos períodos de 24 hrs, 96hrs, e sete, 15 e 28 dias. Após análise dos resultados, observou-se que o sealapex exibia, em relação aos outros cimentos, um alto potencial alcalinizante. Com 24 horas, o grupo Sealapex teve o nível de cálcio mais elevado que o acroseal e apexit. Estes resultados também foram obtidos com 96 horas, sete, 15, e 28 dias.

Leonardo et al., (2007) avaliaram a resposta dos tecidos perirradiculares depois de tratamento endodôntico com os canais radiculares preenchidos com cones de guta percha ou resilon e o novo Sealapex (substituição do radiopacificador sulfato de bário por trióxido de bismuto) em dentes de cães com e sem restauração coronária. Após 90 dias, foram examinados por microscopia de luz, mostrando que os canais obturados com Epiphany/Resilon com restauração coronária obtiveram menor inflamação perirradicular do que os canais preenchidos com Sealapex e cones de guta percha com restauração coronária. Não houve diferença significativa quanto à intensidade da inflamação entre os canais preenchidos com Epiphany/Resilon sem restauração e Sealapex/guta percha com restauração. Os canais preenchidos com Sealapex/guta percha sem restauração mostraram alto grau de inflamação perirradicular.

Gomes-Filho et al., (2008) examinaram a reação do tecido conjuntivo de ratos ao implante de cimentos à base de hidróxido de cálcio, Acroseal e Sealapex. Tubos de dentina contendo os materiais e vazios como controle foram implantados no tecido conjuntivo dorsal de 36 ratos wistar albino. Os animais foram mortos após os períodos de sete e 30 dias e os espécimes obtidos foram preparados para análise histológica com as técnicas hematoxilina e eosina, Von Kossa e luz polarizada. Ambos os materiais causaram leve ou moderada reação inflamatória com sete dias, mas as reações decresceram com 30 dias. No grupo Sealapex com 30 dias, a cápsula fibrosa ao redor do tubo foi fina com poucas células inflamatórias crônicas. Mineralização no tecido subcutâneo de ratos só foi observada no sealapex.

Perassi, et al., (2008), compararam a biocompatibilidade de um cimento experimental à base de polímero da mamona (Poliquil®) acrescido de um agente radiopacificador (óxido de zinco), com os cimentos EndoREZ®; Endofill® e Sealapex®. Os cimentos foram implantados em tubos de polietileno no tecido subcutâneo dorsal de camundongos *Mus musculus albinus* machos. As avaliações foram realizadas em dois períodos experimentais: sete e 50 dias. Após estes períodos, os animais foram mortos, os fragmentos teciduais removidos cirurgicamente e processados por meio de técnicas histológicas de rotina. Foram atribuídos escores de acordo com a intensidade do infiltrado inflamatório e as características da cápsula fibrosa em torno do material implantado. Os resultados demonstraram menor infiltrado inflamatório e maior formação de cápsula fibrosa ao redor dos implantes de cimento Poliquil, derivado do polímero da mamona; os cimentos Endofill e Sealapex causaram infiltrado inflamatório moderado aos 7 dias, e discreto aos 50 dias, sendo que houve maior formação de cápsula fibrosa ao redor do cimento Sealapex. O cimento EndoREZ ocasionou a maior irritação tecidual quando comparado aos demais cimentos. Em ordem decrescente, os resultados demonstraram maior biocompatibilidade dos cimentos Poliquil, Sealapex, Endofill, EndoREZ.

Vita et al., (2008), analisaram a resposta histomorfológica do tecido subcutâneo de ratos ao implante do Agregado Trióxido Mineral (MTA) e Sealapex acrescido de óxido de zinco (Sealapex consistente), indicados como materiais retrobturadores. Foram utilizados 40 ratos distribuídos em grupos de dois animais para cada período experimental, a saber: dois, sete, 30 e 60 dias. Cada animal recebeu três implantes com o mesmo material, cada um destes foi considerado uma amostra de estudo, num total de até seis amostras por grupo. As respostas do tecido conjuntivo em contato com os materiais retrobturadores foram avaliadas de forma descritiva e semi-quantitativa através de escores (0=ausente; 1=discreto; 2=moderado; 3=intenso), analisando-se a inflamação, presença de necrose, edema, tecido de granulação, fibrose e calcificações. Com sete dias em torno do tubo contendo o MTA, observou-se inflamação discreta do tipo crônica, a fibrose variou de discreta a moderada, não foram observadas áreas basófilas calcificadas. Em volta do tubo contendo o sealapex consistente, observou-se inflamação crônica moderada, tecido de granulação e uma faixa delgada de tecido conjuntivo fibroso. Área basófila calcificada discreta está presente em apenas uma amostra. No período de observação de 60 dias, no grupo tubo contendo MTA, não foi vista inflamação em metade das seis amostras analisadas, enquanto o restante mostrou inflamação discreta do tipo crônica, observou-se também ausência de tecido de granulação. Uma faixa

delgada de tecido conjuntivo fibroso foi observada em todas as amostras. Áreas basófilas calcificadas discretas foram observadas em apenas duas amostras. No grupo tubo contendo Sealapex Consistente, ao redor do material, não se verificou inflamação em metade das seis amostras analisadas enquanto o restante mostrou presença de inflamação discreta do tipo crônica, percebeu-se também ausência de tecido de granulação. Delgada faixa de tecido conjuntivo fibroso estava presente em todas as amostras. Áreas basófilas calcificadas discretas estavam presentes em metade das amostras. No grupo controle tubo vazio, no período de dois dias, observaram-se neutrófilos caracterizando inflamação aguda. Com sete e 30 dias, observou-se inflamação crônica e tecido de granulação que variou de discreta a moderada. No período de 60 dias não foi observada inflamação e tecido de granulação. A fibrose foi discreta assim como observada no período de 30 dias. Em nenhum período de observação foram observadas áreas basófilas calcificadas. Os resultados demonstraram que, com o passar do tempo, ambos os materiais despertaram reação tecidual semelhante, representada por redução da resposta inflamatória, discreta fibrose e presença de áreas basófilas calcificadas, corroborando à sua biocompatibilidade.

Cunha et al., (2011), avaliaram a biocompatibilidade de cimentos utilizados em cirurgia apical, em tecidos subcutâneos de ratos. Tubos de polietileno esterilizados foram preenchidos com os seguintes cimentos: Sealapex, Sealapex acrescido de óxido de zinco, Sealer 26, Sealer 26 espessado (maior proporção pó/resina) e MTA branco. Os tubos foram implantados no dorso de ratos machos e após sete, 21 e 42 dias, os animais foram mortos, obtendo 5 amostras por cimento em cada período analisado. A superfície lateral do tubo foi utilizada como controle negativo. As reações inflamatórias em contato com os cimentos foram classificadas como ausente, leve, moderada e severa. Aos sete dias, todos os cimentos induziram reações inflamatórias similares no tecido conjuntivo dos animais, com a maioria dos espécimes apresentando reação inflamatória crônica de moderada a intensa, com presença de células gigantes multinucleadas. Aos 21 dias, Sealer 26 e Sealer 26 espessado apresentaram reação inflamatória mais intensa, enquanto, após 42 dias, a reação inflamatória variou de ausente a leve, com resultados estatisticamente semelhantes para ambos materiais. O grupo do Sealapex acrescido de óxido de zinco mostrou um tecido conjuntivo fibroso com pouca inflamação. Necrose e células gigantes do tipo corpo estranho não foram observadas. Com exceção do grupo MTA, todos os cimentos apresentavam reação granulomatosa de corpo estranho após 42 dias. Todos os grupos, exceto o Sealapex, apresentaram redução estatisticamente significativa dos índices inflamatórios ao longo do tempo. Conclui-se que todos os cimentos

induziram reação inflamatória de moderada a intensa no período inicial de análise. Entretanto, Sealer 26 e Sealer 26 espessado apresentaram reação inflamatória mais intensa após 21 dias de contato com os tecidos e reação granulomatosa não foi observada no grupo MTA no período final de análise.

Queiroz, et al. (2011) avaliaram a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos BALB/c ao implante de tubos de polietileno contendo cimentos indicados para obturação de dentes decíduos: óxido de zinco Eugenol (ZOE), pasta Calen adicionada ao Óxido de zinco e o Sealapex. Tubos vazios foram utilizados como controle. Após os períodos de sete 21 e 63 dias, as biopsias dos tecidos foram realizadas e submetidas à análise histológica descritiva e semi-quantitativa usando o sistema de escore para formação de fibra colágena, espessura tecidual e infiltrado inflamatório. A análise quantitativa foi realizada mensurando a área e espessura da reação tecidual granulomatosa (GRT). Com sete dias, no grupo sealapex, na região próxima à abertura do tubo, observaram-se vários PMN, macrófagos e fibroblastos jovens. Discreta formação de fibra colágena predominou em alguns espécimes. Com 21 dias, a zona da reação tecidual foi fina e apresentou de leve a moderada e bem organizada formação de fibra colágena. Também foi observada partícula do cimento no citoplasma de macrófagos e CG. Com 63 dias, moderada e organizada formação de fibra colágena foi observada, assim como macrófagos fagocitando partícula do material. Leucócitos PMN foram encontrados em grande número e algumas CG estavam também presentes. Não houve diferença significativa entre os materiais quanto à formação de fibra colágena ou espessura de GRT. No entanto, o grupo Calen/óxido de zinco produziu menos infiltrado inflamatório. A área de GRT foi significativamente menor para o Calen/óxido de zinco e Sealapex. A melhor reação tecidual foi para o Calén/óxido de zinco, seguida pelo Sealapex e ZOE.

Silveira et al., (2011), avaliaram a biocompatibilidade subcutânea de cimentos endodônticos radiculares: Epiphany, AH Plus, Pulp Canal Sealer e Sealapex. Sessenta ratos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, de acordo com o cimento. Tubos de polietileno contendo os materiais testados foram inseridos no tecido conjuntivo. Os implantes foram removidos após sete, 15 e 30 dias, e as amostras de tecido foram processadas, coradas e examinadas por microscopia de luz. A análise descritiva considerou: espessura da cápsula fibrosa, severidade da reação inflamatória e presença de células gigantes. Após sete dias, todos os cimentos induziram moderada e severa reação inflamatória, no grupo Sealapex observou-se uma cápsula fibrosa intermediária. Após 15 dias, os cimentos Epiphany e AH

Plus apresentaram uma reação inflamatória moderada, enquanto Pulp Canal Sealer e Sealapex induziram intensa e leve reações inflamatórias, respectivamente. Após 30 dias, leve reação inflamatória foi observada para o Epiphany, Sealapex e AH Plus. O Sealapex apresentou uma fina cápsula fibrosa tanto com 15 como 30 dias. Sealapex induziu a menor resposta inflamatória em todos os períodos de avaliação, e somente Pulp Canal Sealer não apresentou uma diminuição da reação inflamatória ao longo do tempo.

#### 4.2.3 Matriz Extracelular

A MEC não serve apenas como suporte para estabilização da estrutura física dos tecidos, ela representa um ambiente complexo e dinâmico importante nas interações célula-célula e célula matriz, participando desta forma da integridade do tecido. Existe entre as células e a MEC uma interferência permanente através de receptores, principalmente da família das integrinas, controlando a forma, migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Três grupos principais de proteínas compõem a matriz extracelular, representados pelas proteínas estruturais fibrosas, proteínas estruturais não fibrosas e proteínas matricelulares. Dentre as proteínas estruturais fibrosas, subdivididas nos sistemas colagênico e elástico, destacam-se, respectivamente, os colágenos fibrilares e não-fibrilares e as fibras elauínicas, oxitalânicas e elásticas. Por sua vez, dentre as proteínas estruturais não fibrosas, estão as glicosaminoglicanas e glicoproteínas e, constituindo as proteínas matricelulares, apontam-se as trombospondinas, osteopontinas e tenascinas. Esta organização não é estática, a composição da MEC varia em função do estado diferenciado do tecido e em função da idade. Ela muda durante o desenvolvimento, maturidade, patologias e envelhecimento, logo a organização da MEC é um processo dinâmico (SIQUEIRA JUNIOR;DANTAS, 2000; ROBERT-LOBAT, 2012).

As células do tecido conjuntivo, segundo Andrade, (2003) a matriz pode mostrar variações morfológicas e funcionais, de acordo com a maior ou menor concentração dos seus componentes para formar as diversas variedades de tecido conjuntivo. O que leva as células do tecido conjuntivo a proliferar e secretar os componentes da matriz extracelular são os mensageiros químicos, sob a forma de polipeptídeos secretados por vários tipos celulares

(citocinas). Entre estas células, os macrófagos e os linfócitos T estão entre as mais importantes.

Para Midwood; Williams e Schwarzbauer (2004) a reparação do tecido após lesão depende da síntese de matriz extracelular fibrosa para substituir tecido perdido ou danificado. A matriz extracelular guia a reparação regulando o comportamento de grandes variedades de tipos de células que são mobilizadas para a área danificada na reconstrução do tecido. A inflamação aguda, re-epitelização e contração dependem de interações célula-matriz para minimizar a infecção e promover o fechamento rápido da ferida. Proteínas da matriz extracelular são reguladas durante a cicatrização da ferida onde elas modulam as interações entre as células e a matriz extracelular para exercer controle sobre os eventos que são essenciais para a eficiente reparação tecidual.

Segundo Kumar; Abbas e Fausto (2005), a célula movimenta-se e diferencia-se em contato íntimo com macromoléculas fora da célula que constituem a matriz extracelular. Três grupos de macromoléculas, que estão com frequências associadas fisicamente, constituem a MEC: (1) proteínas estruturais fibrosas, como os colágenos e as elastinas; (2) um grupo diverso de glicoproteínas adesivas; e (3) proteoglicanos e ácido hialurônico. Essas macromoléculas estão presentes nas junções intercelulares e superfícies celulares e podem agrupar-se em duas organizações gerais: matriz intersticial e membrana basal. A matriz intersticial está presente nos espaços entre as células epiteliais, endoteliais e dos músculos lisos no tecido conjuntivo. As membranas basais são produzidas por células epiteliais e mesenquimáticas e estão intimamente associadas à superfície celular. Elas consistem numa rede de colágeno não-fibrilar amorfo (a maioria do tipo IV), laminina, sulfato de heparan, proteoglicana, e outras glicoproteínas. A MEC tem muitas funções. Por exemplo, as proteínas da matriz sequestram água, que fornece a turgência dos tecidos moles e minerais, que dão rigidez aos tecidos esqueléticos. Elas atuam também como um reservatório aos fatores de crescimento, controlando a proliferação celular. A MEC é importante para as interações célula a célula e fornecem um substrato às células para aderirem, migrarem e proliferarem, modulando diretamente a forma e função celulares. A síntese e degradação da MEC acompanham a morfogênese, a cicatrização de ferimentos e os processos fibróticos crônicos, bem como a invasão tumoral e as metástases.

Segundo Raitz (2008), a matriz extracelular (MEC) é uma estrutura complexa que proporciona o arcabouço que sustenta as células nos tecidos de todos os mamíferos. A presença de fatores de crescimento influencia a produção de componentes da MEC pelos fibroblastos, enquanto a sua composição pode influenciar a função celular. Uma contínua reconstrução e mudança nos constituintes da MEC ocorrem durante o processo de reparo da ferida. Inicialmente, a matriz é composta de proteínas derivadas em grande parte das plaquetas e do plasma. Com a migração dos macrófagos, até a ferida e a subsequente formação de tecido de granulação, os componentes da MEC são manufaturados pelas células *in situ*. A MEC de tecidos cicatriciais passa, na verdade, por mudanças muito rápidas. A fibrina do tampão, por exemplo, é substituída por fibronectina (FN) e ácido hialurônico e depois por colágeno III e I. Dentre as mudanças citadas, está a remodelação, ou seja, um conjunto de processos de síntese e degradação de proteínas que permite a substituição do tecido de granulação por uma cicatriz fibrosa.

Laminina é a mais abundante das glicoproteína presentes nas membranas basais. A sua estrutura química é dotada de três cadeias peptídicas ligadas por pontes de enxofre, e sua estrutura espacial tem a configuração de uma cruz. A laminina tem domínios de ligação aos receptores da superfície celular e da MEC, ela pode também mediar a união das células aos substratos do tecido conjuntivo. É sintetizada por células epiteliais de revestimento. Quando as estruturas que contêm membrana basal estão sendo formadas (regeneração de tecidos ou nas neoplasias), o nível da concentração de laminina se eleva no local (ANDRADE, 2003; KUMAR, ABBAS; FAUSTO, 2005).

Os colágenos são proteínas fibrosas sintetizadas pelos fibroblastos e células afins. A sua estrutura molecular é formada por cadeias alfas dispostas em tríplice hélice e que caracterizam por mostrar sequências repetidas de três amino-ácidos: glicina-XY. O X e o Y são frequentemente representados por prolina e lisina, os quais costumam aparecer hidrolisados. Atualmente são conhecidos 27 tipos diferentes de colágenos codificados por 41 genes dispersos em pelo menos 14 cromossomos. Os tipos I, II, III, V e XI são colágenos intersticiais ou fibrilares e os mais abundantes. O tipo IV é não fibrilar (forma lâminas ao invés de fibrilas), e é o principal componente da lâmina basal, junto à laminina. O colágeno fibrilar é sintetizado do procolágeno, uma molécula precursora derivada do pré-colágeno, que é transcrito dos genes do colágeno. O procolágeno é secretado da célula e clivado por

proteases para formar a unidade básica das fibrilas. O colágeno de tipo I é o mais abundante e é o predominante na áreas de tecido fibroso denso, como no derma cutâneo, tendões, córnea e ossos. O colágeno de tipo III é predominante no tecido conjuntivo frouxo, areolar. O colágeno de tipo IV é não-fibrilar e se encontra principalmente fazendo parte das membranas basais (ANDRADE, 2003; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A fibronectina (FC) é uma glicoproteína, consistindo de unidade repetida de aminoácidos, os quais formam domínios que permitem à molécula interagir com uma variedade de células através de receptores integrinas e de não integrinas. Fibronectina influencia diversos processos, incluindo inflamação, reparo de ferida, metástase maligna, adesão de microorganismo e trombozes. Ela é uma glicoproteína composta de uma matriz de múltiplas estruturas modulares com vários domínios: 12 FN tipo tipo I (FNI), 02 tipo II (FNII), 15 tipo III (FNIII), 02 emendas alternativa do tipo III (EIIB-EIIIA) e uma emenda variável não homóloga (tipo V ou IIICS). Estes domínios interagem com uma variedade de moléculas como o colágeno, células e heparan. A fibronectina é encontrada no plasma (FNp), é largamente produzida por hepatócitos e apresenta-se na forma solúvel. Outras formas de fibronectinas são produzidas por numerosas células incluindo fibroblastos, células epiteliais e macrófago, são referidas como fibronectina celular (FNc). Uma vez secretadas, ambas FNp e FNc podem ser incorporadas dentro da matriz extracelular. As formas de fibronectina do plasma e celular desempenham temporalmente e espacialmente distintas e vitais funções durante a progressão da cicatrização de feridas. FNp circula no plasma sanguíneo na forma inativa e é armazenado nos grânulos de plaquetas até ser ativada em resposta a ferida e estimulação da cascata da coagulação. FNp é então depositada e reticulada numa matriz provisória rica em fibronectina para estimular funções como adesão, agregação de plaquetas e invasão no coágulo, mediando a hemostasia. Já a FNc é sintetizada pela migração de células dentro do coágulo e montada em um complexo fibrilar matriz sobre a superfície celular, que direciona a deposição de outras proteínas da MEC e a migração, adesão e diferenciação de fibroblastos (ROMBERG, 1997; MIDWOOD; TO, 2011).

Mizuno e Banzai (2008) avaliaram o efeito dos íons de cálcio do hidróxido de cálcio em células de polpa dentária e o mecanismo da formação da ponte de dentina. Células de polpa dentária humana foram tratadas com alta concentração de íons de cálcio ou magnésio 24 h e a

expressão do gene fibronectina foi medida por método PCR quantitativo. Células de polpa dentária humana foram cultivadas em discos revestidos de fibronectina por 24 e a expressão dos genes osteocalcina e osteopontina, os quais são os fenótipos típicos de células de tecido mineralizado, também foram medidos por PCR quantitativo. Os resultados mostraram que a expressão do gene fibronectina foi estimulada por íons cálcio dose-dependente. Por outro lado, os íons de magnésio não influenciaram a expressão do gene fibronectina. Além disso, células cultivadas em discos revestidos de fibronectina aumentaram a expressão de fenótipos celulares formadores de tecido mineralizado. Os autores concluíram que os íons de cálcio estimulam, em células da polpa dental, a síntese de fibronectina. A fibronectina pode induzir a diferenciação de células da polpa dental em células formadoras de tecido mineralizado, que são as principais células na formação da ponte de dentina.

Sottile et al., (2007) utilizaram ligação de colágeno, a fibronectina mutante e peptídeos recombinantes que interferem na ligação entre colágeno e fibronectina para mostrar que a deposição de colágeno tipo I fibronectina dependente regula a resposta migratória das células por fibronectina. Comunicação entre as células e a matriz extra celular é fundamental para a regulação do crescimento, sobrevivência, migração e diferenciação celular. Remodelação da MEC pode ocorrer sob condições fisiológicas, como resultado de lesão tecidual e em certas condições patológica. Remodelação da MEC leva alterações em sua composição e organização que podem alterar muitos aspectos do comportamento celular, incluindo a migração celular. A resposta das células migratórias varia dependendo do tipo, quantidade e organização das moléculas presentes na MEC, bem como o repertório de integrinas e proteoglicanos das células. Têm-se mostrado que a deposição de várias moléculas da MEC, incluindo colágeno tipos I e III, depende da presença e estabilidade de fibronectina. Estes dados mostram que a habilidade da fibronectina em organizar outras proteínas na MEC é um aspecto importante de sua função e destaca a importância da compreensão de como as interações entre proteínas e MEC podem influenciar o comportamento da célula.

#### **4.2.4 Dinâmica das fases do reparo**

A reparação ocorre para reconstruir áreas de tecido conjuntivo destruídas ou desorganizadas, e o processo acontece a partir da formação de tecido de granulação. Quando a lesão causa a

perda de muitas células, o reparo é mais complexo e pode assumir uma das duas possibilidades: a) se as células parenquimatosas morrem, mas o estroma permanece íntegro, o reparo se faz a partir de células do mesmo tipo das que se perderam, voltando o órgão à sua estrutura normal (regeneração); b) se o estroma é destruído, o reparo se faz fundamentalmente às custas do tecido conjuntivo (cicatrização), o que quase sempre aparece combinado com certo grau de regeneração dos elementos epiteliais, o quais podem ou não reproduzir a estrutura que tinha anteriormente. A regeneração requer uma arquitetura de tecido conjuntivo intacto. Ao contrário, a cicatrização com formação de cicatriz ocorre se a estrutura da matriz extracelular estiver extensamente danificada, causando alterações na arquitetura tecidual (ANDRADE, 2003; KUMAR; ABASS; FAUSTO, 2005).

O reparo representa, pois, o epílogo de um processo inflamatório bem sucedido e ocorre de forma semelhante em vários tecidos e órgãos, resguardadas as características de cada região. A dinâmica dos eventos de reparação se divide em três fases evolutivas, não mutuamente excludentes, mas sobrepostas no tempo: fase inflamatória, deposição da matriz extracelular e a fase de remodelamento (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; CONSOLARO, 2009).

#### FASE INFLAMATÓRIA

A inflamação representa um mecanismo de defesa tecidual próprio dos tecidos conjuntivos e ocorre apenas em tecidos vascularizados, pois depende dos vasos para levar até a região agredida as células e as substâncias necessárias ao controle do agressor e reparar, em seguida, a área afetada (CONSOLARO, 2009). A inflamação pode ser aguda ou crônica. A inflamação aguda se inicia rapidamente (em alguns segundos ou minutos) e tem uma duração relativamente curta, de alguns minutos a várias horas ou alguns dias; suas principais características são a exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos. A inflamação crônica tem uma duração maior e está histologicamente associada à presença de linfócitos e macrófagos, à proliferação de vasos sanguíneos neoformados, fibrose e destruição tissular (ABASS; KUMAR; FAUSTO, 2005).

O controle da intensidade da resposta inflamatória, assim como seu desencadeamento, é realizado à custa de substâncias conhecidas como mediadores químicos. Esses mediadores podem ser detectados no plasma, sob a forma de pré-enzimas, estocados no interior de células, ou serem sintetizados durante o processo inflamatório. Eles são classificados nos seguintes

grupos: aminas vasoativas, proteínas plasmáticas, produtos do metabolismo do ácido araquidônico, fator ativador de plaquetas (PAF), citocinas, entre outros (MONTENEGRO; FECCHIO, 2003).

Além da resposta hemodinâmica, os mecanismos celulares fazem parte do processo inflamatório e, conseqüentemente, do reparo. No exsudato inflamatório, entre os numerosos tipos de mediadores químicos presentes, têm-se aqueles que estimulam a movimentação celular unidirecional dos leucócitos, ou melhor, a quimiotaxia. As células inflamatórias, genericamente, são denominadas células de defesa porque participam também da reação imunológica; suas funções são fundamentais para a manutenção da vida. Os leucócitos podem ser divididos em dois grandes grupos: a) Os polimorfonucleares: participantes mais ativos das inflamações agudas, representados pelos neutrófilos, eosinófilos e basófilos. O estudo da inflamação, quando se refere a polimorfonucleares, imediatamente remete aos neutrófilos. Os eosinófilo e os basófilos são participantes de inflamações muito especiais como nas induzidas por agentes parasitários ou, no contexto de uma reação imunopatológica como a anafilaxia. b) Os mononucleares: típicos da inflamação crônica, são representados pelos macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Apesar da denominação de mononucleares, vários subtipos são derivados, incluindo-se as células gigantes multinucleadas inflamatórias ou CGMIs. Estas células resultam da fusão de macrófagos e estão associadas a reações inflamatórias frente a substâncias insolúveis e corpos estranhos (SIMÕES, 2007; CONSOLARO, 2009).

Uma vez recrutado, o neutrófilo migra, rapidamente, dos vasos sanguíneos para o tecido conjuntivo normalmente desprovido de neutrófilo. Esse processo migratório dura, em média, 8 a 12 minutos. A chegada dos neutrófilos ao local da inflamação inicia-se aproximadamente 90 minutos e constitui um evento essencial na resposta aguda do hospedeiro à invasão de agressores. A atividade principal do neutrófilo é a fagocitose. Outra propriedade funcional importante refere-se à regurgitação enzimática, ou seja, enquanto fagocita, derrama também enzimas proteolíticas para o local, que teriam um papel de degradar o tecido conjuntivo, limpando a área lesada e a liberação de inúmeros mediadores químicos (CONSOLARO, 2009).

Os monócitos do sangue periférico, tanto inicialmente quanto no transcorrer do processo cicatricial, continuam a infiltrar-se no local da ferida em resposta a agentes quimiotáticos para monócitos, como o PDGF, por exemplo. A liberação dos fatores provenientes das plaquetas

contribui para a ativação dos monócitos, transformando-os em macrófagos que são as principais células envolvidas no controle do processo de reparo.

O macrófago ativado é a principal célula efetora do processo de reparo tecidual, degradando e removendo componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanas. Além desse papel na fagocitose e de modo mais importante, os macrófagos ativados também secretam fatores quimiotáticos que atraem outras células inflamatórias ao local da ferida e produzem prostaglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores, afetando a permeabilidade dos microvasos. Os macrófagos produzem vários fatores de crescimento, tais como o PDGF, o TGF- $\beta$ , o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o VEGF, que se destacam como as principais citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação (COUTINHO NETO; MEDONÇA, 2009).

Os linfócitos e plasmócitos constituem população de células associada à resposta imune. Eles se originam na medula óssea, posteriormente colonizam os órgãos do sistema linfóide onde se reproduzem, desempenham papel importante não só nas inflamações primariamente relacionadas à resposta imunitária, como também pelos seus numerosos produtos, as linfocinas (linfócitos T) e imunoglobulinas (linfócitos B, plasmócitos) participam também das reações inflamatórias não imunes (MONTENEGRO; FECCHIO, 2003).

#### FASE PROLIFERATIVA

A proliferação é a fase responsável pelo fechamento da lesão propriamente dita, ela compreende: reepitelização, que se inicia horas após a lesão, com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem como de apêndices epiteliais localizados no centro da lesão; neoformação vascular, que compõe o chamado tecido de granulação responsável pela ocupação do tecido lesionado cerca de quatro dias após a lesão. No final da limpeza da área lesada, os fibroblastos começam a produzir a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular, enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (COUTINHO-NETO & MEDONÇA, 2009).

Após a eliminação do agente agressor, inicia-se a reabsorção do exsudato inflamatório e dos restos celulares, teciduais, microbianos e outros. Na fase da reabsorção, a ação celular é feita, predominantemente, pelos macrófagos, em função de sua maior capacidade fagocitária e de digestão dos detritos. As áreas desocupadas pela reabsorção dos restos teciduais e do

exsudato previamente envolvido na eliminação do agressor passam a ser ocupadas por um exsudato renovado, rico em fibrina, cuja trama organizacional tem grande importância por funcionar como um verdadeiro andaime para sustentação e guia das células proliferantes e migrantes, originárias das margens teciduais vizinhas à área comprometida. Nesta fase da reabsorção, soma-se à rica rede de fibrina a presença da fibronectina. Estas glicoproteínas atuam como verdadeira matriz tecidual primitiva, estimulando a migração e a adesão celular nos vários componentes teciduais. As fibronectinas funcionam como proteínas de ancoragem aos fibroblastos e macrófagos e são encontradas no plasma, lâmina basal e na matriz extracelular de tecidos conjuntivos (CONSOLARO, 2009).

Outra substância produzida em grande quantidade neste segundo estágio é o ácido hialurônico, um polissacarídeo glicosaminoglicano não sulfatado com facilidade de se ligar à água, que auxilia na resistência do tecido à compressão. A fibronectina e o ácido hialurônico predominam na matriz durante a primeira fase do reparo, pois esta combinação propicia um microambiente eficiente para a movimentação das células, importante nesta etapa. À medida que o processo de maturação da ferida avança, a concentração de ácido hialurônico diminui e aumenta a síntese de proteoglicanos ou glicosaminoglicanos sulfatados. Essa modificação na composição da MEC favorece a fixação e imobilidade das células favorecendo a diferenciação delas para fenótipos mais maduros. Os fibroblastos são as células que passam por mudanças fenotípicas mais acentuadas. De fenótipos de células imaturas e replicativas no início do processo, passam para fenótipo característico de células ativamente engajadas na síntese proteica. Com isto, eles passam a secretar grandes quantidades de colágeno. O colágeno aos poucos substitui os proteoglicanos e a fibronectina até se tornar o principal componente da cicatriz em formação (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A atividade das plaquetas e dos macrófagos promove a liberação local de vários fatores de crescimento, destacando-se o PDGF, EGF, TGF $\beta$  e FGF. Estes mediadores associados a IL-1 $\alpha$  ao TNF são os principais responsáveis pela quimotaxia e proliferação das células endoteliais, estabelecendo-se condições para a angiogênese, em decorrência da formação de brotos vasculares nas paredes dos vasos sanguíneos vizinhos e direcionados para a área a ser reparada. Simultaneamente, os fatores de crescimento também estimulam a proliferação e migração dos fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas do tecido conjuntivo vizinho para a área lesada (CONSOLARO, 2009).

Entre o terceiro e quinto dia, o conjunto formado pelos fibroblastos jovens e vasos neoformados, estroma frouxo com edema e células mononucleadas recebe o nome de tecido de granulação. De permeio aos fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas e vasos neoformados, o tecido de granulação apresenta infiltração de neutrófilos, leucócitos mononucleares macrófagos, linfócitos e ocasionalmente plasmócitos. Eventualmente, outros tipos de leucócitos podem estar presentes de forma aleatória e isolada, como eosinófilos e mastócitos. A evolução do tecido de granulação promove um aspecto mais brancacento e firme, e, no período médio de 14 a 21 dias, há redução do número de vasos sanguíneos; aumenta o número de fibroblastos maduros e há produção de fibras colágenas, notando-se ocasionais macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Após este período, o tecido de granulação dá origem a um tecido conjuntivo fibroso ainda não totalmente maduro e que sofrerá um processo de maturação e remodelação (CONSOLARO, 2009).

#### FASE DE REMODELAÇÃO TECIDUAL

Esta fase é marcada por maturação dos elementos e alterações na matriz conjuntiva extracelular, ocorrendo o depósito de proteoglicanas e colágeno. Em fase mais tardia, os fibroblastos do tecido de granulação transformam-se em miofibroblastos, comportando-se como um tecido contrátil responsivo aos agonistas que estimulam a proteína do músculo liso. O processo de contração consiste na diminuição da distância das margens da ferida durante o processo de reparo, o que pode ser observado, especialmente na pele e mucosas (COUTINHO NETO; MEDONÇA, 2009; CONSOLARO, 2009).

Na fase final do reparo, o colágeno sofre um processo de maturação; de uma fase inicialmente solúvel e desorganizada, passa a insolúvel e organizada. No tecido em processo de reparo, os colágenos mais encontrados são do tipo I e III. O colágeno III é o encontrado, abundantemente, nos tecidos embrionários e é abundante na fase mais inicial da fibrose, embora não predominantemente. Na remodelação do tecido cicatricial, a maior parte do colágeno tipo III presente é substituída pelo colágeno tipo I que predomina e caracteriza um tecido conjuntivo fibroso maduro. O colágeno tipo III tem uma estruturação mais delicada, com fibras colágenas finas e uma trama organizacional reticular, enquanto o tipo I apresenta-se com fibrilas bem constituídas e largas, sendo largamente encontrada na derme normal (CONSOLARO, 2009).

Alguns fatores de crescimento que estimulam a síntese do colágeno e outras moléculas de tecido conjuntivo também modulam a síntese e ativação de metaloproteinases, enzimas que

degradam esses componentes da MEC. O equilíbrio entre a síntese e a degradação da MEC resulta na remodelação da estrutura do tecido conjuntivo, um aspecto importante na inflamação crônica e reparação da ferida. É consenso atualmente que o reparo completo de uma ferida somente pode ser considerado depois de concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular. Este processo ocorre lentamente levando muitos meses ou às vezes anos e, mesmo assim, uma cicatriz cutânea completamente madura possui apenas 70% da resistência da pele normal. O processo de remodelamento da cicatriz envolve etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibrilas de colágeno. A deposição do colágeno é feita a princípio de forma aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas no tecido. ( KUMAR; ABASS; FAUSTO, 2005; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005)

A reepitelização, que é o fechamento da ferida por novo epitélio e consiste tanto na migração quanto na proliferação dos queratinocitos a partir da periferia da lesão, também ocorre durante a fase proliferativa. Esses eventos são regulados por três principais agentes: fatores de crescimento, citocinas, integrinas e metaloproteases. Durante a fase inflamatória, a liberação de fatores de crescimento por plasma, fibroblastos e macrófagos/ neutrófilos ativa os queratinocitos localizados nas margens e no interior do leito da ferida. Dentre os fatores de crescimento, destacam-se o PDGF, que induz a proliferação de fibroblastos com consequente produção da matriz extracelular e sua reorganização, o KGF7, que é considerado o principal regulador da proliferação dos queratinocitos, assim como o TGF- $\beta$ , principal responsável pelo estímulo inicial da migração das células epiteliais. A ativação de receptores de integrinas pelos queratinocitos permite a interação com uma variedade de proteínas da matriz extracelular na margem e no leito da ferida. Por outro lado, a expressão e ativação de metaloproteases promovem a degradação e modificação das proteínas da matriz extracelular no sítio da ferida, facilitando a migração celular. A própria atividade proteolítica dessas enzimas pode liberar fatores de crescimento ligados à matriz extracelular, de forma a manter constante o estímulo à proliferação e migração dos queratinocitos, acelerando o processo de reepitelização (COUTINHO-NETO; MEDONÇA, 2009).

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 GERAL

Estudar a dinâmica da matriz conjuntiva extracelular em torno de tubos de polietileno contendo dois materiais retrobturadores, Sealapex Consistente e o MTA, em tecido subcutâneo: Estudo experimental histológico e de imunofluorescência indireta.

### 5.2 ESPECÍFICOS

Estudar os aspectos histomorfológicos do processo inflamatório/reparativo em torno dos materiais retrobturadores;

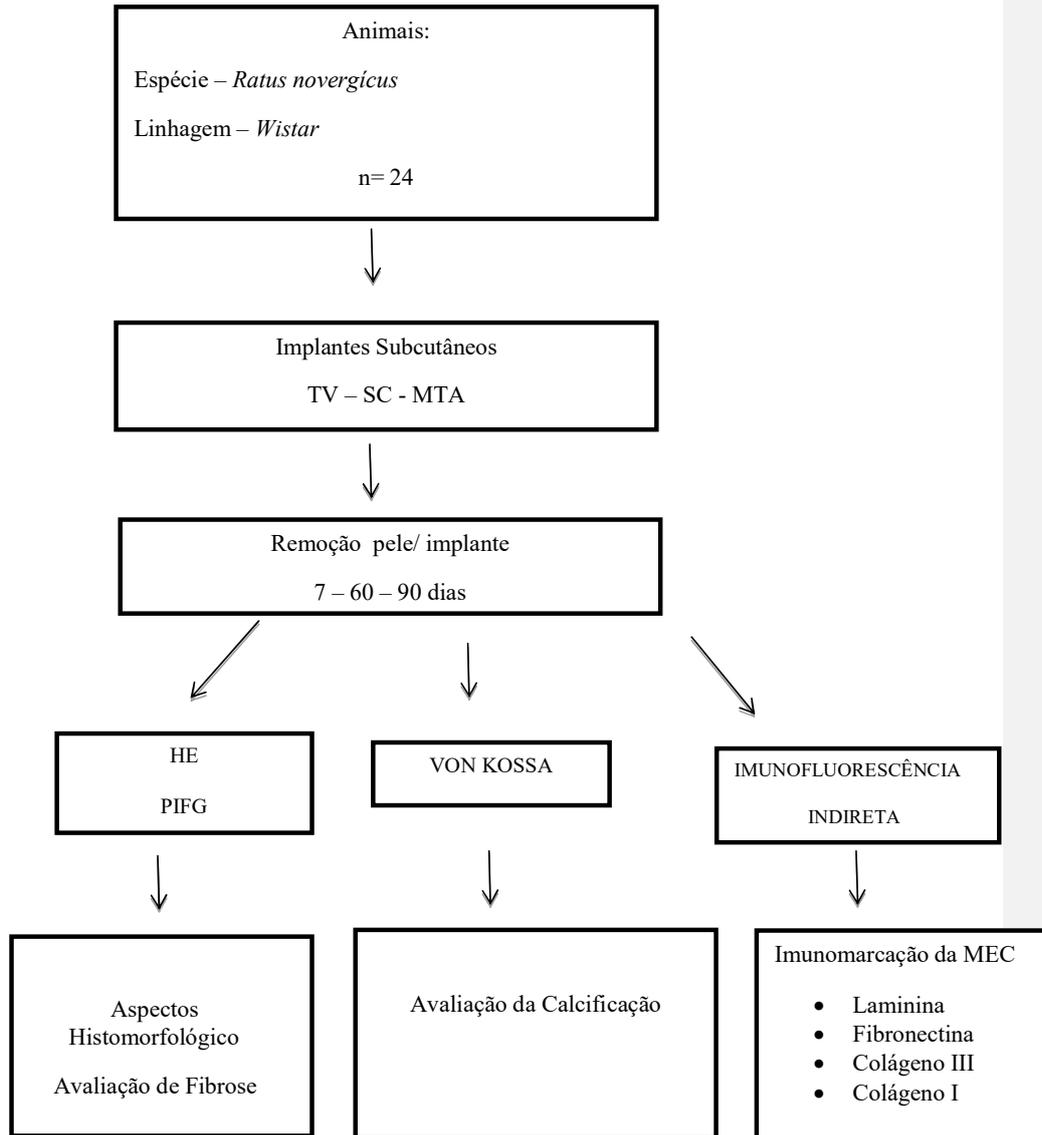
Pesquisar os colágenos estruturais (tipo III e tipo I ) no processo reparativo em torno dos materiais;

Estudar as glicoproteínas não colágenas (fibronectina e laminina) no microambiente em torno dos materiais;

Analisar o potencial de mineralização dos materiais retrobturadores.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 DESENHO EXPERIMENTAL IN VIVO



## 6.2 CIMENTOS

### 6.2.1 mta cinza

O pó do MTA, que endurece em presença de umidade, consiste de finas partículas hidrofílicas, cujos componentes principais são silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico, óxido de silicato e óxido de bismuto (LEE; MONSEF; TORABNEJAD, 1993; TORABINEJAD, et al. 1995; CAMILLERI; PIT FORD, 2006; CAMILLERI, 2008; WAES; STEFFEN, 2009; CINTRA, et al., 2012)

### 6.2.2 sealapex

O Sealapex é composto de uma pasta base (óxido de cálcio, óxido de zinco e composto à base de sulfanamida e sílica) e uma pasta catalisadora (sulfato de bário, resina polimetileno, metilsalicilato, dióxido de titânio, sílica e pigmentos e salicilato de isobutila) (LEONARDO, et al, 2003).

### 6.2.3 sealapex consistente

O Sealapex consistente é formado pela adição de óxido de zinco ao cimento Sealapex. A incorporação do óxido de zinco (ZnO) ao cimento endodôntico é feita aos poucos e é realizada até que o cimento adquira a consistência de “massa de vidraceiro”. Segundo a bula que acompanha o produto, o óxido de zinco apresenta-se puro (LUIZ, 2003; BERNABÉ; HOLLAND, 2004; TANOMARU FILHO, et al. 2006; LEAL; BAMPA; NETO, 2008).

### 6.3 OBTENÇÃO DOS TUBOS

Foram utilizados 72 tubos de polietileno, esterilizados em autoclave, obtidos a partir de pincéis descartáveis (Fig. 1), apresentando uma extremidade aberta e outra fechada. Na extremidade fechada foi realizado um corte transversal de modo que o tubo ficasse com 10 mm de comprimento, permanecendo com 2mm diâmetro interno e 3 mm de diâmetro externo.

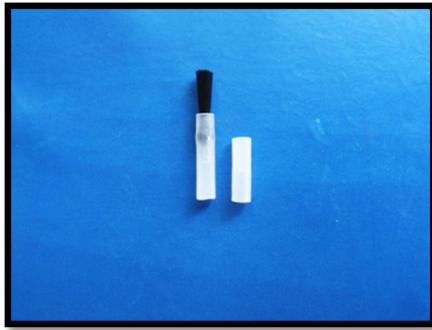


Figura 1- Tubos de polietileno obtidos a partir de pincéis descartáveis

### 6.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS DA PESQUISA

Antes de começar os experimentos, o projeto de pesquisa deste trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Feira de Santana (CEUA - UEFS Protocolo nº 012/2008), aprovado em 28//12/2008 (Anexo B). Entretanto, para que esta mesma pesquisa pudesse ser desenvolvida na Fiocruz-Ba, este projeto teve que ser apresentado, novamente, ao Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CEUA-CPqGM Protocolo nº 023/2009), também aprovado em 20/1/2009. (Anexo C).

### 6.5 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Para realização desta pesquisa, foram utilizados ratos procedentes do Biotério do Centro do Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz-Ba. Foram utilizados 24 ratos da espécie *Ratus norvegicus* e linhagem *Wistar*, machos, de 300g a 450g de peso, com idade entre três a quatro

meses. Os animais foram acondicionados em caixa de acrílico, distribuídos aleatoriamente em grupos de dois animais para cada caixa, recebendo alimentação através de dieta balanceada e água *ad libitum*. As caixas foram identificadas conforme o grupo e períodos experimentais, higienizadas, colocadas em ambiente arejado e iluminado. Os animais foram identificados na cauda utilizando marcador permanente para retroprojeter. Eles foram mantidos a temperatura média de 22°C, ciclo claro/escuro de 12 h e condições normais de umidade.

#### 6.6 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Nesta pesquisa foram utilizados 24 ratos distribuídos de acordo com cada protocolo. Assim, para o protocolo de estudo em cortes histológicos corados com as técnicas de hematoxilina e eosina, PIFG, e Von Kossa, foram utilizados 18 ratos, divididos em grupos de seis animais para cada período experimental de sete, 60 e 90 dias. De cada período foram obtidas seis amostras de cada material (quadro 1). Para o estudo da imunofluorescência indireta, foram utilizados seis ratos distribuídos em grupo de três para apenas os períodos de observação de sete e 90 dias. Assim, de cada período do experimento, foram obtidas três amostras para cada material (quadro 2). Os períodos de sete e 60 dias foram escolhidos a fim de observar a evolução do quadro reacional frente aos materiais em teste, precocemente (sete dias) e de 90 dias para avaliar o mecanismo reparativo num período mais longo.

Quadro 1- Distribuição dos animais e amostras em função dos períodos experimentais e materiais analisados – Protocolo de cortes histológico.

Períodos dias	Números de Animais	Grupos	Número de Amostras
7	6	I – Controle (TV)	6
		II- Sealapex Consistente	6
		III- MTA	6
60	6	I – Controle (TV)	6
		II- Sealapex Consistente	6
		III- MTA	6
90	6	I – Controle (TV)	6
		II- Sealapex Consistente	6
		III- MTA	6
Total	18		54

Quadro 2- Distribuição dos animais e amostras em função dos períodos experimentais e materiais analisados. Protocolo de Imunofluorescência Indireta.

Períodos dias	Números de Animais	Grupos	Número de Amostras
7	3	I – Controle (TV)	3
		II- Sealapex Consistente	3
		III- MTA	3
90	3	I – Controle (TV)	3
		II- Sealapex Consistente	3
		III- MTA	3
Total	6		18

## 6.7 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais foram anestesiados seguindo o protocolo do biotério da Fiocruz-Ba. A dose recomendada do anestésico cetamin (cloridrato de cetamina) foi de 50mg/kg, enquanto a do relaxante muscular, analgésico e sedativo da marca rompum (cloridrato de xilazina) foi de 10mg/kg. Os ratos foram pesados e, através de uma fórmula utilizada pelo biotério, foi preparada uma solução anestésica com volume proporcional de soro fisiológico, quetamina e xilazina. Em cada animal, via intraperitoneal, foi aplicada 0,1ml/grama de peso vivo da solução anestésica.

Após anestesia, utilizou-se lâmina de barbear montada em uma navalha para realizar a tricotomia da região dorsal (figura 2 A). Em seguida, a antissepsia da área desprovida de pelos foi realizada com gaze embebida em solução aquosa de Polivinilpirrolidona Iodo (PVPI) 10% (figura 2 A). Três incisões transversais de 15mm de extensão foram realizadas, com lâminas de nº 15, montadas em cabo de bisturi. Após incisão, foi realizada uma divulsão (figura 2 B) no tecido celular subcutâneo, utilizando uma pinça hemostática curva, com ponta romba, de modo que fosse criada uma loja cirúrgica com extensão aproximadamente de 25mm. No grupo experimental, os cimentos foram manipulados de acordo às recomendações de seus fabricantes utilizando-se uma espátula e placa de vidro esterilizada, depois colocados no interior dos tubos de polietilenos, com auxílio de uma espátula de inserção e calcadores para dentística. Tubos contendo os materiais foram inseridos dentro das lojas cirúrgicas utilizando uma pinça clínica. Tubos vazios foram inseridos servindo como controle. Os tubos de polietileno permaneceram transversais às incisões, com sua abertura direcionada para a cabeça do animal (figura 2 C).

Na região dorsal, cada rato recebeu três implantes, sendo dois na região pélvica e um na região escapular. Dos três tubos implantados, dois tubos foram preenchidos pelos diferentes cimentos teste, e um tubo foi implantado vazio, obedecendo a uma ordem de colocação previamente determinada, anotada em ficha própria do biotério, havendo um sistema de rodízio em relação às regiões anatômicas (VALERA, et al. 2004, VALERA, et al. 2005), denominadas de A, B e C: (A) região central da escápula, (B) lado esquerdo da região pélvica e (C) lado direito da região pélvica (figura 2 A). Os tubos de polietilenos foram previamente desinfetados por imersão em álcool 77°, lavados em água destilada, secos e esterilizados em autoclave. Após a inserção dos tubos, foi realizada sutura utilizando fio de nylon nº5, visando aproximação dos bordos da incisão (figura 2 D). Novamente foi realizada antissepsia da área

dorsal e os animais foram colocados em caixas individuais e expostos à luz para melhor recuperação pós anestesia. Os ratos foram identificados nas caudas com marcação de 1 a 24, utilizando-se de marcador permanente. Aguardou-se a recuperação pós-anestesia dos animais e só então foram colocados nas gaiolas segundo o agrupamento prévio de dois ratos por gaiola e depois alimentados com dieta balanceada e água ad libitum. Após os procedimentos cirúrgicos, todos os ratos receberam uma dose de dipirona sódica líquida diluída na água, ajustada com os pesos dos animais. Os animais foram monitorados por todo o estudo por médica veterinária responsável pelo biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fiocruz Bahia e pelo doutorando.

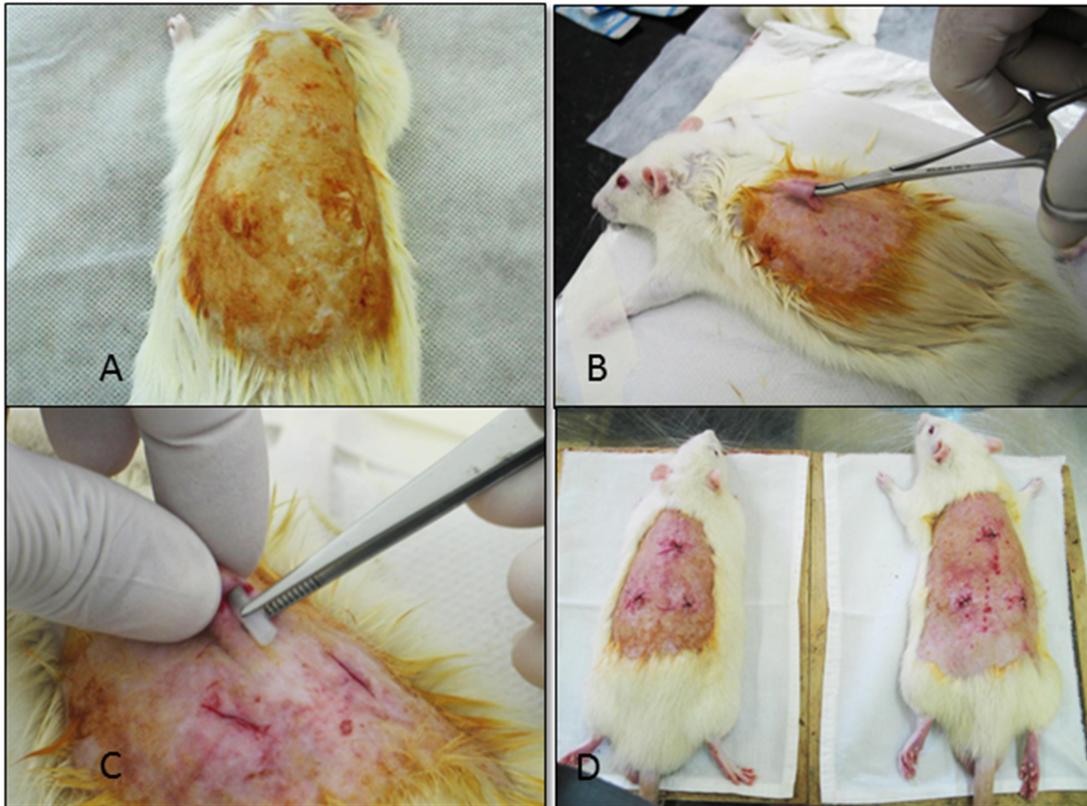


Figura 2- Sequência do procedimento cirúrgico. (A) Tricotomia e antisepsia da pele com PVPI; (B) Incisão da pele e divulsão do tecido celular subcutâneo; (C) Implantes do tubo com o material experimental ou tubo vazio no espaço divulsionado; (D) Sutura da loja cirúrgica com fio de nylon n 5

## 6.8 MORTE DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS TECIDUAIS

Decorridos os períodos experimentais, os animais foram mortos na câmara de CO<sub>2</sub>, de acordo ao protocolo do biotério da Fiocruz. Depois de confirmada a morte, os animais foram levados à mesa cirúrgica e novamente tricotomizados na região dorsal e antissépiados com solução aquosa de Polivinilpirrolidona Iodo (PVPI) 10%. As regiões correspondentes aos implantes foram localizadas por palpação, demarcadas com canetas e com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15 montada em um cabo e tesoura foram removidas em blocos, envolvendo pele e hipoderme contendo o implante. A escolha dos animais, na obtenção das amostras para o protocolo de imunofluorescência de cortes congelados e cortes parafinizados foi feita de forma aleatória, conforme a codificação pré-estabelecida.

## 6.9 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E

### IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Os blocos removidos contendo os tubos e os tecidos adjacentes, destinados para as colorações HE, PIFG e Von Kossa, foram distendidos sobre um recorte de isopor fino, presos com alfinetes para mapas e depois colocados em frascos individuais identificados contendo solução de formol tamponado a 10% por 72 horas. Os frascos foram identificados através do grupo, número do animal, tempo do experimento e a localização do implante.

Na obtenção das amostras para serem utilizadas na técnica de imunofluorescência indireta, os tubos de polietilenos contendo o material experimental e o controle foram removidos das amostras antes do congelamento do tecido. No lado da peça por onde foi removido o tubo, foi realizada uma marcação com tinta nanquim, para que durante a confecção dos blocos congelados e no momento do corte no criostato fosse possível distinguir a área de interesse do estudo.

## 6.10 PROCESSAMENTO LABORATORIAL

### 6.10.1 Protocolo histotécnico para cortes histológicos

Os blocos teciduais, após fixados, foram removidos do formol tamponado a 10%, a seguir foram removidos os excessos de tecidos deixando-os com uma forma retangular. Após identificação do lado fechado do tubo, foi realizado um corte transversal, utilizando lâmina de bisturi nº15 acoplada em um cabo, de modo que, utilizando-se de uma pinça, fosse possível a remoção do tubo, sem danificar a área de estudo. Após remoção do tubo, para melhor identificação da área de interesse, neste mesmo lado, foi realizado um corte transversal de maior extensão eliminando-se a metade não relevante, diminuindo o tamanho da amostra. A seguir um corte no sentido longitudinal foi realizado de modo que a região do tubo contendo o material fosse dividida, junto com o tecido, em duas partes iguais, desta forma foram obtidas duas secções de cada amostra. As peças obtidas foram colocadas em cassetes, identificadas e colocadas novamente na solução de formol tamponado 10% e encaminhada para o processamento laboratorial.

Depois destas fases, as peças foram desidratadas imergindo os blocos de tecidos em concentrações crescentes de álcool etílico. A seguir foi realizada a diafanização utilizando a solução de xilol e posteriormente as peças foram incluídas em parafina. Depois da obtenção dos blocos de parafina, cortes histológicos de 5µm de espessura foram obtidos sem um micrótomo e corados pela técnica de rotina Hematoxilina/Eosina (H/E) e por técnica específica para colágeno (PIFG). Algumas secções foram coradas pela técnica de Von Kossa para observar estruturas mineralizadas nos tecidos. A análise histológica foi realizada em microscópio óptico ZEISS/ AXIOSCOP.

### **6.10.2 Congelamento do tecido para técnica de imunofluorescência indireta.**

Antes de começar a inclusão e congelamento do tecido, as etiquetas de identificação e os moldes de papel alumínio foram preparados. No mesmo dia e hora em que foram obtidas as amostras, o congelamento do tecido foi realizado. Primeiro, os moldes retangulares de papel laminado foram selecionados e preenchidos com tissue-tek, a seguir, utilizando uma pinça, foi realizada a inclusão vertical do tecido de modo que as camadas epiderme, derme e hipoderme fossem acomodadas. Depois, na extremidade do molde, no lado onde foi realizado o corte para remoção do tubo, foi colocada a etiqueta de identificação, de forma a mantê-la sempre na parte superior. De forma cuidadosa, o molde foi levado para o congelamento em N<sub>2</sub> líquido (“snap-freezing”), sendo sustentado com a pinça na parte da etiqueta, mantendo inicialmente somente a parte inferior do bloco no gás. O congelamento foi realizado, até obter o bloco totalmente congelado. Prontos os blocos, estes foram mantidos no nitrogênio líquido até sua transferência para o freezer -70° em caixas apropriadas, aguardando o momento de serem utilizados.

### **6.10.3 Técnica de imunofluorescência indireta para cortes de tecidos congelados**

Para obtenção de cortes de blocos teciduais congelados, foi utilizado um criostato da marca LEICA CM 1850. Após ligar o criostato, foi verificada a temperatura ideal de acordo com o tipo de tecido. No caso de tecido subcutâneo de rato, predominantemente adiposo, foi selecionada a temperatura entre -30° C a -25° C. Os blocos foram retirados do freezer -70°C e acondicionados em N<sub>2</sub> líquido.

Após retirar o bloco do nitrogênio líquido, este foi mantido dentro do criostato, adaptado ao porta bloco e levado para o suporte de corte. Após alguns ajustes, a navalha descartável foi colocada e cortes de tecidos, de 5 a 7 µm, foram realizados. De cada amostra foram obtidos doze cortes. A seguir as lâminas com os cortes foram depositadas em cubas e mantidas na parte interna do criostato. Após finalizar os cortes de cada amostra, as lâminas com os cortes foram fixadas com acetona pura gelada por 30 minutos e depois acondicionadas em freezer -20°C até o período máximo de sete dias para sua utilização.

No dia da realização da técnica de imunofluorescência Indireta, as lâminas foram retiradas do freezer -20°C e deixadas na temperatura ambiente por 20 minutos. Os cortes foram delimitados com Dako Pen e depois hidratados com PBS por 5 a 10 minutos. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS/BSA de acordo com a padronização do fabricante e dos

testes pilotos realizados. Os anticorpos primários e diluições estão representados na tabela 1. A seguir, cada anticorpo foi aplicado e incubado a 37°C por 1 hora na temperatura ambiente. Depois as lâminas foram lavadas com PBS 3 x 4 minutos e secas cuidadosamente. A seguir o anticorpo secundário (Goat anti-Mouse Ig DyLight488 (Epitomics) cod. 3070-1) acoplado ao corante fluorescente, DyLigt 488, foi aplicado nos cortes, mantendo-se todo o procedimento sob proteção da luz. A diluição do anticorpo secundário foi pré-estabelecida (1/600) e preparada a partir de solução de PBS/ Azul de Evans 1:10. Após colocar o anticorpo secundário, as lâminas foram incubadas na temperatura ambiente por 1 hora. Depois, elas foram lavadas com PBS 3x4 minutos. Para leitura, as lâminas foram montadas utilizando o anti-fade prolong gold antifad reagent with dapi (cod P36931 ) com lamínula. Depois, as lâminas montadas foram acondicionadas em cubas, protegidas da luz e colocadas na geladeira na temperatura de 4°C até o momento da leitura no microscópio óptico de fluorescência OLYMPUS BX 51. As lâminas foram examinadas no mesmo dia da realização da técnica ou eventualmente em até 48 horas.

TABELA 1 - Anticorpos primários utilizados na análise, pela técnica de imunofluorescência, da resposta tecidual aos implantes de materiais retrobturadores em tecido subcutâneo de ratos

Especificidade	Diluição	Origem	Hospedeiro	Clone	Fonte
Fibronectina	1:20	Humano	Coelho	Policlonal	DBS
Laminina	1:50	Rato	Coelho	Policlonal	Dako
Colágeno I	1:80	Rato	Coelho	Policlonal	Meridian
Colágeno III	1:80	Rato	Coelho	Policlonal	Meridian

## 6.11 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Os eventos histomorfológicos foram avaliados por microscopia de luz por um avaliador experiente, juntamente com o orientando. Os preparados histológicos foram codificados e estudados sem que o examinador soubesse a que grupo pertencia. Nos cortes corados pelas técnicas Hematoxilina e Eosina, PIFG e Von Kossa, foram realizadas avaliações descritivas e semi-quantitativas da resposta do tecido conjuntivo em contato com os cimentos; consideraram-se as características teciduais do processo inflamatório e dos fenômenos reparatórios como: natureza e intensidade da reação inflamatória, tecido de granulação, fibrose e presença de calcificação. A natureza da inflamação foi definida como ausente, predominantemente polimorfonuclear, mononuclear, mista ou crônica granulomatosa. Já nos preparados histológicos onde foi utilizada a técnica de imunofluorescência indireta, foi avaliada a matriz conjuntiva extracelular em torno dos materiais retrobturadores implantados e testados, sendo pesquisados a fibronectina, laminina, colágeno tipo III e tipo I. Para avaliar semi-quantitativamente a resposta do tecido conjuntivo em contato com os materiais e os componentes da MEC estudados, foi atribuída graduação com escores de 0 a 3, sendo classificada como: 0 = ausente, 1= discreto (+), 2 = moderado (++) e 3 = intenso (+++) (CINTRA et al., 2012; SILVEIRA, et al., 2011; QUEIROZ, et al., 2011; GOMES FILHO et al., 2009b; PERASSI, et al., 2008; TANOMARU FILHO, et al., 2006; VALERA, et al., 2005). Todos os dados relativos à análise microscópica foram anotados em uma ficha padronizada para cada material e períodos analisados. Uma das principais propriedades biológicas de um material retrobturador é a sua biocompatibilidade, ou seja, quando em contato com o tecido vivo, ele deve permitir ou induzir o reparo tecidual. A biocompatibilidade dos materiais experimentais avaliados nesta pesquisa foi classificada, segundo Costa (2001b), em aceitável ou não aceitável. É aceitável quando há uma discreta ou nenhuma reação tecidual em todos os períodos avaliados ou existe uma moderada ou intensa reação tecidual aos sete dias, a qual se reduz de intensidade com o decorrer do período, atingindo o escore de reação tecidual não significativa aos 60 dias. É considerada não aceitável, quando há uma reação tecidual não significativa ou discreta aos sete dias, sendo que a intensidade desta reação atinge o escore de moderado ou intenso aos 60 dias, ou quando existe uma reação moderada ou intensa em todos os períodos avaliados.

## 6.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis relacionadas aos eventos histomorfológicos analisados, inflamação, tecido de granulação, fibrose, calcificação, expressão de fibronectina, laminina, colágeno tipo I e III, em torno dos materiais retrobturadores foram comparadas entre os grupos e nos diferentes períodos experimentais. Tais variáveis foram medidas utilizando uma escala visual analógica, por um patologista experiente, sem que ele soubesse a identificação do grupo apresentando-se numa escala ordinal, fornecendo dados qualitativos.

A comparação dessas variáveis entre os cimentos Sealapex Consistente (SC), Agregado de Tióxido Mineral (MTA) e tubo vazio de polietileno como controle (TV) foi realizada considerando as amostras relacionadas, logo utilizou-se o teste não paramétrico de Friedman. Para avaliação da cinética de reparo de cada cimento nos períodos de sete, 60 e 90 dias, as amostras foram consideradas independentes, já que foram realizadas em animais diferentes. Logo, o teste não paramétrico de Kruskal Wallis com o pós teste de Dun foi realizado. Na comparação entre as imunofluorescências para diferentes proteínas e glicoproteínas de matriz, nos diferentes grupos e períodos de sete e 90 dias, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados obtidos foram organizados em planilhas do programa operacional Microsoft Excel e a análise estatística foi realizada no *software* GraphPad prism 5.0.

O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo para todos os testes estatísticos efetuados.

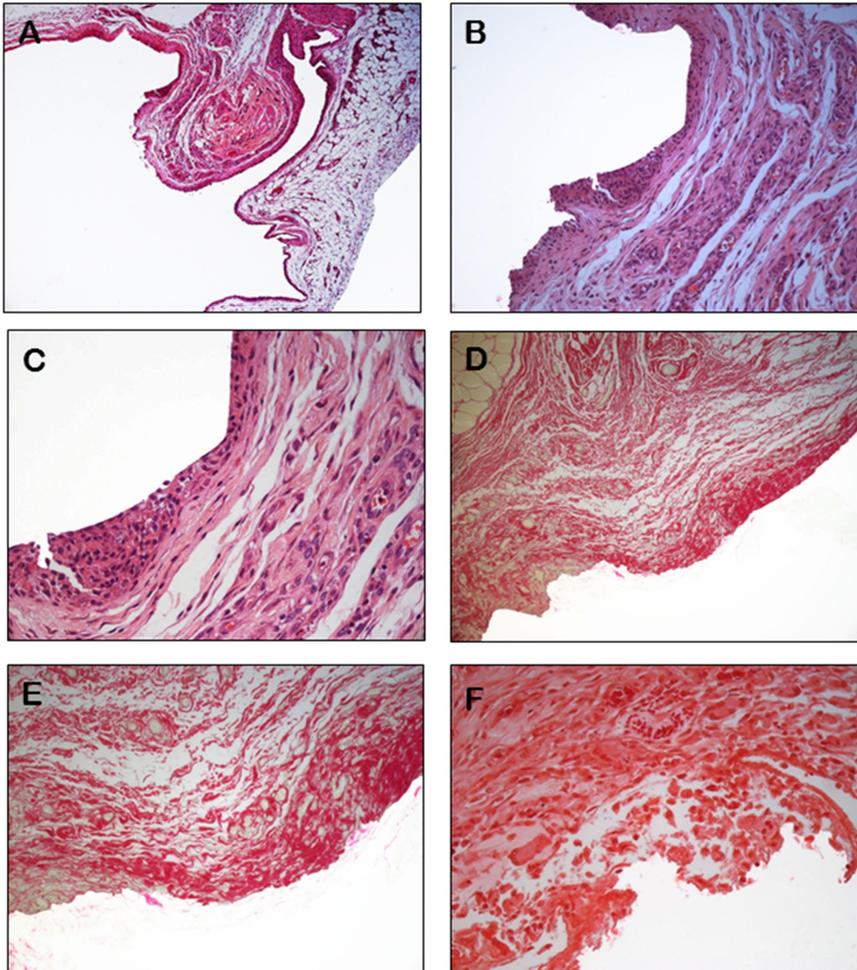
## 7- RESULTADOS

### 7.1 ANÁLISE HISTÓLOGICA E DESCRITIVA DO PROCESSO REPARATIVO E CALCIFICAÇÃO EM TORNO DOS MATERIAIS RETROBTURADORES IMPLANTADOS NO TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Após implantes dos grupos experimentais (MTA e Sealapex Consistente) e controle (tubo vazio), a interpretação dos resultados foi feita de acordo à evolução do quadro reacional presente em contato como os materiais retrobturadores em teste. Através da coloração HE e PIFG, foi possível avaliar a cinética da reação tecidual, observando-se as características histomorfológicas do processo inflamatório e fenômenos reparativos. Através da técnica de Von Kossa, foi observado o potencial de cada material experimental induzir o processo de calcificação no tecido subcutâneo de rato. Os dados dos resultados obtidos estão representados no quadro 3 (p. 82).

#### GRUPO I – TUBO VAZIO - PERÍODO DE SETE DIAS

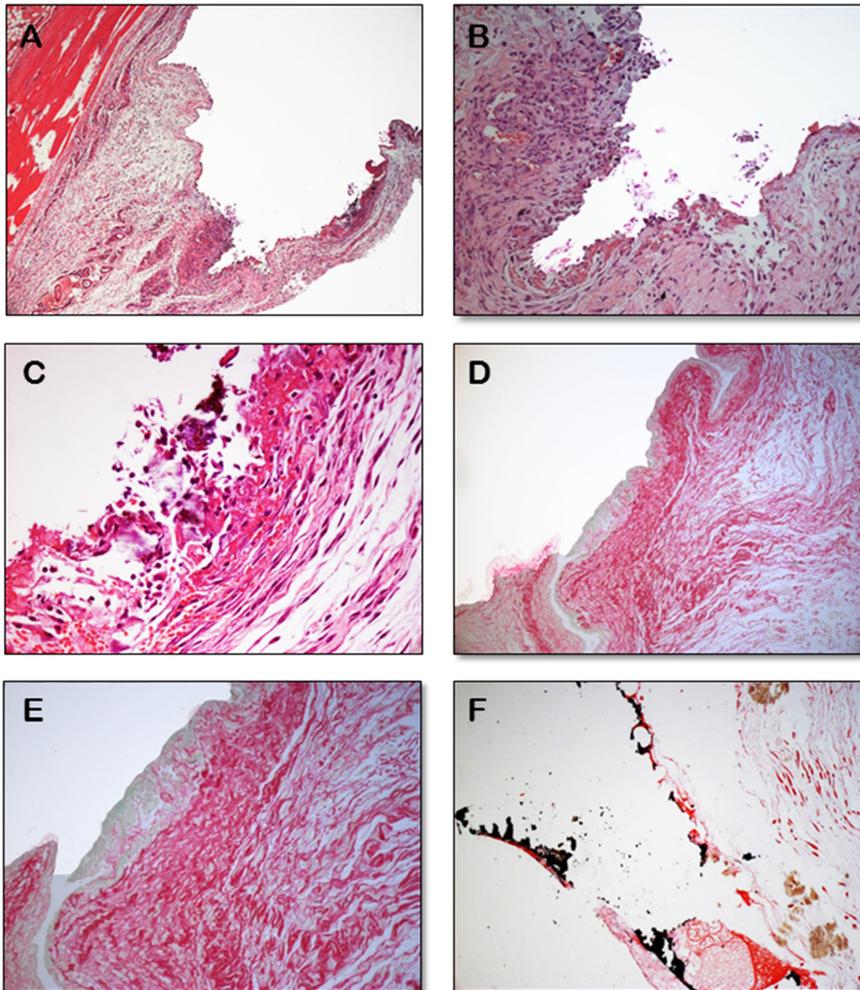
Das seis amostras deste grupo, uma não foi avaliada devido à ausência da região de interesse, provavelmente durante a microscopia esta área tecidual não foi incluída. Assim, em cinco amostras nas regiões de interesse, observou-se, ao redor da luz dos tubos de polietileno, discreta inflamação crônica, sendo em sua maioria discreta (figura 3 A, B, C). Células do tipo mononucleares, macrófagos, linfócitos e plasmócitos foram observadas. Em duas das seis amostras observou-se inflamação mista com presença de alguns neutrófilos dispersos. Em todas as amostras notou-se discreto tecido de granulação, com presença de vasos recém formados. Em três amostras a fibrose foi discreta (figura 3 D, E) e, nas outras duas, uma foi moderada e a outra intensa. Em todas as amostras observou-se ausência de granulações Von Kossa positiva, para o cálcio, próximo a abertura do tubo (figura 3 F)



**Figura 3: Imagens histológica da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo controle (tubo vazio) – 7 dias.** ( A=10x; B=200x; C=400x; HE) parede conjuntiva contendo grau discreto de infiltrado inflamatório crônico e grau discreto de tecido de granulação, observa-se formação de novos vasos. ( D=100x; E=200x; PIFG), presença de tecido conjuntivo fibroso em grau discreto próximo a abertura do tubo. (F=200x; VK), ausência de granulações Von Kossa positiva próximo a abertura do tubo.

**GRUPO 2 – SEALAPEX CONSISTENTE - PERÍODO DE SETE DIAS**

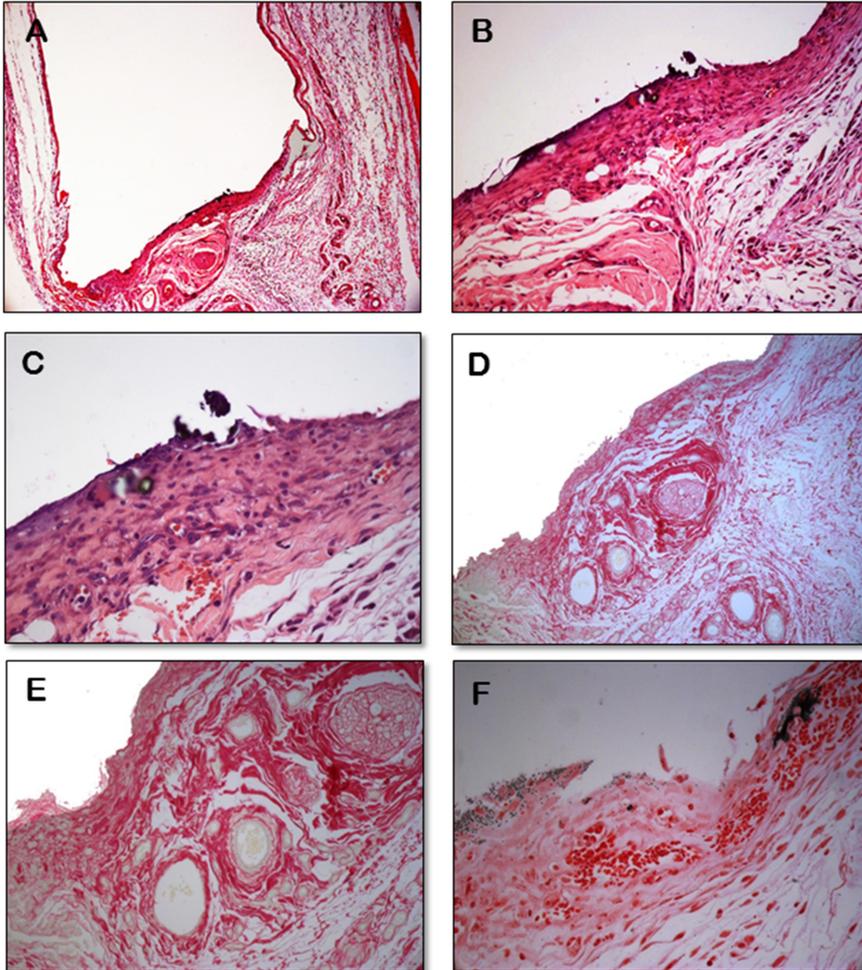
Ao redor da luz do tubo, na maioria das seis amostras, observou-se discreta inflamação crônica com predomínio de macrófagos (figura 4 A, B,C). O tecido de granulação foi discreto em quatro amostras, sendo que em dois espécimes ele apresentou-se moderado. O tecido de granulação, com vasos recém formados, foi discreto em quatro espécimes e moderado em duas. Notou-se uma fibrose moderada (figura 4 D, E) em quatro das seis amostras, sendo discreta nas outras duas. Quatro amostras demonstraram discretas granulações Von Kossa positivas próximas ao material (figura 4 F) e uma em grau moderado.



**Figura 4:** Imagens histológica da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo Sealapex Consistente – 7 dias. (A=10x; B=200x; C=400x; HE), presença de infiltrado inflamatório crônico em grau discreto e de tecido de granulação também em grau discreto. (D=100x; E=200x; PIFG), presença de tecido conjuntivo fibroso em grau moderado. ( F=200x; VK), granulações Von Kossa positiva em grau discreto.

### GRUPO 3 – MTA - PERÍODO DE SETE DIAS

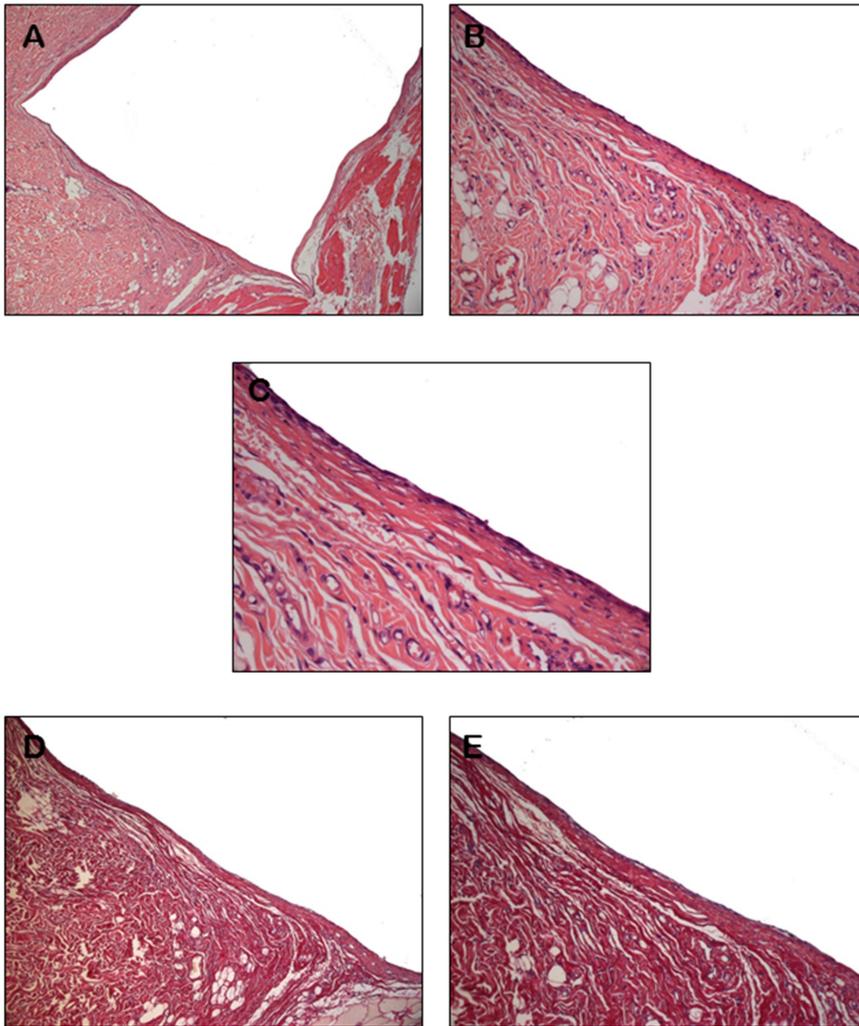
Das seis amostras deste grupo, observou-se, próximo ao material, uma discreta inflamação crônica em cinco espécimes (figura 5 A, B e C), sendo que em uma foi moderada, do tipo linfoplasmocitária com presença de alguns macrófagos. Em duas amostras, a inflamação foi do tipo granulomatosa, e em uma amostra observou-se inflamação mista com alguns neutrófilos. O tecido de granulação imaturo apresentou-se na maioria em grau discreto, com grandes números de vasos recém-formados. A fibrose apresentou-se discreta em metade das amostras, enquanto, na metade restante, mostrou-se moderada (figura 5 D e E). Próximo ao material, observaram-se em quatro das seis amostras discretas (figura 5 F) granulações Von Kossa positiva para o cálcio, em uma amostra foi intensa e em outra estava ausente.



**Figura 5:** Imagens histológicas da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo MTA – 7 dias. ( A=10x; B=200X; C=400X; HE), presença de inflamação crônica e tecido de granulação em grau discreto. (D=100x; E=200x; PIFG), presença de tecido conjuntivo fibroso em grau discreto. (F=200x;VK), granulações Von Kossa positiva em grau discreto.

**GRUPO I - TUBO VAZIO - PERÍODO DE SESSENTA DIAS**

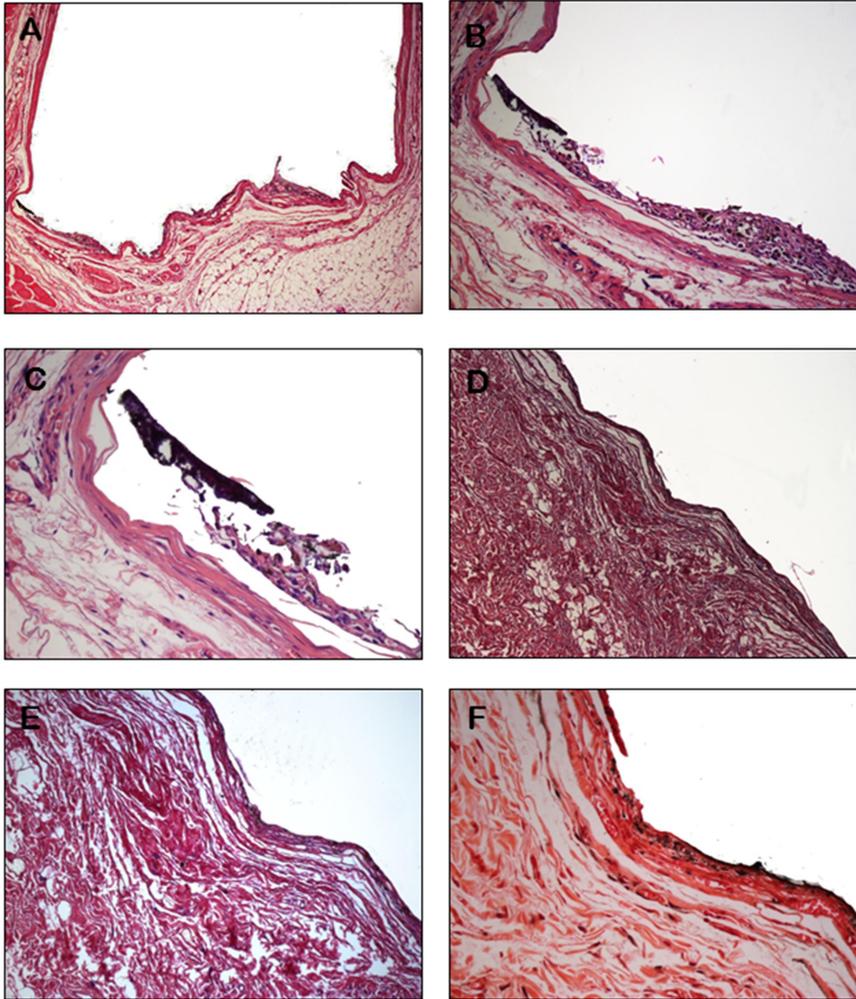
Das seis amostras avaliadas, próximo à luz do tubo vazio, a inflamação estava ausente em quatro espécimes (figura 6 A, B e C). Uma amostra apresentava discreta inflamação crônica do tipo granulomatosa e localizada e outra discreta inflamação do tipo mista com predomínio de macrófagos e eventuais neutrófilos. Em quatro amostras, observou-se discreto tecido de granulação e em duas este tecido estava ausente. A fibrose foi discreta (figura 6 D e E) em quatro amostras e moderada em duas. Em todas as amostras não foram observadas granulações Von Kossa positivo para o cálcio próximo à abertura do tubo.



**Figura 6:** Imagens histológica da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo controle (tubo vazio) – 60 dias. (A= 10x; B=200x; C=400x; HE), ausência de inflamação e presença tecido de granulação em grau discreto. (D=100x; E=200x;PIFG), parede fibrosa evidenciando matriz colagênica em grau discreto.

**GRUPO 2 – SEALAPEX CONSISTENTE – SESSENTA DIAS**

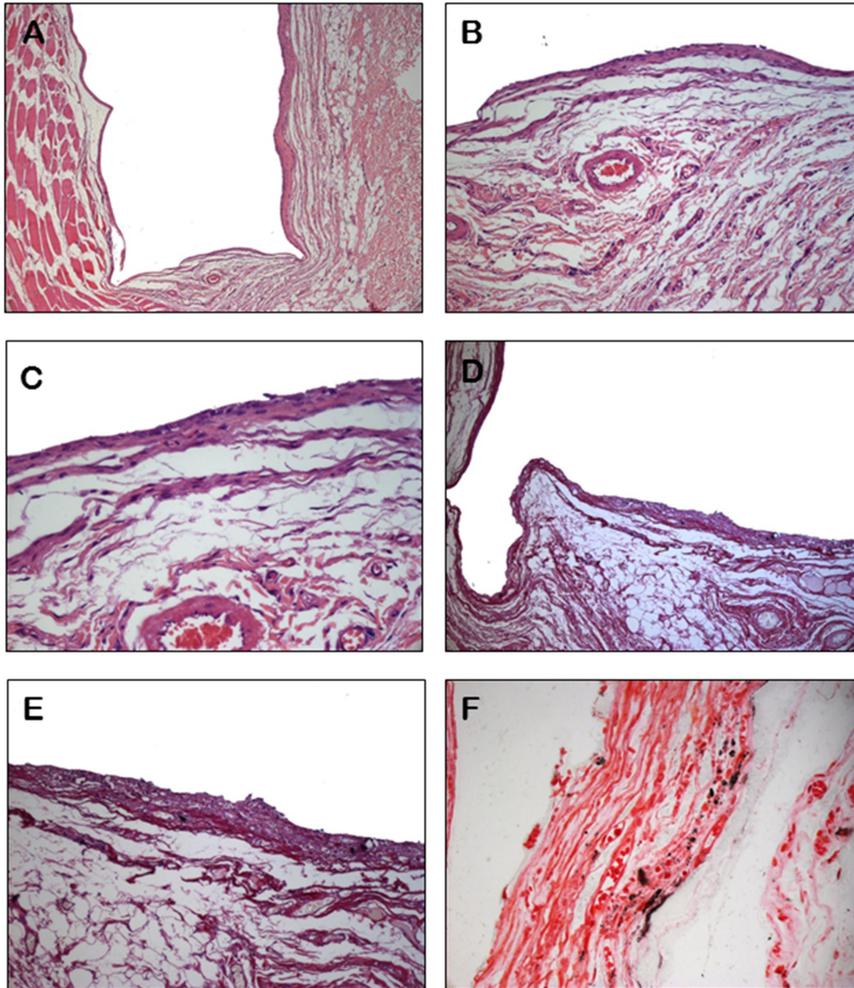
Em torno do tubo, próximo ao material, notou-se uma discreta inflamação crônica com linfócitos, plasmócitos e macrófagos nas seis amostras analisadas (figura 7 A, B e C). Uma das seis amostras apresentou inflamação crônica com células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranha, caracterizando uma reação granulomatosa. Em metade das seis amostras houve discreto tecido de granulação e na outra metade ele estava ausente. A fibrose foi moderada (figura 7 D e E) em quatro amostras e nas outras duas ela foi discreta. Próximo ao material, observou-se discreta quantidade de granulações Von Kossa positiva para o cálcio em três amostras (figura 7 F), nas outras três as granulações positivas foram em grau moderada.



**Figura 7: Imagens histológica da reação do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao implante do grupo Sealapex Consistente – 60 dias. (A=10x; B=200x; C=400x; HE), infiltrado inflamatório mononuclear em grau discreto e tecido de granulação também em grau discreto, com redução do número de vasos. (D=100x; E=200x; PIFG), parede fibrosa, evidenciando-se matriz colagênica em grau moderado. (F= 200X;VK), Próximo a área de contato com o material observou-se granulações Von Kossa positiva em grau moderado.**

### GRUPO 3- MTA- SESSENTA DIAS

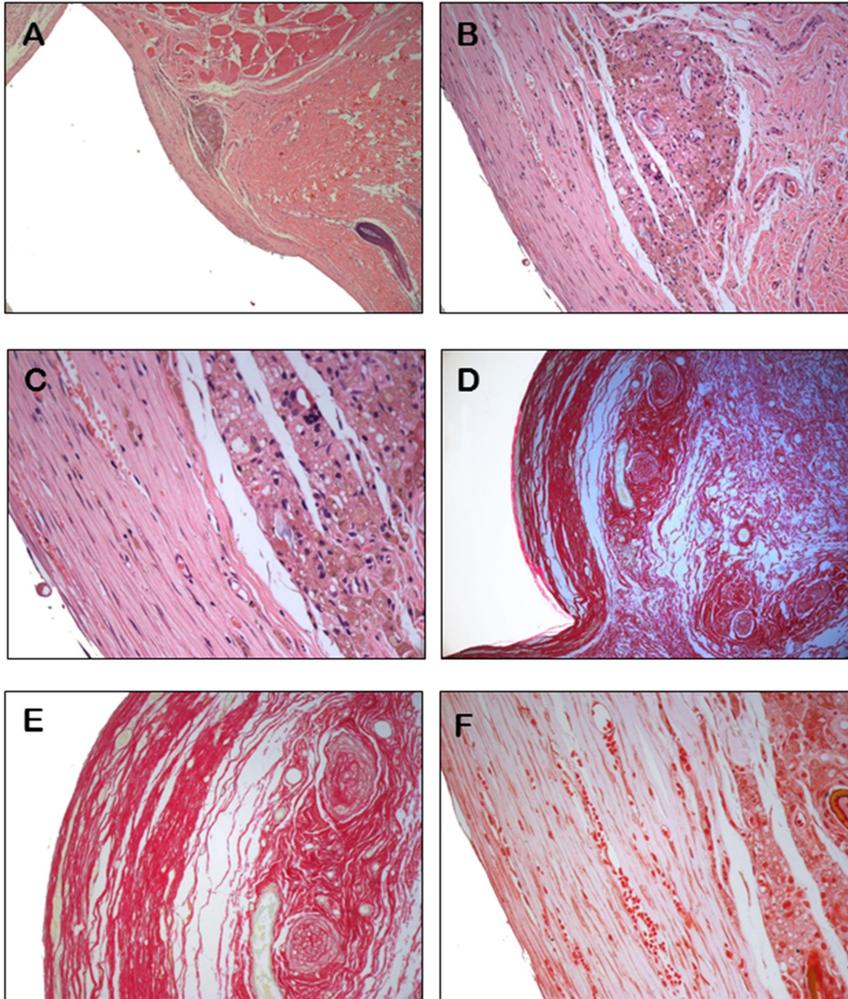
Neste grupo, em torno da abertura do tubo e próximo ao material, observou-se inflamação crônica discreta com predomínio de macrófagos e células gigantes multinucleadas fagocitando material em metade das seis amostras (figura 8 A, B e C). Não foi observada inflamação na outra metade dos espécimes. O tecido de granulação foi discreto na maioria das amostras, em apenas um espécime não foi observada a presença de vasos sanguíneos. Notou-se uma fibrose mais densa variando de grau discreto a intenso, sendo a maioria de grau moderado (figura 8 D e E) . Granulações Von Kossa positiva para o cálcio foram observadas em duas amostras, em intensidade discreta e moderadas (figura 8 F).



**Figura 8:** Imagens histológica da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo MTA - 60 dias. (A=10x; B=200x; C=400x; HE), inflamação crônica em grau discreto com predomínio de macrófago e tecido de granulação também em grau discreto, próximo a área ocupada pelo material. (D=100x; E=200x; PIFG), presença de parede fibrosa em grau moderado. (F=200x; VK), granulações Von Kossa positiva em grau discreto, próximo a abertura do tubo.

**GRUPO I - TUBO VAZIO- 90 DIAS**

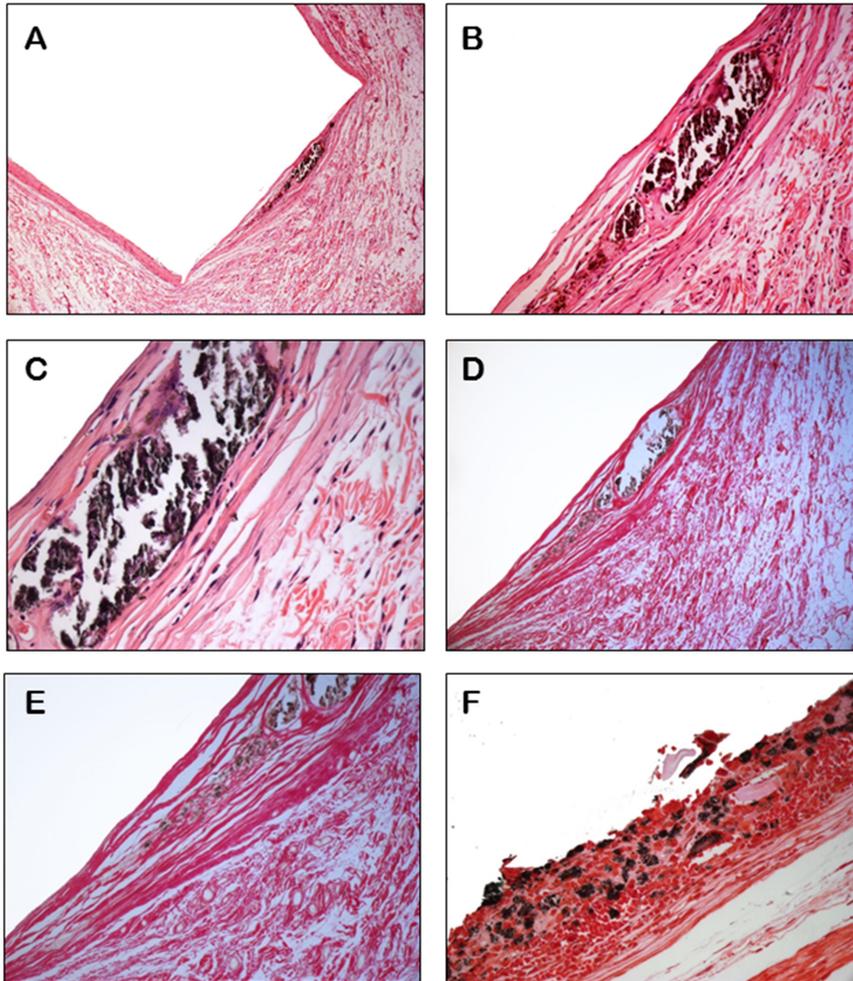
Todas as amostras deste grupo mostraram inflamação crônica em grau discreto (figura 9 A, B e C), assim como o tecido de granulação. A população de vasos sanguíneos apresenta-se diminuída. Na maioria dos espécimes, a fibrose apresentava-se mais densa, variando intensidade de discreta a intensa, sendo na maioria delas em grau moderado ( figura 9 D e E). Granulações Von Kossa positiva para o cálcio estavam ausentes em todas as amostras avaliadas (figura 9 F).



**Figura 9: Imagens histológica da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo controle (tubo vazio) – 90 dias.** (A=10x; B=200x; C=400x; HE), próximo a abertura do tubo observou-se infiltrado inflamatório crônico em grau discreto com diminuição do número de vasos sanguíneos. (D=100x; E=200x; PIFG), presença de parede fibrosa evidenciando-se matriz colagênica em grau moderado. (F=200x; VK), ausência de granulações Von Kossa positiva.

**GRUPO 2 – SEALAPEX CONSISTENTE – 90 DIAS**

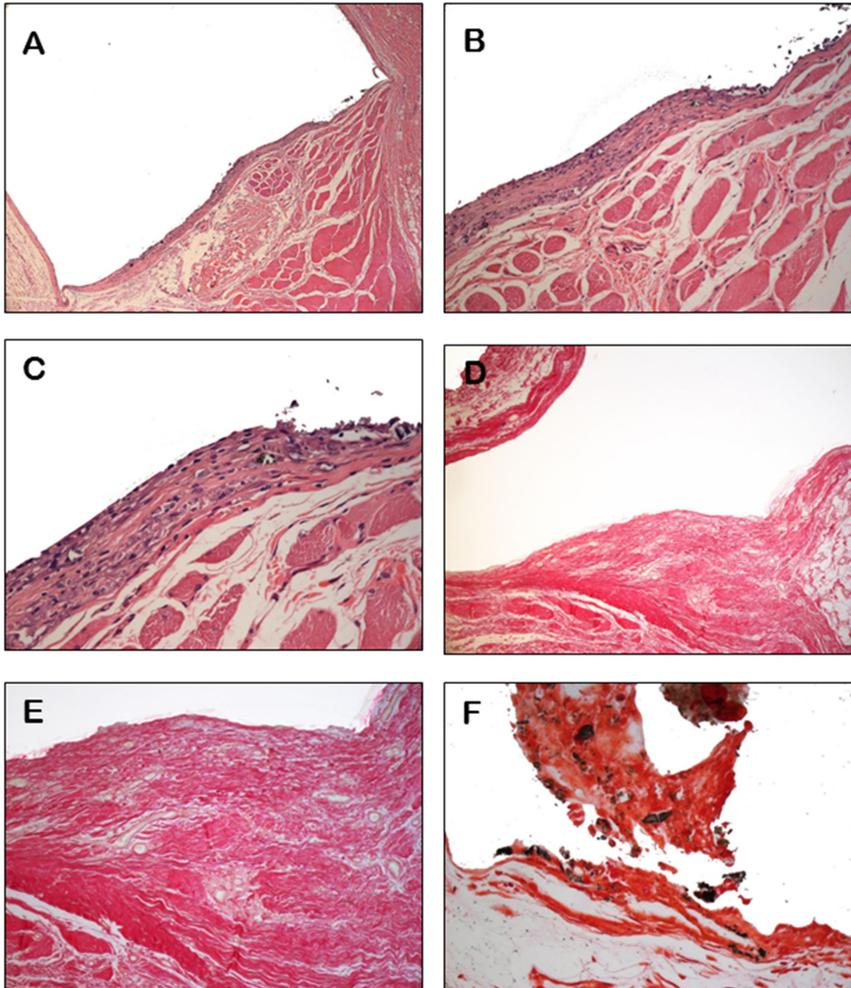
Neste grupo, uma amostra não foi avaliada, pois a região de interesse não foi preservada durante a realização da macroscopia. Assim, nas cinco amostras, em volta do tubo, próximo ao local onde estava o material, notou-se uma inflamação crônica discreta (figura 10 A, B, e C), com presença de células mononucleadas, macrófagos, linfócitos e alguns plasmócitos. O tecido de granulação e a fibrose foram discretos em todas as amostras (figura 10 D e E). Granulações Von Kossa positiva para o cálcio estavam presentes em todas as amostras avaliadas, sendo, na sua maioria, de intensidade moderada (figura 10 F). Apenas em uma amostra observou-se discreta calcificação.



**Figura 10: Imagens histológica da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo Sealapex Consistente – 90 dias. (A=10x; B=200x; C=400x; HE), material exógeno dentro da parede fibrosa, apresentando infiltrado inflamatório crônico em grau discreto e presença de tecido de granulação também em grau discreto. (D=100x; E= 200x; PIFG), presença de parede fibrosa em grau discreto. ( F=200x; VK), granulações Von Kossa positiva em grau discreto.**

**GRUPO 3 - MTA – 90 dias**

Em todos as seis amostras deste grupo, observou-se discreta inflamação crônica, com predomínio de macrófagos e alguns linfócitos (figura 11 A, B e C). Macrófagos com pigmentos do material no citoplasma também foram observados. O tecido de granulação apresentou-se discreto na maioria das amostras, em apenas uma não se observou presença de vasos. A fibrose revelou-se moderada (figura 11 D e E) em cinco amostras e em uma apresentou-se discreta. Granulações Von Kossa positiva para o cálcio foram observadas em cinco amostras, sendo na maioria discreta (figura 11 F), em uma das granulações não foram observadas.



**Figura 11: Imagens histológica da reação do tecido subcutâneo de rato ao implante do grupo MTA – 90 dias. (A=10x; B=200x; C=400x; HE), presença de infiltrado inflamatório crônico em grau discreto, assim como o tecido de granulação. (D=100x; E=200x; PIFG), parede fibrosa, apresentando matriz colagênica em grau discreto. (F=200x,VK), presença de granulações Von Kossa positiva em grau discreto.**

**Quadro 3 - RESULTADOS DOS EVENTOS HISTOMORFOLÓGICOS ANALISADOS**

		INFLAMAÇÃO			TECIDO DE GRANULAÇÃO			FIBROSE			CALCIFICAÇÃO		
		7 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	7 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	7 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	7 DIAS	60 DIAS	90 DIAS
R1	G1	1	0	0	1	0	1	1	1	2	0	0	0
	G2	1	1	1	2	0	1	2	2	1	1	2	1
	G3	2	1	1	3	1	1	2	1	2	0	2	1
R2	G1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	0	0	0
	G2	1	1	1	1	0	1	2	1	1	0	2	1
	G3	1	0	1	1	0	0	2	1	2	1	0	2
R3	G1	1	1	1	1	0	1	1	1	2	0	0	0
	G2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2
	G3	1	0	1	1	1	1	2	2	2	0	0	3
R4	G1	2	0	1	1	1	1	2	1	2	0	0	0
	G2	1	1	1	1	0	1	1	2	1	0	1	2
	G3	1	1	1	0	1	1	1	2	2	1	0	0
R5	G1	1	0	1	1	1	1	3	1	3	0	0	0
	G2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	2
	G3	1	0	1	1	1	1	1	3	1	1	0	1
R6	G1	-	0	1	-	1	1	-	2	2	0	0	0
	G2	1	1	-	2	1	-	2	1	-	1	2	-
	G3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	0	1

LEGENDAS:

GRADUAÇÃO/SCORE: AUSENTE (0); DISCRETO (+/1); MODERADO (+/2); INTENSO (+/3)

GRUPOS: G 1 – CONTROLE NEGATIVO (TV) / G2- SEALAPEX CONSISTENTE (SC) / G3- AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL(MTA)

(-) Amostra não analisada devido à ausência da área de interesse próximo a abertura do tu

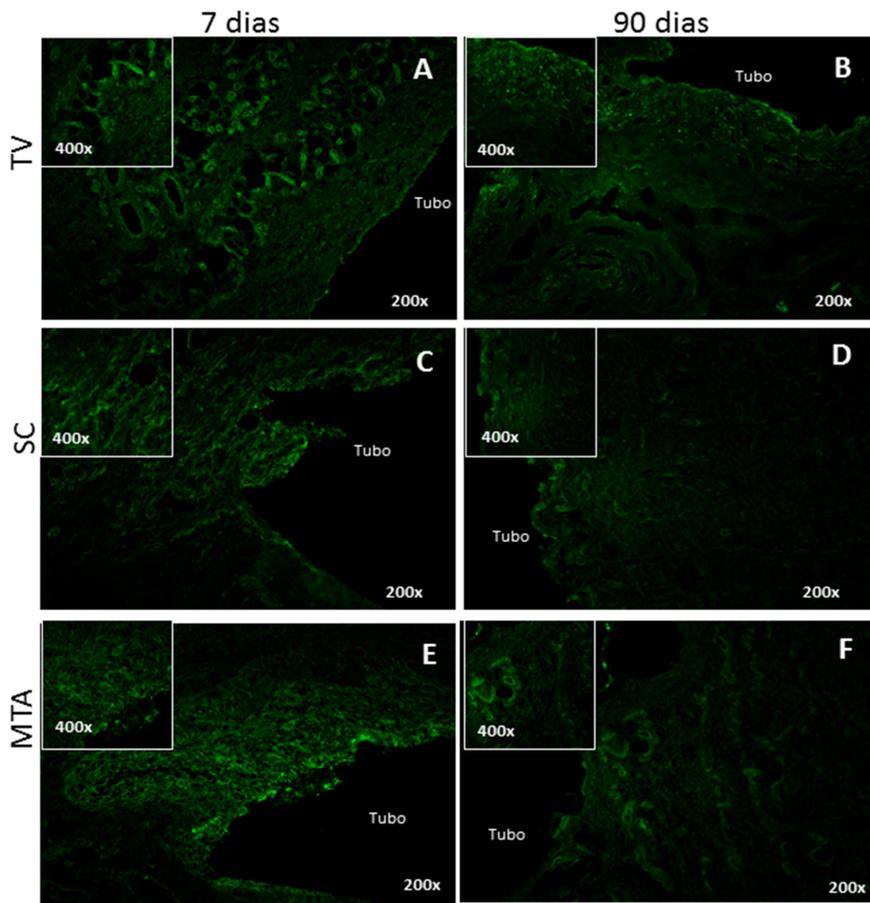
## 7.2 ANÁLISE DESCRITIVA DA PRESENÇA DE ALGUNS COMPONENTES DA MATRIZ CONJUNTIVA EXTRACELULAR EM CONTATO COM OS MATERIAIS RETROBTURADORES ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA EM CORTES DE CONGELAÇÃO

A dinâmica do reparo da matriz conjuntiva extracelular foi avaliada através da expressão de marcação pela imunofluorescência indireta das glicoproteínas adesivas fibronectina e laminina e do colágeno tipo I e III. A análise microscópica foi realizada para os dois materiais experimentais e controle em dois períodos experimentais (sete e 90 dias). Os dados dos resultados obtidos estão representados no apêndice 2 e 3. Para cada grupo e período, três amostras foram analisadas.

### 7.2.1 Fibronectina

No grupo controle (tubo vazio), com sete dias, a marcação de fibronectina foi observada nas três amostras avaliadas, sendo uma com grau moderado (figura 12 A) e em duas com grau discreto. Após 90 dias, a marcação positiva aconteceu em duas amostras, sendo uma em grau discreto (figura 12 B) e a outra em grau moderado. Após sete dias, no grupo experimental, Sealapex Consistente, a expressão de fibronectina foi positiva em duas amostras, em grau discreto e moderado respectivamente (figura 12 C). Com 90 dias a expressão foi em grau discreto (figura 12 D) em apenas uma amostra. No grupo MTA, com sete dias, a expressão de fibronectina foi positiva em duas amostras, sendo uma em grau discreto e a outra em grau moderado (figura 12 E). Após 90 dias, a expressão também foi positiva em duas amostras, ambas em grau discreto (figura 12 F).

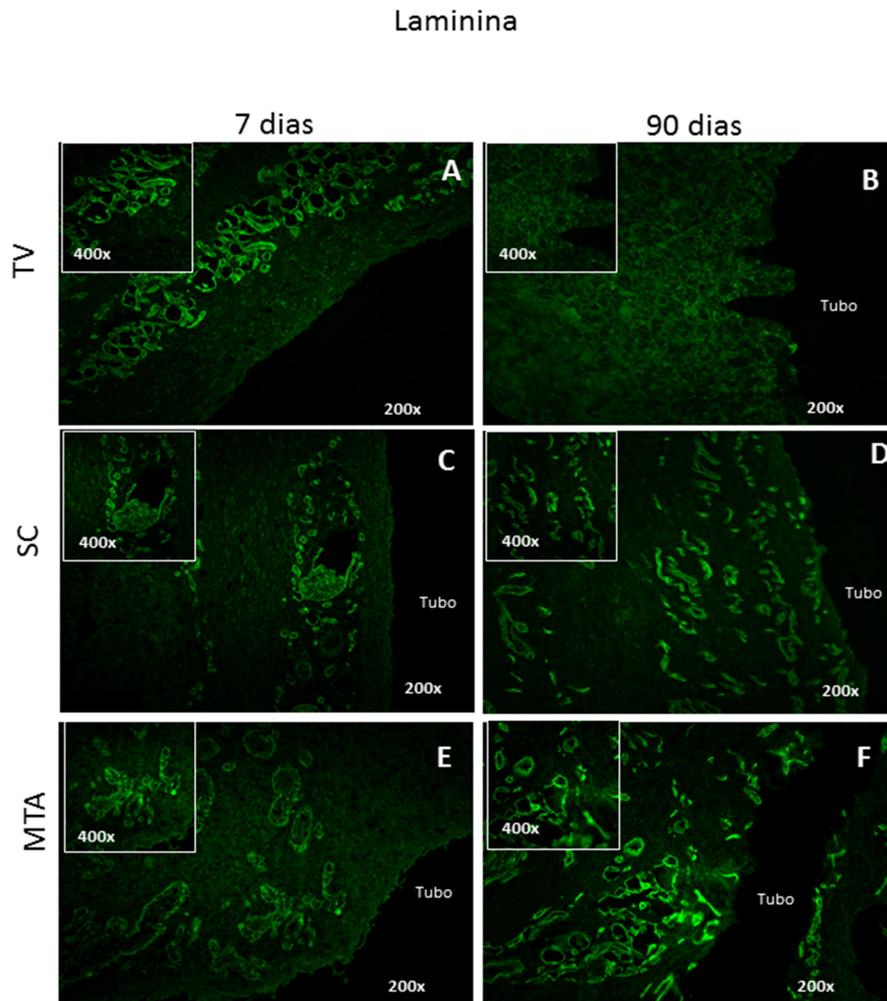
## Fibronectina



**FIGURA 12-** Fotomicrografia da imunofluorescência indireta da matriz conjuntiva extracelular em torno de materiais retrobturadores implantados no tecido subcutâneo de ratos nos períodos de sete e 90 dias: Análise da fibronectina. Imunofluorescência com rabbit polyclonal antibody to human fibronectin e goat anti-mouse igG Dylight488 (verde). Grupo controle (TV): (A) grau de intensidade moderado; (B) grau de intensidade discreto. Sealapex Consistente (SC): (C) grau de intensidade moderado; (D) grau de intensidade discreto. MTA: (E) grau de intensidade moderado; (F) grau de intensidade discreto.

### **7.2.2- Laminina**

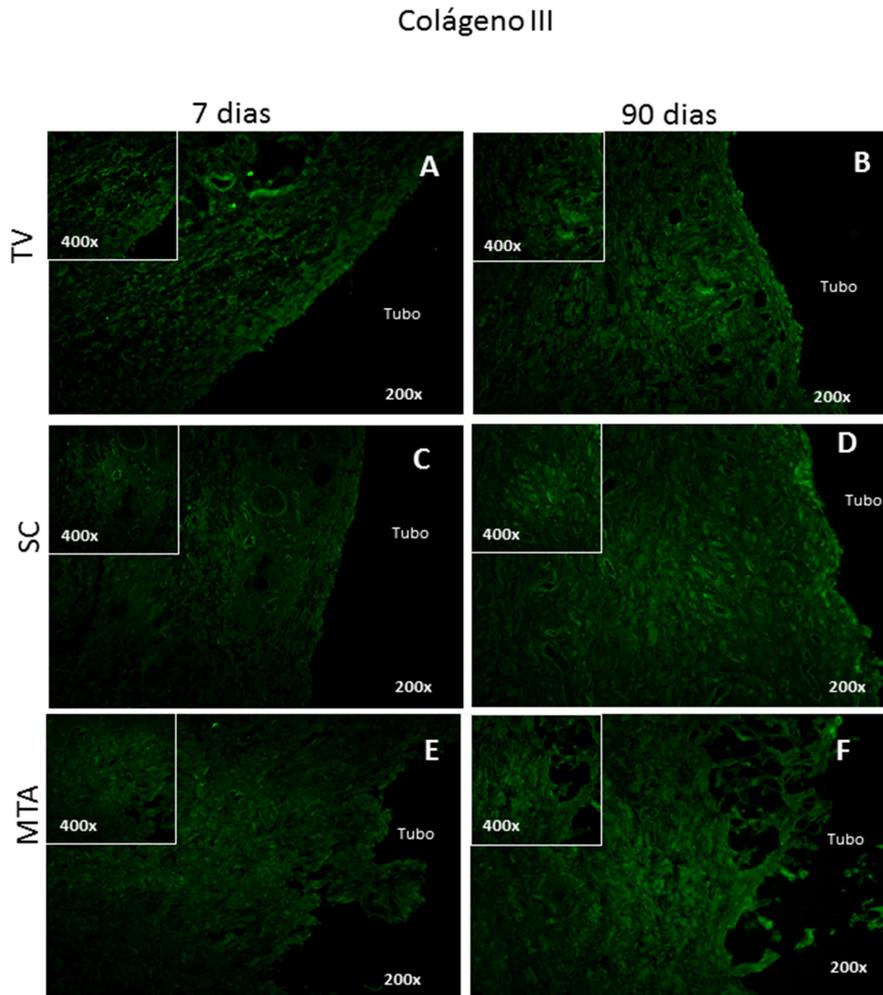
No grupo controle, com sete dias, a expressão positiva de lamina foi observada em duas amostras, sendo em grau discreto e moderado respectivamente (figura 13 A). O mesmo aspecto foi observado no período de 90 dias (figura 13 B). No grupo Sealapex Consistente, observou-se com sete dias, expressão de lamina em duas amostras, sendo ambas em grau discreto (figura 13 C). Já com 90 dias, a expressão de lamina também foi observada em três amostras, sendo duas em grau discreto e uma em grau moderado (figura 13 D). Após sete dias, o MTA mostrou expressão de lamina em duas amostras, ambas em grau moderado (figura 13 E). Com 90 dias a expressão de lamina foi observada também em duas amostras, porém ambas em grau intenso (figura 13 F).



**FIGURA 13** – Fotomicrografia da imunofluorescência indireta da matriz conjuntiva extracelular em torno de materiais retrobturadores implantados no tecido subcutâneo de ratos nos periodos de sete e 90 dias: **Análise da laminina** . Imunofluorescência com polyclonal rabbit anti-Laminin e goat anti-mouse igG Dylight488 (verde). Grupo controle (TV): (A) grau de intensidade moderado; (B) grau de intensidade discreto. Sealapex Consistente (SC): ( C) grau de intensidade discreta; ( D) grau de intensidade moderado. MTA: ( E ) grau de intensidade moderado; ( F ) grau de intensidade intenso.

### 7.2.3 Colágeno tipo III

No grupo controle tubo vazio, com sete dias, a expressão positiva do colágeno III foi observada em uma amostra em grau moderado (figura 14 A). No período de 90 dias, a expressão positiva foi em duas amostras, sendo uma em grau discreto e a outra em grau moderado (figura 14 B). No grupo Sealapex Consistente, observou-se, com sete dias, expressão de colágeno III em duas amostras, sendo ambas em grau discreto (figura 14 C). Com 90 dias a expressão de colágeno III foi observada nas três amostras, sendo duas em grau discreto (figura 14 D) e uma em grau intenso. Após sete dias, no grupo MTA observou-se discreta expressão de colágeno III em uma amostra (figura 14 E), e negativo nas outras duas. Com 90 dias, a expressão de colágeno III foi observada em duas amostras, ambas em grau intenso e negativo na outra (figura 14 F).

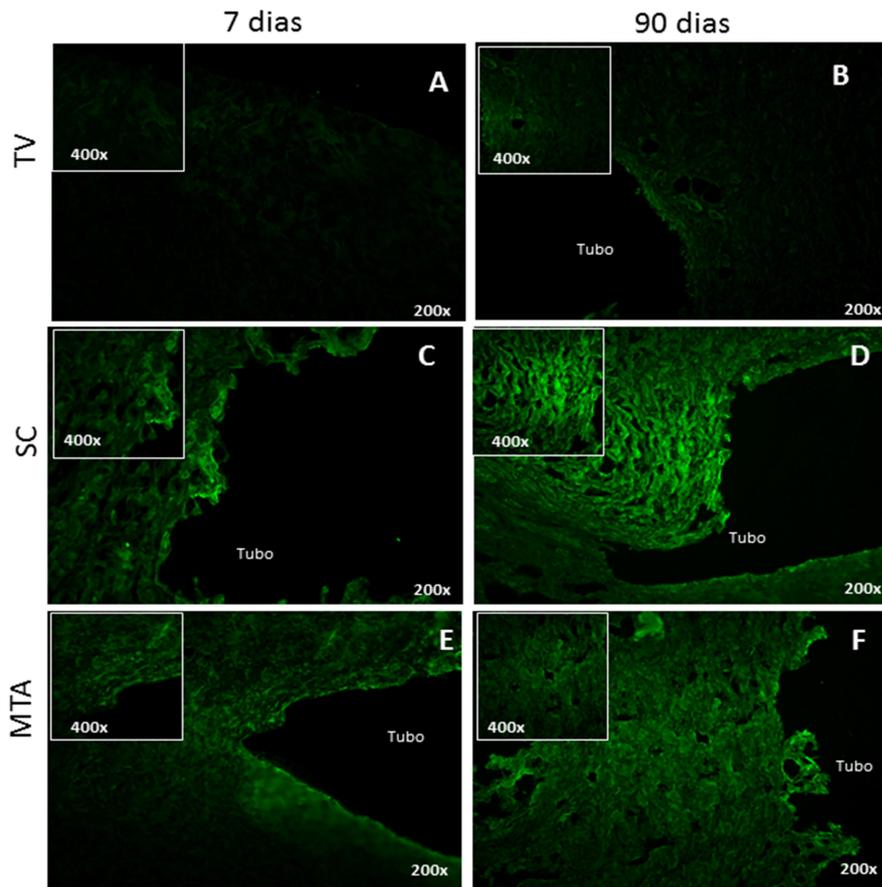


**FIGURA 14**–Fotomicrografia da imunofluorescência indireta da matriz conjuntiva extracelular em torno de materiais retrobturadores implantados no tecido subcutâneo de ratos nos períodos de sete e 90 dias: Análise do colágeno tipo III. Imunofluorescência com rabbit I antibody to rat collagen type III e goat anti-mouse igG Dylight488 (verde). Grupo controle (TV): (A e B) grau de intensidade moderado. Sealapex Consistente (SC): (C e D) grau de intensidade discreto. MTA: (E) grau de intensidade discreto; (F) grau de intensidade moderado.

#### **7.2.4 Colágeno tipo I**

No grupo controle, tubo vazio, com sete e 90 dias, a expressão da marcação de colágeno tipo I foi observada em uma das três amostras observadas, sendo ambas em grau discreto (figura 15 A e B). No grupo Sealapex Consistente, observou-se com sete dias, expressão em grau discreto de colágeno I nas três amostras avaliadas (figura 39 C). Com 90 dias a expressão de colágeno I foi observada nas três amostras, sendo duas em grau discreto e uma em grau intenso (figura 39 D). No grupo MTA, após sete dias, observou-se expressão de colágeno I nas três amostras, sendo duas em grau moderado (figura 15 E) e uma em grau discreto. Com 90 dias, a expressão de colágeno I foi observada também nas três amostras, sendo duas em grau moderado e uma em grau intenso (figura 15 F).

## Colágeno I



**FIGURA 15** – Fotomicrografia da imunofluorescência indireta da matriz conjuntiva extracelular em torno de materiais retrobturadores implantados no tecido subcutâneo de ratos nos períodos de sete e 90 dias: Análise do colágeno tipo I. Imunofluorescência com rabbit antibody to rat collagen, type I e goat anti-mouse igG Dylight488 (verde). Grupo controle (TV): (A e B) ausência de expressão de colágeno tipo I. Sealapex Consistente (SC): (C) grau de intensidade discreto; (D) grau de intensidade intenso . MTA: (E) grau de intensidade moderado; (F) grau de intensidade intenso .

QUADRO 4- MARCAÇÃO E GRADUAÇÃO DAS PROTEINAS AVALIADAS UTILIZANDO A TÉCNICA DE IMUNOFLOURESCÊNCIA NO PERÍODO SETE DIAS

7 DIAS	FIBRONECTINA		LAMININA		COLÁGENO III		COLÁGENO I	
	MARCAÇÃO	GRADUAÇÃO	MARCAÇÃO	GRADUAÇÃO	MARCAÇÃO	GRADUAÇÃO	MARCAÇÃO	GRADUAÇÃO
R1 TV	+	1	AUSENTE	0	AUSENTE	0	AUSENTE	0
R2 TV	++	2	++	2	++	2	AUSENTE	0
R3 TV	+	1	+	1	AUSENTE	0	+	1
R1 SC	AUSENTE	0	AUSENTE	0	AUSENTE	0	+	1
R2 SC	+	1	+	1	+	1	+	1
R3 SC	++	2	+	1	+	1	+	1
R1 MTA	AUSENTE	0	AUSENTE	0	+	1	++	2
R2 MTA	+	1	++	2	AUSENTE	0	++	2
R3 MTA	++	2	++	2	AUSENTE	0	+	1

GRADUAÇÃO: 0 - AUSENTE / 1 (+) - DISCRETA / 2 (++) - MODERADA / 3 (+++) - INTENSA

QUADRO 5 - MARCAÇÃO E GRADUAÇÃO DAS PROTEÍNAS AVALIADAS UTILIZANDO A TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA NO PERÍODO **90 DIAS**

<b>90 DIAS</b>	<b>FIBRONECTINA</b>		<b>LAMININA</b>		<b>COLÁGENO III</b>		<b>COLÁGENO I</b>	
	MARCAÇÃO	GRADUAÇÃO	MARCAÇÃO	GRADUAÇÃO	MARCAÇÃO	GRADUAÇÃO	MARCAÇÃO	GRADUAÇÃO
<b>R1 TV</b>	++	2	++	2	AUSENTE	0	AUSENTE	0
<b>R2 TV</b>	AUSENTE	0	+	1	++	2	AUSENTE	0
<b>R3 TV</b>	+	1	+	1	+	1	+	1
<b>R1 SC</b>	AUSENTE	0	+	1	+	1	+	1
<b>R2 SC</b>	+	1	++	2	+	1	+	1
<b>R3 SC</b>	AUSENTE	0	+	1	+++	3	+++	3
<b>R1 MTA</b>	AUSENTE	0	AUSENTE	0	AUSENTE	0	++	2
<b>R2 MTA</b>	+	1	+++	3	++	2	+++	3
<b>R3 MTA</b>	+	1	+++	3	++	2	+++	3

GRADUAÇÃO: 0 - AUSENTE / 1 (+)- DISCRETA / 2 (++)- MODERADA / 3 (+++)- INTENSA

### 7.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação das variáveis entre os grupos estudados e os valores encontrados para inflamação, tecido de granulação, fibrose e calcificação no tecido conjuntivo capsular reacional em torno dos materiais implantados, nos diferentes períodos experimentais, estão representados nas figuras 16, 17 e 18. Nós não observamos diferença estatística entre os grupos tubo vazio, Sealapex Consistente (SC) e Agregado de Trióxido mineral (MTA) para as variáveis inflamação, tecido de granulação e fibrose. Como esperado, ambos os materiais (MTA e SC) apresentaram maior calcificação em cada período experimental (sete, 60, 90 dias) quando comparado ao TV. Entretanto, a calcificação do material SC foi mais evidente quando comparado ao TV nos períodos de 60 e 90 dias (figura 17 e 18). Embora o MTA tenha apresentado um maior grau de calcificação após 90 dias em relação ao TV, o resultado não foi estatisticamente significativo ( $p=0,053$ ) (figura 18). Quando se realizou a comparação entre os períodos experimentais (figura 19 A, B, C e D), não foi observada diferença estatística nos grupos tubo vazio e Sealapex Consistente para a inflamação. Já no grupo do MTA, houve diferença estatisticamente significativa entre o período de sete e 60 dias ( $p=0,036$ ), (figura 43 A). Para a variável tecido de granulação, nos grupos tubo vazio e MTA não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, entretanto no grupo Sealapex Consistente observou-se diferença estatisticamente significativa entre o período de sete e 60 dias para esta variável ( $p=0,0321$ ), (figura 19 B). Quanto à fibrose, em nenhum dos três grupos foi possível encontrar diferença estatística. Na avaliação da calcificação, no grupo tubo vazio, não se observou nenhuma granulação do tipo Von Kossa positiva. Porém, no grupo Sealapex Consistente e MTA, foram observadas granulações Von Kossa positiva em todos os períodos experimentais. Diferença estatisticamente significativa só foi observada no grupo do Sealapex Consistente entre o período de sete e 60 dias ( $p=0,0217$ ) (figura 19 D).

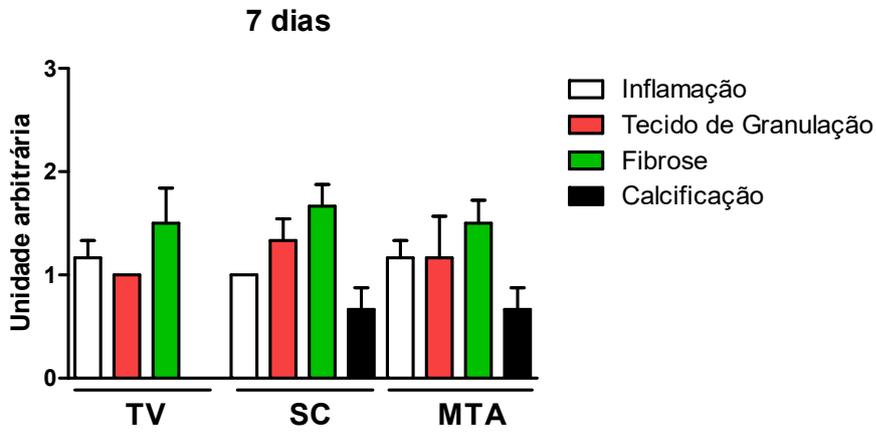


Figura 16. Representação gráfica em escores dos eventos histomorfológicos analisados no grupo controle (TV) e nos grupos experimentais ( SC e MTA) após período de sete dias. Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa

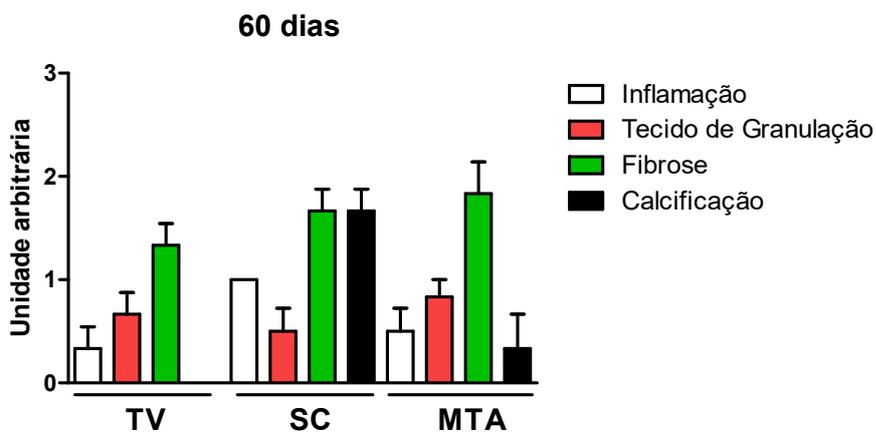


Figura 17- Representação gráfica em escores dos eventos histomorfológicos analisados no grupo controle (TV) e nos grupos experimentais ( SC e MTA) após período de 60 dias. Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa

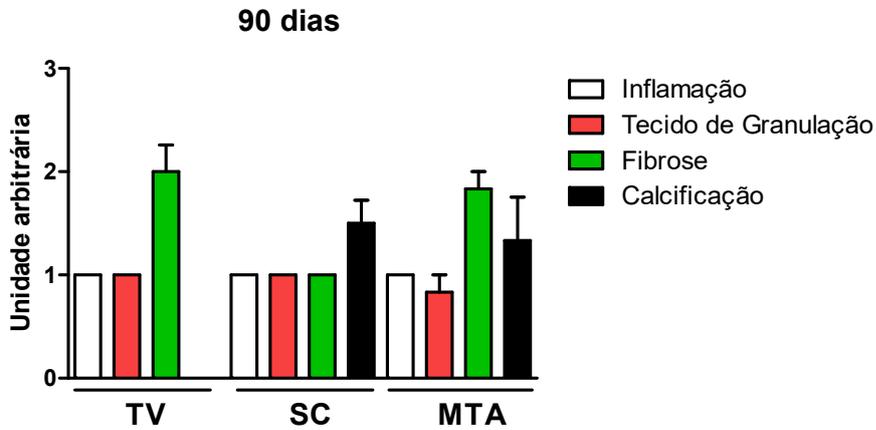


Figura 18 – Representação gráfica em escores dos eventos histomorfológicos analisados no grupo controle (TV) e nos grupos experimentais ( SC e MTA) após período de 90 dias. Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa

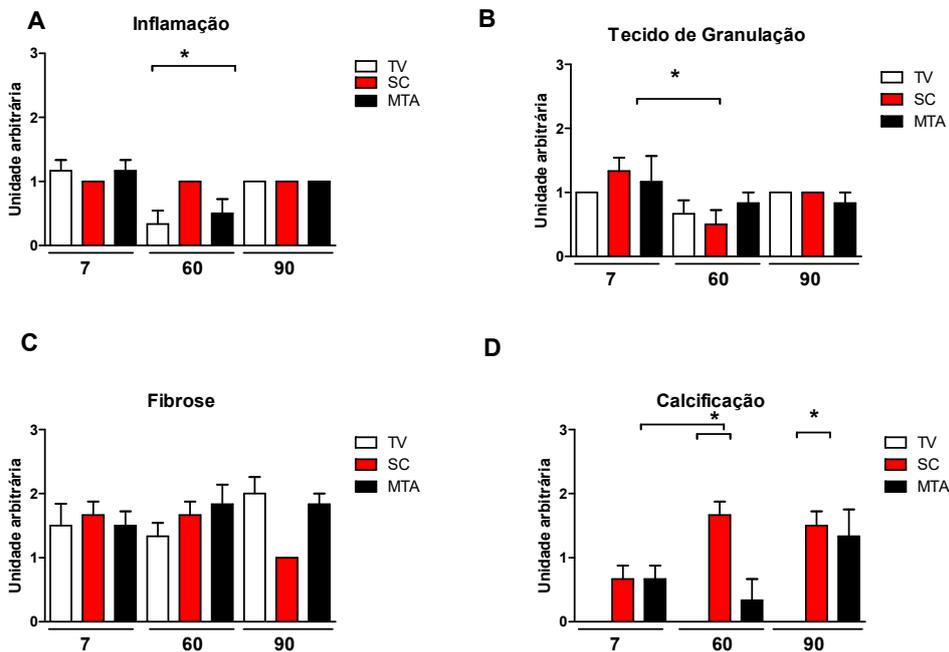


Figura 19. Representação gráfica em escores dos eventos histológicos analisados, quando comparados entre os períodos de 7, 60 e 90 dias. Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa

Nesta pesquisa, a dinâmica do reparo da matriz conjuntiva extracelular do tecido subcutâneo de rato em torno dos materiais retrobturadores e controle também foi avaliada através do estudo das glicoproteínas, fibronectina e laminina e dos colágenos tipo I e III, nos períodos experimentais de 7 e 90 dias. Estas variáveis respostas foram observadas através da imunomarcção, em cortes criopreservados, de tecido subcutâneo de ratos, utilizando a técnica da imunofluorescência indireta. A comparação dessas variáveis entre os grupos foi realizada através do teste não paramétrico, pois tais variáveis forneceram dados qualitativos, apresentando-se em escala ordinal. A diferença entre os grupos foi analisada utilizando o teste de Frideman e a comparação múltipla de Dunn's. Após análise das variáveis, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e controle ( $p>0,05$ ) nos períodos de sete e 90 dias, (figuras 20 e 21).

Na comparação das variáveis respostas entre os períodos experimentais de 7 e 90 dias, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, pois as observações foram medidas em escala ordinal, também não se observou diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) (figura 22).

Os resultados estatísticos não significativos em relação aos componentes da matriz conjuntiva extracelular provavelmente é consequência de um número amostral pequeno (três amostras por grupo). Para contornar esta dificuldade, seria necessário aumentar o tamanho da amostra de cada grupo, o que no momento não foi possível devido a restrições técnicas e financeiras.

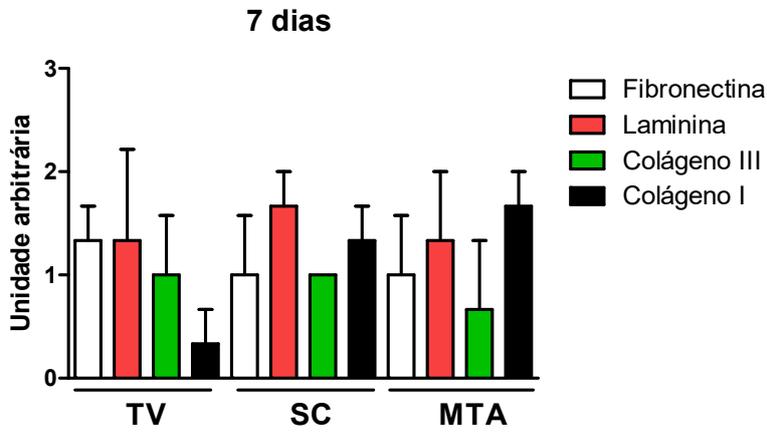


Figura 20. Representação gráfica da marcação pela Imunofluorescência indireta dos anticorpos estudados no grupo controle (TV) e nos grupos experimentais ( SC e MTA) após período de 07dias. Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa

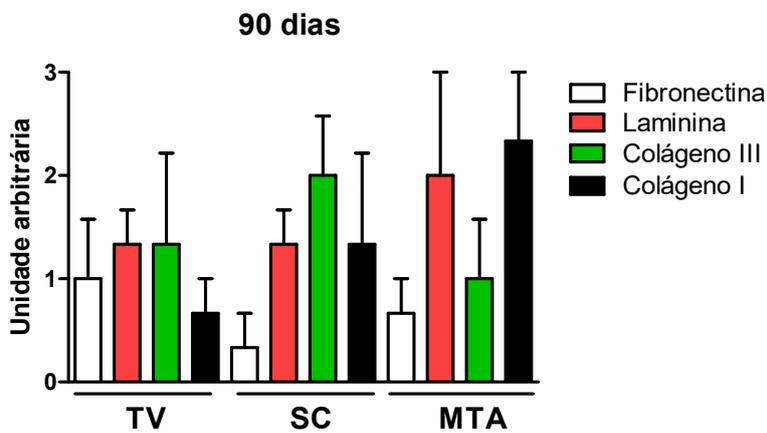


Figura 21. Representação gráfica, em escores, da marcação pela Imunofluorescência Indireta dos anticorpos estudados no grupo controle (TV) e nos grupos experimentais ( SC e MTA) após período de 90 dias. Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3=intensa

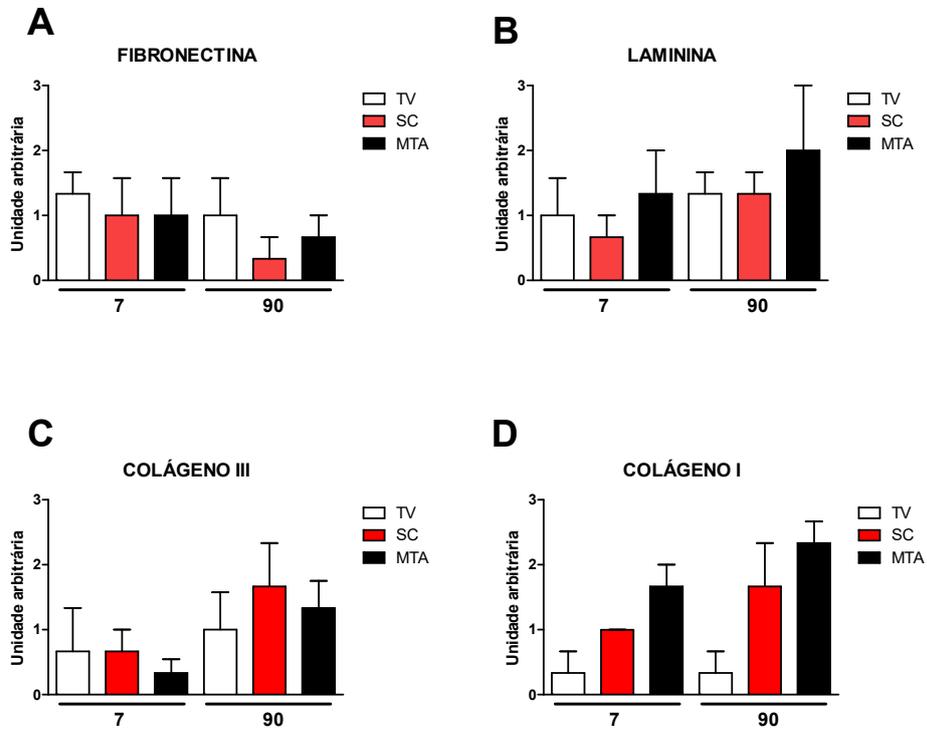


Figura 22. Representação gráfica, em escores, da marcação pela imunofluorescência Indireta das glicoproteínas adesivas (fibronectina e laminina) e proteínas estruturais (colágeno tipo III e I), quando comparadas entre os períodos de 7 e 90 dias. . Graduação: 0=ausente; 1=discreta; 2=moderada; 3= intensa.

## 8 DISCUSSÃO

No presente estudo, optamos pela implantação dos tubos de polietileno com ou sem os materiais em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos por ser um dos testes secundários amplamente utilizados. Estes animais são menos susceptíveis ao processo infeccioso, ser um método simples e econômico introduzido por Torneck et al. (1966), além de ser uma metodologia proposta por várias entidades internacionais (American Dental Association/American National Standards Institute, 1979; Federation Dentaire International, 1980).

Quanto ao tempo experimental, na literatura não existe uma padronização quanto ao período de avaliação, a American Dental Association (ADA) sugere períodos que podem variar entre 7-10, 21-35 e 60-80. Na literatura observam-se os mais variados períodos: 7, 15 e 30; 7, 30 e 60; 15, 30 e 60, assim acredita-se que não haja uma norma inflexível para esses tempos experimentais. No caso de nossa pesquisa, as análises foram realizadas aos sete, 60 e 90 dias para o protocolo de análise histológica e sete e 90 para o protocolo de imunofluorescência indireta, à semelhança de outros trabalhos em tecido subcutâneo de ratos (HOLLAND et al, 1999; MENEZES et al., 2005; PERASSI et al., 2008; GOMES FILHO et al., 2009a; CUNHA et al., 2011; GOMES FILHO et al., 2011; QUEIROZ et al., 2011; SILVEIRA et al., 2011). Comparando com a clínica, os períodos experimentais utilizados em nosso estudo estão coerentes com a cinética de reparo da região periapical após a realização da cirurgia parodontal. Segundo Witherspoon & Johnson (2007), o preenchimento da cavidade cirúrgica com tecido ósseo acontece em torno de dois meses, já o cimento cobre o ápice radicular em torno de 28 dias e a inserção das recém-formadas fibras apicais, do cimento ao osso alveolar, também ocorre aproximadamente em torno de dois meses após a cirurgia.

Apesar do sucesso biológico do MTA ser amplamente comprovado, têm sido apontadas algumas desvantagens no uso deste cimento pelos profissionais: o difícil manuseio, tempo prolongado de presa e o seu custo. Segundo o fabricante do MTA Ângelus, houve uma redução deste tempo para dez minutos devido à remoção do sulfato de cálcio, com a presa total deste cimento sendo alcançada depois de quinze minutos da espatulação. Em relação ao Sealapex Consistente, devido à facilidade de manipulação e preenchimento, este material apresenta, nestes dois aspectos, grande vantagem com relação ao MTA, uma vez que a consistência do mesmo facilita sua introdução nas retrocavidades. Nos grupos experimentais desta pesquisa, nos períodos observados, todos os materiais testados apresentaram

comportamento biológico semelhante, a resposta do tecido conjuntivo foi uma discreta inflamação crônica. No período de sete dias, no grupo MTA, na maioria das amostras observou-se uma discreta inflamação crônica, e algumas células gigantes tipo corpo estranho, semelhante aos resultados encontrados por Holland et al., (1999) e Vita et al., (2008). Resultados diferentes foram encontrados por alguns autores, nos quais a inflamação foi na maioria das vezes de intensidade moderada a intensa (LOPES, et al. 2003; YALTIRIK, et al., 2004; GOMES FILHO, 2009b, SHAHI et al., 2010; GOMES FILHO et al., 2010). Neste período de sete dias, o Sealapex Consistente também apresentou discreta inflamação crônica, diferentes dos resultados encontrados por Vita et al., (2008) e Cunha, et al., (2011), que encontraram uma moderada a intensa inflamação crônica.

A neoformação vascular é um evento fundamental para o processo do reparo. O aporte sanguíneo adequado é imprescindível para a atividade metabólica dos fibroblastos. Aos 7, 60 e 90 dias todos os grupos experimentais e controle exibiram neoformação vascular semelhante, ou seja, apresentaram proliferação angioblástica em grau discreto (figuras 3 a 11 A, B e C).

Nos estudos que avaliam a resposta do tecido conjuntivo de ratos frente à implantação de materiais, a formação de uma cápsula fibrosa ao redor do implante sugere que o mesmo é bem tolerado pelos tecidos (YALTIRIK, et al., 2004). Em nosso estudo, aos sete dias o MTA e o Sealapex Consistente apresentaram uma fibrose que variou de discreta a moderada, entretanto no Sealapex Consistente foi observado maior número de amostra com intensidade moderada, resultados semelhantes aos encontrados por alguns autores (VITA et al., 2008; GOMES FILHO, et al., 2009a; GOMES FILHO, et al., 2009b; GOMES FILHO, et al., 2011; QUEIROZ, et al., 2011; SILVEIRA et al., 2011).

No período de 60 dias, no grupo do MTA, a inflamação estava ausente em metade das amostras avaliadas. Quando presente, a inflamação foi discreta com predomínio de macrófagos e células gigantes fagocitando o material retrobturador, o tecido de granulação também foi discreto. A fibrose apresentou-se mais densa variando de discreta a intensa. Segundo Menezes et al., (2005), com sessenta dias o MTA não foi irritante na área estudada e não interferiu com o processo de reparo natural da cicatrização. Resultados semelhantes foram encontrados por alguns autores (YALTIRIK, et al., 2004; VITA et al., 2008; SHAHI et al., 2010; GOMES FILHO, et al., 2011). Quanto ao Sealapex Consistente, também com 60 dias, apresentou inflamação crônica em todas as amostras, com redução dos números de vasos,

sendo a fibrose moderada na maioria das amostras. Resultado diferente foi encontrado por Vita et al., (2008), quando metade das amostras do Sealapex Consistente não apresentaram inflamação. Cunha et al., (2011) observaram que, após 42 dias de implantação, no tecido subcutâneo de rato, o Sealapex Consistente apresentou discreta reação inflamatória, mas ainda havia presença de células gigantes tipo corpo estranho. Segundo estes autores, a combinação do Sealapex com o óxido de zinco parece não alterar as propriedades biológicas deste cimento, corroborando com Valera et al., (2005) que utilizaram o óxido de zinco para dar radiopacidade ao Sealapex. Queiroz, et al., (2011) também utilizaram o óxido de zinco adicionado à pasta Calen, combinação indicada para obturação de dentes decíduos, eles observaram melhores resultados para esta associação quando comparada ao cimento Sealapex. Ainda segundo estes autores, o óxido de zinco pode interferir no processo inflamatório, reduzindo a capacidade fagocítica dos macrófagos e interfere na membrana dos lisossomos.

No período de 90 dias, tanto o MTA como o Sealapex Consistente apresentaram discreta inflamação crônica, assim como o tecido de granulação e uma discreta cápsula fibrosa, resultados semelhantes aos encontrados por alguns autores (GOMES FILHO, et al., 2009a; GOMES FILHO, et al., 2009b; GOMES FILHO, et al., 2011). Resultado diferente foi encontrado por Shahi et al., (2010), em que eles observaram que, após 90 dias, o MTA não apresentou inflamação. Com relação à fibrose, também com 90 dias, a maioria apresentou-se moderada para o grupo MTA e discreta para o Sealapex Consistente.

Ao analisar os resultados histológicos apresentados neste estudo, observamos ausência da reação inflamatória no tecido conjuntivo periférico na área dos tubos de polietileno vazios (grupo controle) em mais da metade das amostras analisadas com 60 dias de observação. Porém, com 90 dias, foi observada uma reação inflamatória crônica discreta em todas as amostras. De um modo geral, estes resultados são semelhantes aos encontrados na literatura (TORNECK, 1966, CINTRA et al., 2010; GOMES FILHO et al., 2009a; GOMES FILHO, et al., 2009b; GOMES FILHO et al., 2011; QUEIROZ, et al., 2011; CINTRA, et al., 2012), indicando a aceitabilidade deste material para realização de análise de biocompatibilidade em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.

Vita et al., (2008), utilizando-se da mesma metodologia, optaram por implantar em cada animal três implantes do mesmo material; diferente da metodologia utilizada nesta pesquisa, onde em cada animal foram implantados materiais diferentes, em sistema de rodízio. Isto pode justificar alguns diferentes resultados encontrados, quando comparados às duas metodologias,

pois diferentes materiais no mesmo animal minimizam as possíveis interferências nutricionais, sistêmicas e anatômicas na avaliação dos diferentes grupos experimentais.

Na comparação das variáveis entre os grupos estudados, nós não observamos diferença estatística entre os grupos tubo vazio, Sealapex Consistente e agregado de trióxido mineral (MTA) para as variáveis inflamação, tecido de granulação e fibrose. Já na comparação entre os períodos experimentais, no grupo do MTA houve diferença estatisticamente significativa entre o período de sete e 60 dias ( $p < 0,036$ ) para a inflamação (figura 19 A). Este resultado mostra uma inflamação crônica determinada pelo material testado, que a princípio era mais intensa, e com o passar do tempo tornou-se mais discreta, sinalizando biocompatibilidade. Segundo Shahi et al., (2010) o alto grau de inflamação do MTA pode ser atribuído ao alto valor inicial do pH, que é produzido durante o endurecimento do material e a produção e liberação de citocinas pro-inflamatórias. Resultados semelhantes a nossa pesquisa foram encontrados para o MTA ( MENEZES et al., 2005; MORAIS, et al., 2006; GOMES FILHO, et al., 2009a; GOMES FILHO, et al., 2009b; REYES-CARMONA et al., 2010; GOMES FILHO et al., 2010; GOMES FILHO, et al., 2011). Para a variável tecido de granulação, no grupo Sealapex Consistente observou-se diferença estatisticamente significativa entre o período de sete e 60 dias ( $p < 0,032$ ). Esta maior diferença para o período de sete dias comparado com o de 60 dias, pode revelar um processo de reparo em andamento, pois, à medida que há um aumento de colágeno, a vascularização diminui.

Utilizando-se a metodologia de retrobturação em dentes de cães, tem-se observado que o MTA favorece o reparo periapical com menos inflamação e estimula a mineralização (FELIPPE; FELIPPE; ROCHA, 2006; BERNABÉ, et al., 2007; BERNABÉ et al., 2010). Resultados semelhantes foram encontrados para o Sealapex Consistente (LUIZ 2003; TANOMARU FILHO, et al., 2006), assim como para o Sealapex, utilizado como cimento obturador em dentes de cães com lesão periapical (LEONARDO et al., 2003). Entretanto, na nova formulação do Sealapex (substituição do radiopacificador sulfato de bário por trióxido de bismuto), para aumentar a radiopacidade e o tempo de validade, Leonardo et al., (2007) observaram que os canais preenchidos com Sealapex/guta percha sem restauração mostraram alto grau de inflamação. Segundo Silveira et al., (2011) esta modificação poderia ter afetado negativamente a biocompatibilidade deste material.

O mecanismo de ação do MTA em nível tecidual é semelhante ao hidróxido de cálcio (HOLLAND et al., 1999; HOLLAND et al., 2001; HOLLAND et al., 2002b). Ambos os

materiais determinam a formação de granulações de calcita. O óxido de cálcio do pó do MTA, ao realizar-se a preparação da pasta com água, seria convertido em hidróxido de cálcio. Este, por sua vez, em contato com fluidos tissulares, se dissociaria em íons cálcio e hidroxila. Os íons cálcio, reagindo com o gás carbônico dos tecidos, dariam origem às granulações de calcita. Junto a essas granulações haveria acúmulo de fibronectina, a qual permitiria adesão e diferenciação celular. Na sequência, haveria formação de tecido duro. Reação tecidual semelhante à do MTA pode ser observada com o cimento obturador Sealapex, este cimento contém em sua formulação o óxido de cálcio, o qual reage com os fluidos tissulares para formar o hidróxido de cálcio. Implantando-se o Sealapex também contido em tubos de dentina, em subcutâneo de ratos, foram observados os mesmos resultados descritos para o MTA, ou seja, ocorreu formação de granulações de calcita e ponte de tecido duro. Esta observação sugere que o Sealapex tenha o mesmo mecanismo de ação descrito para o MTA (HOLLAND et al., 2002a).

Em nossa pesquisa, como esperado, ambos os materiais retrobturadores apresentaram maior calcificação, em cada período experimental, quando comparados com o grupo controle. A calcificação foi observada através da presença de granulações Von Kossa positiva no tecido próximo ao material. Na comparação entre os grupos, a calcificação do Sealapex Consistente foi mais evidente quando comparado ao tubo vazio nos períodos de 60 ( $p=0,0017$ ) e 90 ( $p=0,0081$ ) dias. Embora o MTA tenha apresentado calcificação após 90 dias em relação ao tubo vazio, o resultado não foi estatisticamente significativo ( $p>0,05$ ). Nos períodos experimentais (sete, 60 e 90 dias), quando realizada comparação entre o MTA e Sealapex Consistente, não foi possível obter associação estatística, embora com 60 dias o Sealapex Consistente demonstre maior calcificação (Figura 19 D).

Segundo Duarte et al., (2000) e Duarte et al., (2003), o cálcio e a liberação do pH do MTA é mais elevado no período inicial, enquanto o Sealapex produz um pH alcalino e apresenta maior liberação de cálcio e íon hidroxila após longos períodos. Isto poderia justificar os resultados encontrados em nossa pesquisa, na qual observou-se, com o passar do tempo, um aparente aumento na calcificação no grupo Sealapex Consistente e diminuição no grupo MTA. Avaliando a calcificação pelo HE ao invés da técnica Von Kossa, resultados semelhantes foram encontrados por Vita, et al., (2008). Segundo Gomes Filho et al., (2008), a alta solubilidade do cimento Sealapex aumenta seu efeito fisicoquímico e biológico, comparado com outras matérias à base de hidróxido de cálcio. Pois, o aumento do pH tem ação bactericida, interfere na atividade osteoclástica e promove uma alcalinização adjacente

ao tecido. Os íons cálcio são importantes na ativação da adenosina trifosfato cálcio-dependente, migração e diferenciação celular e reagem com o gás carbônico do tecido para formar cristais de carbonato de cálcio, os quais servem de núcleos para calcificação. Estas atividades biológicas podem explicar os bons resultados do uso clínico de alguns cimentos contendo hidróxido de cálcio. A liberação de mais íons cálcio e hidroxila pode conduzir o selamento biológico do ápice radicular formando tecido mineralizado.

Resultados semelhantes foram encontrados para o MTA (HOLLAND et al, 2001; HOLLAND et al 2002b; MORAIS et al. 2006; GOMES FILHO et al., 2009a; GOMES FILHO et al., 2009b; GOMES FILHO et al, 2010; GOMES FILHO et al.,2011); para o Sealapex puro (HOLLAND et al., 2002a; GOMES FILHO et al, 2008; GOMES FILHO, et al 2011). Ao utilizar a técnica de Von Kossa, Lopes et al. (2003) não observaram a formação de áreas basófilas calcificadas quando se implantou o MTA dentro de tubos de polietileno em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Tal acontecimento, segundo esses autores, poderia ser devido à localização do corte no tecido ou ao material com o qual é confeccionado o tubo, o que não favorecia áreas de calcificação, como é o caso de tubo confeccionado por dentina.

Outros trabalhos de pesquisas, utilizando dentes de cães ou implantes em alvéolos de ratos, também têm comprovado a capacidade tanto do MTA como Sealapex Consistente em estimular a formação de tecido duro durante o reparo apical e periapical (LUIZ, 2003; BERNABÉ;HOLLAND, 2004; FELIPE, M.C.S.; FELIPE, W.T.; ROCHA 2006; TONAMORU FILHO et al., 2006; BERNABÉ et al., 2007; CINTRA et al., 2009; BERNABÉ et al 2010; WALIVAARA, et al., 2012).

A dinâmica da MEC no reparo do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, após os implantes dos materiais experimentais e controle, foi avaliada através da análise da expressão, pela imunofluorescência indireta, das glicoproteínas adesivas (fibronectina e laminina) e proteínas estruturais (colágeno tipo III e tipo I) durante os períodos experimentais de 7 e 90 dias. Aos 7 dias, após análise dos resultados, no grupo controle, observou-se presença de fibronectina com reação imunofluorescente variando de discreta a moderada nas três amostras avaliadas. Resultados semelhantes foram observados em duas amostras, para os grupos Sealapex Consistente e MTA. No período de 90 dias, houve redução na presença de fibronectina no grupo controle, assim como os grupos MTA e no Sealapex Consistente. Porém o SC teve uma redução de marcação mais pronunciada (Figura 46 A). Mizuno e Banzai (2008) afirmaram que os íons cálcio liberados pelo hidróxido de cálcio estimulam a síntese de fibronectina e que este processo é dose dependente, ou seja, quanto maior a

quantidade de íons cálcio liberada, maior a síntese de fibronectina. Em nosso estudo, não foi possível fazer esta associação, pois com sete dias a expressão de fibronectina foi semelhante ao grupo controle comparado aos grupos experimentais. A explicação deste resultado pode estar relacionada com o número pequeno de amostra, em que a hipótese de nulidade pode ser aceita, quando na verdade ela é falsa. Com um número amostral maior, haveria possibilidade de os implantes com os materiais indutores de calcificação e fibrose terem maior expressão de fibronectina. Aos 90 dias, como esperado, houve redução na expressão de fibronectina em todos dos grupos.

Nos grupos experimentais, no período de sete dias, a expressão de laminina teve imunomarcção em duas das três amostras avaliadas, variando entre discreta a moderada. Porém, a expressão de laminina foi maior para o MTA, seguida dos grupos controle e Sealapex Consistente. No tempo experimental de 90 dias, a expressão de laminina aumentou em todos os grupos experimentais. Entretanto, este aumento parece ter sido maior, também, no grupo MTA, seguido dos grupos Sealapex Consistente e tubo vazio respectivamente. Segundo Andrade, (2003); Kumar, Abbas e Fausto (2005), o nível da concentração de laminina eleva-se no local quando as estruturas que contêm membrana basal estão sendo formadas. A angiogênese é estimulada por inúmeros fatores. Talvez o contato do tecido com os materiais retrobturadores (Sealapex Consistente e MTA) possa justificar o aumento de novos vasos aos 90 dias, já que o normal é uma neoformação de vasos mais acentuada na fase inicial do reparo, durante a formação do tecido de granulação.

Com sete dias, no grupo Sealapex Consistente, observou-se expressão de colágeno tipo III com graduação discreta em duas das três amostras avaliadas. Nos grupos controle (tubo vazio) e MTA apenas em uma amostra houve marcação de colágeno tipo III, com graduação moderada e discreta respectivamente. Após 90 dias, houve aumento na expressão de colágeno tipo III em todos os grupos experimentais, sugerindo maior expressão de marcação para o Sealapex Consistente, seguido dos grupos MTA e tubo vazio. Aos sete dias, nos grupos experimentais, houve marcação de colágeno tipo I em todas as amostras avaliadas, com maior expressão para o grupo MTA, enquanto que no grupo controle a marcação foi discreta e em apenas uma amostra. No período de 90 dias, no grupo controle, a marcação de colágeno tipo I foi igual ao período de sete dias, enquanto a marcação nos grupos Sealapex Consistente e MTA sugere aumento na expressão da imunofluorescência para o colágeno tipo I.

Na fase proliferativa do reparo, no tecido de granulação, verifica-se a presença de colágeno tipo I e III. Na remodelação do tecido cicatricial a maior parte do colágeno produzido inicialmente é do tipo III que posteriormente é lisado e substituído pelo colágeno tipo I que predomina e caracteriza um tecido conjuntivo fibroso mais amadurecido (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; CONSOLARO, 2009). Em nosso estudo, aos 90 dias, resultado diferente foi encontrado, ou seja, nos grupos experimentais, observou-se um aumento na produção de colágeno tipo III com o passar do tempo. Isto é curioso, pois de acordo à literatura o colágeno tipo III predomina na fase inicial do processo reparativo. Embora se tenha observado qualitativamente uma maior produção de colágeno tipo III, nos grupos experimentais (SC e MTA), comparado ao grupo controle, tal diferença não foi estatisticamente significativa. O número pequeno de amostra pode ter influenciado nestes resultados, ou seja, caso exista uma diferença na expressão de colágeno tipo III entre os grupos experimentais, esta não foi possível ser observada estatisticamente.

Na literatura observa-se a busca por classificar os graus de reação inflamatória, procurando avaliar os fatores como o componente celular inflamatório, a ocorrência da condensação fibrosa e a ocorrência de abscesso e necrose tecidual. Segundo a Federation Dentaire International (FDI) e a International Organization of Standardization (ISO), os critérios de avaliação dos resultados, de testes realizados em tecido subcutâneo de ratos, podem ser classificados em aceitável e não aceitável. Esta interpretação deve ser feita de acordo com a evolução do quadro reacional presente em contato com os materiais experimentais (COSTA, 2001b; SCARPABO, 2007).

Desta forma, analisando nossos resultados e correlacionando-os com o critério de biocompatibilidade sugerido por Costa, (2001b), observou-se que os grupos MTA e o Sealapex Consistente são considerados como aceitáveis e que ambos estimulam a mineralização. Os materiais retrobturadores utilizados nesta pesquisa tiveram comportamento biológico semelhante, a resposta inflamatória manteve-se discreta, na maioria das vezes, do início ao final do experimento. A presença do material retrobturador em contato com o tecido pode permitir ou até induzir o reparo, mesmo estando associado a uma inflamação discreta e duradoura, como foi observado em nossa pesquisa. Segundo Reys-Carmona et al, (2010) o MTA induz um ambiente pró-inflamatório e que o processo de biomineralização ocorre simultaneamente com a resposta aguda e de cura, isto promove a integração do biomaterial com o ambiente.

Durante a análise qualitativa e semi-quantitativa da dinâmica do reparo da MEC, comparando os resultados com sete e 90 dias de observação, observou-se que houve redução de expressão de fibronectina, aumento de laminina e de colágeno tipo III e tipo I. Em uma das fases do processo reparatório denominada de remodelamento, ocorre substituição da matriz extracelular em etapas. Na proporção em que o tecido cicatricial amadurece, o colágeno maduro (tipo I) aumenta gradativamente. Paralelamente, o colágeno tipo III (imaturo) vai sendo absorvido e substituído por um tipo de colágeno mais resistente. Analisando a figura 22 (d), observa-se esta tendência para o colágeno tipo I. Porém, este aumento não era esperado para o colágeno III, conforme observado também na figura 22 (c).

A maioria dos estudos em animais, principalmente em tecido subcutâneo de ratos, sobre biocompatibilidade de materiais retrobturadores tem se limitado aos aspectos morfológicos e histomorfológicos das reações teciduais causadas pelos componentes dos cimentos implantados. Pouco conhecimento sobre o padrão de expressão das proteínas da matriz extracelular, durante o reparo do tecido, em contato com materiais retrobturadores, tem sido publicado. Mesmo com um número pequeno de amostras, o presente estudo descritivo, através da técnica de imunofluorescência indireta, teve como objetivo contribuir e despertar novas pesquisas quanto à dinâmica da matriz extracelular durante o reparo tecidual, neste ou em outro modelo experimental. Devido a escassas publicações avaliando os parâmetros estudados nesta pesquisa, através da técnica de imunofluorescência indireta, foi difícil encontrar trabalhos na literatura sobre a dinâmica da matriz conjuntiva extracelular em torno desses materiais retrobturadores. Assim, na nossa discussão, tivemos dificuldades em confrontarmos nossos resultados encontrados. Então, mais estudos são necessários para melhor compreender os reflexos causados pelos materiais retrobturadores quando em contato com os componentes da matriz extracelular, na tentativa de desenvolver uma estratégia de tratamento que favoreça um melhor reparo tecidual.

## 9 CONCLUSÃO

- 1- O implante de materiais retrobturadores em tecido celular subcutâneo de ratos é um bom modelo para o estudo. Através da microscopia óptica, foi possível avaliar o processo inflamatório, tecido de granulação, fibrose, calcificação e reparo tecidual da reação tissular em torno do MTA e Sealapex Consistente.
- 2- A análise dos componentes da MEC pesquisados através da IFI, em torno dos materiais retrobturadores avaliados, nos períodos experimentais de sete e 90 dias, pós-implantes subcutâneo, evidenciou uma diminuição da produção de fibronectina e aumento da quantidade de laminina, colágenos tipo I e tipo III, embora sem diferença estatística;
- 3- Houve calcificação variável no tecido em torno dos dois materiais, estando ausentes no grupo controle.
- 4- Segundo o critério de biocompatibilidade, seguido neste estudo, concluímos que os materiais retrobturadores MTA e o Sealapex Consistente são considerados como aceitáveis.

## 10 PERPECTIVAS

O modelo de implante de tubos de polietileno, contendo materiais endodônticos, no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, é um recurso metodológico comprovadamente satisfatório para o teste de biocompatibilidade (TORNECK, 1966; COSTA, 2001a, LOPES, 2003; GOMES FILHO et al., 2009a, 2009b; GOMES FILHO, et al., 2011; CUNHA, et al., 2011). Entretanto, a região periapical, onde é realizada uma cirurgia parendodôntica com o uso de um material retrobturador, está envolvida por diferentes tecidos. Logo, o sucesso desta cirurgia está na dependência do processo reparatório de estruturas teciduais como cimento, osso alveolar e ligamento periodontal. Assim, faz-se necessário eleger outra metodologia que possa reproduzir o mais próximo possível as condições periapicais. Dentre estas podemos citar implantes em alvéolos de ratos (CINTRA, et al., 2010) e em dentes de cães (LUIZ, 2003). Assim, estes modelos poderiam simular, de forma mais adequada, o processo de reparo em torno de materiais retrobturadores. Portanto, usando uma destas metodologias pode-se:

- Avaliar as proteínas de matriz (colágeno tipo I) e as glicoproteínas (fibronectina , tenascina e laminina) durante o reparo em tecido ósseo utilizando a técnica de imunohistoquímica;
- Avaliar as proteínas não-colágenas constituintes da matriz orgânica de tecidos mineralizados: osteonectina (OCN), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OCC) utilizando a técnica de imunohistoquímica.

## 11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, Z. A. Tecido conjuntivo, reparo, regeneração e cicatrização. In: MONTENEGRO, Mario R. ; FRANCO, Marcelo. *Patologia processos gerais*. 4. ed. São Paulo: Ateneu, 2003. cap. 8, p. 135-1151.
- AMERICAN DENTAL ASSOCIATION/AMERICAN NACIONAL STANDARDS INSTITUTE. *Document n. 41 for recommended standard practices for biologic evaluation of dental materials*. Council of Dental Materials and Devices. (Documento n.41),1979
- ASGARY, S.; EGHHAL, M. J.; EHSANI, S. Periradicular regeneration after endodontic surgery with calcium-enriched mixture cement in dogs. *Journal of endodontic*, v. 36, n. 5, p. 837-841, 2010.
- BAEK, S. Ho. et al. Periapical bone regeneration after endodontic microsurgery with three diferente root-end filling materials: Amalgam, SuperEBA, and Mineral Trioxide Aggregate. *Journal of endodontic*, v. 36, n. 8, p.1323-25, 2010.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n.1, jan/mar. p. 27-51, 2005.
- BERNABÉ, P. F. E. ; HOLLAND, R. Cirurgia parendodôntica: como praticá-la com embasamento científico. In: ESTRELA, Carlos. *Ciência Endodôntica*. São Paulo: Artes Médica, 2004. Cap.16, p. 657-797.
- BERNABE, P. F. E. et al., Histological evaluation of MTA as a root-end filling material. *International Endodontic Journal*, v. 40, p. 758–765, 2007.
- BERNABÉ, P.F. E. et. al. Histologic evaluation of the use of membrane, bone graft, and MTA in apical surgery. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 109, p. 309-314, 2010.
- BUSATO, A. et al. Agregado de trióxido mineral - Indicações clínicas de um novo cimento dentário. *JBC- Jornal Brasileiro de Clínica & Estética em Odontologia*, Curitiba-PR, v.3, n. 18, p.32-34, 1999.
- CAMILLERI, J. et al. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dental Materials*, v. 21, p. 297-303, 2005.
- CAMILLERI, J. ; PITT FORD, T. R.. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *International Endodontic journal*, v. 39, p.747-754, 2006.
- CAMILLER, J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent.*, v.11, n. 4, p.141-143, 2008.
- CHONG, B. S.; PITT FORD, T. R. Root-end filling materials: rationale and tissue response. *Endodontic Topic.*, v.11, p. 114-130, 2005.
- CINTRA, L. T. A. et al. Evaluation of subcutaneous and alveolar implantation surgical sites in the study of the biological properties of root-end filling endodontic materials. *J. Appll Oral Sci.* v. 18, n. 1, p. 75-82, 2010.

- CINTRA, L. T. A. et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of a new root canal sealer and root-end filling material. *Dental Traumatology*. p. 1-6, 2012.
- COSTA, C. A. S. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: ESTRELA, C. *Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia*. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001a. cap. 9, p. 147-160.
- COSTA, C. A. S. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: ESTRELA, C. *Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia*. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001b. cap.10, p.163-194.
- CONSOLARO, A. Inflamação e reparo. Dental Press, Maringá, 352p, 2009.
- COUTINHO-NETO, J. ; MEDONÇA, R. J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol.*, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.
- CUNHA, S. A. Biocompatibility of sealers used in apical surgery: A Histological study in rat subcutaneous tissue. *Braz Dent J*, v. 22, n.04, p. 299-305, 2011.
- DESAI, S.; CHANDLER, N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: A review. *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 4, p.475-80, Apr. 2009.
- DREGER, L. A. S. et al. Mineral trioxide aggregate and Portland cement promote biomineralization in vivo. *Journal of Endodontics*, v. 38, n. 3, p. 324-29, Mar. 2012.
- DUARTE, M A. H. et al. Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers. *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 7, p. 389-390, July, 2000.
- DUARTE, M. A. H. et al. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontic*, v.95, n. 3, p. 345-7,2003.
- ELDENIZ, A. U. et al. Evaluation of pH and calcium ion release of a root canal sealer in comparison with Apexit and Sealapex sealers. *Oral Surgery Oral Med Oral Pathology Oral Radiol Endod.*, v. 103, n. 3, p. 86-91, Mar. 2007.
- FÉDÉRATION DENTAIRE INTERNATIONALE – Commission of dental materials, Instruments, equipment and therapeutics. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int. Dent. J.*, London, v. 30, n. 2, p. 140-88,1980
- FELIPE, W. T.; FELIPE, M. C. S.; ROCHA, J.C. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *International Endodontic Journal*, v. 39, p. 2-9, 2006.
- GASELLA, G.; FERLINTO, S. The use of mineral trioxide aggregate in endodontics. *Minerva Stomatológica*. V. 55, n.3, p. 123-135, March 2006.
- GOMES-FILHO, J. E. et al. Reaction of rat connective tissue to a new calcium hydroxide-based sealer. *Oral Surgery Oral Med Oral Pathology Oral Radiol Endod*, v. 106, n. 2, p. 71-76, Aug. 2008.
- GOMES-FILHO J.E. et al. A Mineral Trioxide Aggregate Sealer Stimulated Mineralization. *Journal of Endodontics*. v. 35, n. 2, p. 256-260, Feb. 2009a.

- GOMES-FILHO, J. E., et al. Evaluation of the Tissue Reaction to Fast Endodontic Cement(CER) and Angelus MTA. *Journal of endodontic*, v. 35, n. 10, p. 1377-1380, Oct. 2009b.
- GOMES-FILHO, J. E. et al. Evaluation of tissue reaction, cell viability and cytokine production induced by sealapex plus. *J Appl Oral Sci.*, 2010.
- GOMES-FILHO, J.E. et al., Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX. *Dental Traumatology* 2011.
- HOLLAND, R.; SOUZA, V., Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *Journal of Endodontics*. v. 11, n. 12, p. 535-543, Dec. 1985.
- HOLLAND, R et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*. v. 25, n. 3, p. 161-6, 1999.
- HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Brazilian Dental Journal*. v. 12, n. 1, p. 3-8, 2001.
- HOLLAND, R. et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide- containing sealers. *Journal of Endodontics*. v. 28, n. 3, p. 173-6, Mar. 2002a.
- HOLLAND, R. et al. Agregado de trióxido mineral (MTA): Composição, mecanismo de ação, comportamento biológico e emprego clínico. *Revista Ciência Odontológicas*. v. 5, n. 5, p. 7-21
- INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. *Biological Testing of Medical and Dental Materials and Devices*. Geneve, (ISO 10993 Draft), 1991.
- INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. *Dentistry – Preclinical evaluation of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials*. Geneve,(ISO 7405 Draft),1997
- KIRK-OTHMER, Encyclopédia of chemical technology. 3. ed. 1984. v. 24, p. 854-859, 1984.
- KOWALSKI, R. et al. Estudo comparativo da resposta biológica ao implante submucoso em ratos de cimento agregado trióxido mineral (MTA) de duas marcas comerciais. *Odontologia Clínica Científica*, v. 3, n. 1, p. 17-24, jan/abr. 2004.
- KUMAR, Vinay.; ABBAS, Abul K.; FAUSTO, Nelson. Inflamação aguda e crônica. In: *ROBBINS e Cotran Patologia: – bases patológicas das doenças*. 7 ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005 cap. 2, p. 49-89.
- KUMAR, Vinay.; ABBAS, Abul K.; FAUSTO, Nelson. Tecido de Renovação e Reparações: Regeneração, Cicatrização e Fibrose. In: *ROBBINS e Cotran Patologia: – bases patológicas das doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005 cap. 3, p. 91-124.
- LEAL, J. M.; BAMPA, J. U.; NETO, A. P. Cirurgia parentodônticas indicações, contra-indicações, modalidades cirúrgicas. In: LEONARDO, M. R. *Endodontia tratamento de*

*canais radiculares princípios técnicos e biológicos*. São Paulo: Artes Médicas, 2008. v. 2 cap. 30, p. 1243-1323.

LEE, S. J.; MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of Endodontics*, v. 19, n.11, nov. p. 541-544,1993.

LEONARDO, M. R. et al. Reparação apical e periapical de dentes de cães com lesão periapical crônica após tratamento endodôntico utilizando diferentes materiais obturadores. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, v.17, n.1, p. 69-74, 2003.

LEONARDO, M.R. et al. A histopathological evaluation Root canal adhesive filling in dog's teeth with or without coronal. *Journal of Endodontics Restoration*, v.33, n.11, p.1299-1303, nov. 2007.

LOPES, H. P. et al. Reação do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao MTA e ao hidróxido de cálcio. R B. O. – *Revista Brasileira de Odontologia*. v. 60, n. 4, p. 274-276, jul./ago, 2003.

LUIZ, M. R. Avaliação do reparo apical e periapical, em dentes de cães com lesão periapical após obturação retrógrada com diferentes materiais retrobturadores.

2003. 193p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

MALLORY, F. B. *Pathologica Technique*. New York: Hafner Publishing Co. 1961, p. 144

MENEZES, R. et al. Reações tissulares ao MTA, cimento Portland e a um cimento experimental. *Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica*, Curitiba, v. 1, n. 4, p.11-16, abr./jun. 2005.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol*.v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MIDWOOD, K. S; WILLIAMS, L. V; SCHWARZBAUER, J. E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *International journal of biochemistry & cell biology*, 36, 1031-1037, 2004.

MIDWOOD, K. S. ; To, W. S. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, v. 4, n. 21, p. 1-17, 2011.

MIZUNO, M. ; BENZAI, Y., Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression. In dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *International Endodontic Journal*, v. 41, p. 933-938, 2008.

MONTENEGRO, M.R.; FECCHIO, D. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: MONTENEGRO, Mario R.; FRANCO, Marcelo. *Patologia processos gerais*. 4 ed. São Paulo: Ateneu, 2003. cap. 6, p. 109-128.

MORAES, C. A. H. et al. Evaluation of tissue response to MTA and Portland cement with iodoform. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontic.*, v. 1, n. 6, p.1-5, June, 2006.

- MOTA, C .C. B. O. et al. Propriedades e aspectos biológicos do agregado trióxido mineral: Revisão da literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 39, n. 1, p. 49-54, Jan./Fev. 2010.
- PELLICCIONI. G. A. et al. Evaluation of osteoblast-like cell response to Proroot MTA (mineral trioxide aggregate) cement. *J. Mater Sci Mater Med.*, v. 15, n. 2, p. 167-73, Feb. 2004.
- PERASSI, F. T. et al. Estudo morfológico da resposta tecidual a quatro cimentos endodônticos. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 37, n. 2, p. 117-24, 2008.
- PEREIRA, A. L. A. et al. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. *Rev. Bras Otorrinolaringol.*, v. 71, n. 1, p. 81-6, 2005.
- QUEIROZ, A. M. et al. Subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. *Braz Dent J*, v. 22, n. 3, p. 203-11, 2011.
- RAITZ, R. O papel da matriz extracelular na cicatrização de feridas bucais. *Rev. inst Cien Sal*, v. 26, n. 3, p. 351-566, 2008.
- REYES-CARMONA et al. Host-Mineral Trioxide Aggregate Inflammatory Molecular Signaling and Biomineralization Ability. *Journal of endodntic*, v. 36, n. 8, p.1347-1353, Aug. 2010.
- ROBERT-LOBAT, J., Cell-Matrix interactions, the role of fibronectin and integrins. A survey. *Pathologie Biologie*, v. 60, p. 15-19, 2012.
- ROMBERGER, D. J. Molecule in focus. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 29, p. 939-943, 1997
- RUIZ, P. A. Perfurações Endodônticas: revisão da literatura. *Rev Bras Patol Oral, Natal*, v. 2, n. 2, p. 45-50, abr./jun. 2003.
- SAEED, A.; EGHBAL, M. J.; EHSANI, S. Periradicular regeneration after endodontic surgery with calcium-enriched mixture cement in dogs. *Journal of endodontic*, v. 36, n.5, p. 837-841 may, 2010.
- SCARPABO, Roberta Kochensborger. *Análise da reação tecidual a cimento endodôntico de óxido de zinco e eugenol, a base de resina epóxica e a base de resina metacrilato: estudo in vivo*. 123f. Dissertação (Mestrado em Odontologia-endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- SEUX D, et al. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide containing cement. *Archives of Oral Biology*, v. 36, p. 117–28, 1991.
- SHARI, S. et al. A comparative study of the biocompatibility of three root-en filling materials in rat connective tissue. *Journal of endodontic*, v. 32, n. 8, p. 776-780, Aug. 2006.
- SHAHI. S. et al. Effect of mineral trioxide aggregates and portland cements on inflammatory cels. *Journal of endodontic*, v. 36, n. 5, p. 899-903, May 2010.
- SONG, M.; KIM, E. A prospective randomized controlled study of mineral trioxide aggregate and super ethoxy-benzoic acid as root-end filling materials in endodontic microsurgery. *Journal of endodontic*, v. 38, n. 7, p. 875-879 july, 2012.

- SOTTILE, S. et al. Fibronectin-dependent collagen I deposition modulates the cell response to fibronectin. *Am j Physiol Cell Physiol*, p.1934-1946, 2007.
- SILVEIRA, C. M. M. et al. Biocompatibility of four root canal sealers: A histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J*, v. 22, n. 1, p. 21-27, 2011.
- SIMÕES, DI P. S. *Estudo comparativo entre laser He-Ne e a estimulação elétrica no processo de cicatrização de pele de ratos*.103f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Saúde ) Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2007.
- SIQUEIRA JUNIOR. J.F.; DANTAS. C.J.S. *Mecanismos celulares e moleculares da inflamação*. São Paulo: Medsi, 2000.
- TANOMARU FILHO, M., et al. Evaluation of periapical repair following retrograde filling with different root-end filling materials in dog teeth with periapical lesions. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontic.*, v. 102, n. 1, p. 127-132, July, 2006.
- TORNECK, C. D. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surgery*. v. 21, n. 3, p. 379-87, Mar.1966.
- TORABINEJAD, M., et al. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of Endodontics*. v. 21, n. 7, p. 349-353, july ,1995.
- TORABINEJAD, M.; PITT FORD, T. R. Root and filling materials: a review. *Endodontics & Dental Traumatology*, v. 12, p. 161-78, 1996.
- TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*. v. 25, n. 3, p.197-205, mar. 1999.
- TORABINEJAD, M.; PITT FORD, T. R. Root and filling materials: a review. *Endodontics & Dental Traumatology*, v. 12, p. 161-78, 1996.
- TORABINEJAD, M.; WATSON, T. F.; PITT-FORD, T. R. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod. Baltimore*, v. 19, n. 12, p. 591-595, Dec. 1993.
- VALERA, M. C. et al. Biological compatibility of some types of endodontic calcium hydroxide and glass ionomer cements. *Journal of applied oral science*. v. 12, n. 4, p.294-300, 2004
- VALERA, M. C. et al. Avaliação da compatibilidade biológica do cimento Sealapex e deste cimento acrescido de iodofórmio ou óxido de zinco. *Ciência Odontológica Brasileira*, v. 8, n. 4, out./dez. 2005.
- VITA, W. S. et al. Análise morfológica sequencial da resposta tissular ao implante de dois diferentes materiais retrobturadores no tecido subcutâneo de ratos wistar. *Revista da Pós-Graduação*, v. 15, n. 2, p. 121-28, 2008.
- WAES, V. ; STEFFEN, R. Understanding mineral trioxide aggregate/porttland-cement: A review of literature and background factors. *European Archives of Paediatric Dentistry*, v. 10, n. 2, 2009.

WALIVAARA, D. et al. Periapical tissue response after use of intermediate restorative material, gutta-percha, reinforced zinc oxide cement, and mineral trioxide aggregate as retrograde root-end filling materials: A histologic study in dogs. *J Oral Maxillofacial Surgery*, p. 1-7, 2012.

WITHERSPOON, D. E. ; JOHNSON, R. B. Cirurgia Perirradicular. In: COHEN, Stephen ; HARGREAVES, Kenneth M. *Caminhos da polpa*. 9. ed. São Paulo: Elsevier, 2007 , p. 724-785.

YALTIRIK, M. Reactions of Connective Tissue to Mineral Trioxide Aggregate and Amalgam. *Journal of Endodontics*. v. 30, n. 2, p. 95-99, Feb. 2004.

ZARRABI, M. H. et al. Histologic assessment of human pulp response to capping with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. *Journal of endodontic*. v. 36, p. 1778-81, 2010.

**ANEXO A TÉCNICA VON KOSSA****SOLUÇÕES UTILIZADAS:**

- $\text{AgNO}_3$  5%
- Tiosulfato de sódio a 5%
- Safranina a 0,5%

- 1- Xilol I 10 minutos
- 2- Xilol II 10 minutos
- 3- Álcool I 10 minutos
- 4- Álcool II 10 minutos
- 5- Lavar com água corrente rapidamente
- 6- Lavar com água destilada rapidamente
- 7-  $\text{AgNO}_3$  5% exposto a duas lâmpadas de 100 watts por 90 segundos
- 8- Lavar rapidamente com água estéril e apirogênica.
- 9- Tiosulfato de sódio a 5% 30 segundos
- 10- Lavar rapidamente com água destilada
- 11- Safranina a 0,5% 30 segundos
- 12- Lavar com Álcool I e II 30 segundos
- 13- Lavar com Xilol I e II 5 segundos
- 14- Montar em bálsamo

Técnica adaptada da plataforma de histotecnologia da Fiocruz-Ba (MALLORY, F.B., 1961)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA  
Av. Universitária, S/N - Módulo I - 44.031-460 - Feira de Santana -Ba -  
Fone: (75) 3224-8398 Fax: 8398

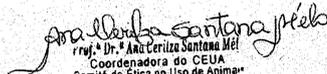
Feira de Santana, 04 de novembro de 2008.

### PARECER

O Projeto de pesquisa n.º. 012/2008 intitulado "DINÂMICA DA FORMAÇÃO DA MATRIZ CONJUNTIVA EXTRACELULAR EM TORNO DE MATERIAIS RETROBTURADORES EM TECIDO SUBCUTÂNEO E ALVÉOLOS DENTÁRIOS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR", de autoria de WALDÉCIO DOS SANTOS VITA, tem como objetivo estudar a dinâmica da matriz extracelular em torno de tubos de polietileno contendo dois materiais retrobturadores, MTA e Sealapex Consistente, em tecido subcutâneo e em tecido intra-ósseo de ratos (*rattus norvegicus*). Para isso, serão utilizados 110 ratos nos implantes intra-ósseos e 50 ratos nos implantes subcutâneos. Para o primeiro protocolo, os animais serão distribuídos em três grupos: grupo experimental - 80 animais; grupo controle - 30 animais. No segundo protocolo, os animais serão distribuídos em cinco grupos de 10 animais. O procedimento anestésico será o seguinte: Acepromazina, medicação pré-anestésica, neuroplégica, tranqüilizante, seguido e Ketamina como um anestésico geral. Após anestesia, será realizada anti-sepsia na área da tricotomia na região dorsal do animal com álcool-iodado, procedendo-se duas incisões de 10 mm de extensão na região mediana do dorso do animal. Nas incisões, será feita divisão lateral do tecido, criando três lojas cirúrgicas, onde serão colocados os implantes, duas lojas na região escapular e uma na região pélvica. Os três tubos de polietileno serão preenchidos, individualmente, com cimentos MTA (Agregado Tri óxido Mineral), Sealapex Consistente e outro tubo ficará vazio e implantados no interior das lojas cirúrgicas e suturados com fio de nylon 5-0. Após esse procedimento, os animais serão monitorados no Biotério da

Universidade Estadual de Feira de Santana. Na etapa seguinte, os animais serão novamente anestesiados e removidos às regiões dos implantes para análise histopatológicas após processamento histológico. Os animais serão mortos por *overdose* de anestésico. Outras técnicas serão realizadas como a Imuno-histoquímica, Imunofluorescência Indireta para tipagem do colágeno Tipos I, II e IV, Fibronectina e Laminina.

Diante do exposto, sou favorável à execução do projeto por considerá-lo dentro das normas da ética no uso de animais experimentais, conforme reunião ordinária do Comitê do dia 28 de outubro de 2008.

  
Prof.ª Dr.ª Ana Carolina Santana Melo  
Coordenadora do CEUA  
Comitê de Ética no Uso de Animais  
CEUA/UEFS  
Dist. 497/2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**PROTOCOLO: **023/2009**

**PROJETO: "DINÂMICA DA FORMAÇÃO DA MATRIZ CONJUNTIVA EXTRACELULAR EM TORNO DE MATERIAIS RETROBTURADORES EM TECIDO SUBCUTÂNEO E ALVÉOLOS DENTÁRIOS: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR".**

COORDENADORA: **Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos**

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Ratos Wistar	50

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 20/11/2009, e tem validade até 20/10/2011.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 11/20/2009, being valid until 10/20/2011.

Salvador, 26 de novembro de 2009.

**Dr. Manoel Barral-Netto**  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ