

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CAUANA OLIVA TAVARES

**RESPOSTA TECIDUAL A UM CIMENTO ENDODÔNTICO À BASE DE
SALICILATO CONTENDO AGREGADO TRIÓXIDO MINERAL: AVALIAÇÃO EM
TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

PORTO ALEGRE

2012

CAUANA OLIVA TAVARES

**RESPOSTA TECIDUAL A UM CIMENTO ENDODÔNTICO À BASE DE
SALICILATO CONTENDO AGREGADO TRIÓXIDO MINERAL: AVALIAÇÃO EM
TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

**Trabalho de Conclusão apresentado ao
Curso de Especialização em Endodontia
da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, como requisito para obtenção
de título de Especialista em Endodontia**

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Kochenborger Scarparo

PORTO ALEGRE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

T231r Tavares, Cauana Oliva.

Resposta tecidual a um cimento endodôntico à base de salicilato contendo agregado trióxido mineral: avaliação em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos / Cauana Oliva Tavares. – Porto Alegre : 2012. 47 f. : il. color.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Especialização em Endodontia, 2012.

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Kochenborger Scarparo.

1. Odontologia. 2. Endodontia. I. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia. II. Scarparo, Roberta Kochenborger. III. Título.

CDU 616.314

Bibliotecária: Fernanda B. Handke dos Santos – CRB 10/2107

CAUANA OLIVA TAVARES

RESPOSTA TECIDUAL A UM CIMENTO ENDODÔNTICO À BASE DE SALICILATO
CONTENDO AGREGADO TRIÓXIDO MINERAL: AVALIAÇÃO EM TECIDO
CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Especialização em Endodontia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção de título
de Especialista em Endodontia

Porto Alegre 20 de janeiro de 2012

Profa. Dra. Roberta Kochemborger Scarparo
UFRGS / Faculdade de Odontologia

Prof. Dr. Marcus Vinícius Reis Só
UFRGS / Faculdade de Odontologia

Profa. Dra. Fabiana Grecca
UFRGS / Faculdade de Odontologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me dar a oportunidade de ser feliz ajudando o próximo com a minha vocação.

Aos meus pais, Giancarlo Tavares e Máriam Georges Oliva, meu irmão, Gregório Oliva Tavares, e minha avó, Irma Georges, pelo amor incondicional, por acreditar em mim e por me dar força nos momentos de necessidade.

À minha orientadora, Roberta Kochemborger Scarparo, por tornar possível a minha caminhada endodôntica, por me contagiar com tamanho carinho pelo que faz, por suas palavras de incentivo e superação, por sempre estar presente, por nunca desistir, por ser exemplo de profissional e pessoa.

Aos professores do curso de especialização Régis Burmeister dos Santos, João Ferlini Filho, Elaine Fachin, Marcus Vinícius Só e Fabiana Soares Grecca. E também aos professores convidados, Maria Beatriz Ferreira, Simone Luisi, Patrícia Kopper e Francisco Montagner, pelos ensinamentos.

Às colegas de pesquisa, Daiana Böetcher, Eloísa Assman e Carolina Hoppe pela ajuda.

Aos meus colegas de curso e amigos, Priscilla, Lívia, Daiana, Vanessa, Leonardo, Nino e Eduardo, pelos momentos divertidos que passamos juntos e pela troca de conhecimento durante esse curso.

Ao diretor da Faculdade de Odontologia, Pantélis Varvaki Rados, pelo seu apoio, palavras de incentivo e por acreditar no meu crescimento profissional.

A Andréia, secretária do curso de especialização, por sua prontidão, organização e dedicação.

A todos os amigos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento e tornaram a minha vida mais feliz.

RESUMO

TAVARES, Cauana Oliva. **Resposta tecidual a um cimento endodôntico à base de salicilato contendo agregado trióxido mineral: Avaliação em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos.** 2012. 47f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

A aceitação do uso de um determinado produto deve ser baseada em trabalhos experimentais e laboratoriais que comprovem, entre outras propriedades, a sua biocompatibilidade. O presente estudo tem como objetivo avaliar, *in vivo*, a resposta tecidual de um novo cimento à base de MTA –Fillapex– comparando-o com os cimentos Endofill e AH Plus. Para a sua realização, 72 tubos de polietileno preenchidos com cada um dos cimentos foram implantados em tecido conjuntivo subcutâneo do dorso de 18 ratos. Decorrido os períodos experimentais de 7 e 60 dias os animais foram sacrificados e os implantes, bem como o tecido adjacente a ele, removidos. As peças foram fixadas em solução de formol a 10%, preparadas e coradas com hematoxilina e eosina para análise histológica. A análise dos resultados foi baseada na observação de componentes celulares inflamatórios, presença de condensação fibrosa e formação de abscesso, para os quais foram atribuídos escores. A comparação entre os grupos e os períodos foram feitos com os testes ANOVA e complementados pelo *post hoc* de Bonferroni. Os cimentos Fillapex e Endofill demonstraram inflamação mais severa e prolongada ($p > 0,05$). Com o cimento AH Plus, a reação inflamatória demonstrou tendência a diminuir com o tempo. Conclui-se que o MTA-Fillapex não apresentou vantagens biológicas em relação aos cimentos Endofill e AH Plus.

Palavras-chave: Endodontia. Obturação. Materiais obturadores. Biocompatibilidade.

ABSTRACT

TAVARES, Cauana Oliva. **Tissue response to a salicilate based endodontic sealer containing mineral trioxide aggregate: Evaluation in subcutaneous connective tissue of rats.** 2012. 47p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

The aim of this study was to evaluate the subcutaneous biocompatibility of: AH Plus, Endofill and MTA Filapex root canal sealers after 7 and 60 days of implantation. Twelve Wistar rats had subcutaneous sockets created on their back and received four implants each with polyethylene tubes containing one of the materials tested according to the groups: Group I (AH Plus); Group II (Endofill); Group III (Filapex); Group IV (control group – empty tube). After histological processing, sections were analysed to identify the presence of neutrophils, lymphocytes and plasma cells, eosinophils, macrophages and giant cells, as well as fibrous capsule and abscesses, by an examiner using light microscope. Two way ANOVA and *post-hoc* of Bonferroni were used for statistical analysis. Significance level was set at 5%. Endofill and Filapex sealers showed severe and long-lasting inflammatory reaction. With AH Plus, the inflammatory reaction showed a tendency to diminish over the time. We concluded that Filapex did not demonstrated biological advantages related to the other sealers Endofill and AH Plus.

Key words: Endodontics. Root canal filling materials. Biocompatible materials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Posicionamento das incisões para obtenção das lojas cirúrgicas
.....23

Figura 2 - Resultados referentes à classificação da intensidade da ocorrência de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, células gigantes, eosinófilos, fibras e abscesso para os quatro grupos de estudo. Nota-se diferenças estatisticamente significantes dos grupos teste em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) e na comparação entre os dois períodos avaliados considerando o mesmo material (+ $p < 0.05$; ++++ $p < 0.0001$).29

Figura 3 - Resposta do tecido conjuntivo nos grupos controle (A) e no grupo do cimento MTA-Fillapex (B-C) 7 dias pós-operatório. Ao contrário dos grupos teste, já nesse período o grupo em que foi implantado o tubo vazio (EP) apresenta formação de tecido conjuntivo vascularizado e com poucas células inflamatórias (*) e condensação fibrosa (F). Já o MTA-Fillapex (FL) produziu reação inflamatória extensa composta principalmente por linfócitos (setas), não delimitada por cápsula fibrosa. Na amostra aqui representada, nota-se também a presença de alguns neutrófilos e a formação de abscesso próximo à saída do tubo (Δ).....30

Figura 4 - Reação aos cimentos testados. **(A)** Em 60 dias, para o cimento MTA-Fillapex (FL) nota-se infiltrado linfoplasmocitário (*) e células gigantes (GC). **(B)** No mesmo período, o cimento Endofill (B) promoveu manutenção de infiltrado linfoplasmocitário (•) e grande quantidade de macrófagos fagocitando o material (Δ). Já o cimento AH Plus (AHP) apresentou resposta inflamatória moderada (*) em 7 dias **(C)** a qual tornou-se branda e bem delimitada por cápsula fibrosa (setas) após 60 dias **(D)**.31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPRIEDADES GERAIS DOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS	12
2.1 Cimentos à Base de Óxido de Zinco e Eugenol	12
2.2 Cimentos à Base de Resina Epóxica	13
2.3 Cimentos à Base de Agregado de Trióxido Mineral – MTA	14
3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS	18
4 OBJETIVOS	20
5 METODOLOGIA	21
5.1 TIPO DE ESTUDO	21
5.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	21
5.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA	21
5.4 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA	21
5.5 MÉTODOS EMPREGADOS	22
5.5.1 Etapa cirúrgica	22
5.5.2 Eutanásia dos animais, biópsia e processamento histológico	23
5.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS	24
5.6.1 Análise estatística dos resultados	26
6 RESULTADOS	27
7. DISCUSSÃO	32
7.1 METODOLOGIA EMPREGADA	32
7.1.1 Definição do Experimento	32
7.1.2 Avaliação dos resultados	34
7.2 DOS RESULTADOS	45
8. CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Desde a comprovação das bactérias como agentes iniciadores e perpetuadores das doenças pulpares e periapicais (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1968), a especialidade endodôntica preocupa-se em eliminar, neutralizar, impedir o acesso ou eliminar os microorganismos e seus produtos dos canais radiculares por meio de tratamento convencional ou cirúrgico.

O tratamento endodôntico envolve a remoção do conteúdo da cavidade pulpar, bem como o seu alargamento e alisamento. Em dentes com necrose pulpar, com ou sem lesão periapical, visa, também, reduzir o número de microorganismos presentes. Desta maneira, cria-se condições para sua obturação, que deverá ser impermeável para impedir a contaminação ou recontaminação, utilizando um material compatível biologicamente (BERGER et al, 2002).

Devido à impossibilidade de esterilização de toda a massa dentinária, torna-se de extrema importância o selamento interno dos túbulos com material obturador, visando prevenir a infecção ou reinfecção dos canais principais, e conseqüentemente dos tecidos periapicais. (BUCKLEY, 1929). A não obturação completa do canal radicular dos túbulos dentinários ou que venham a contaminá-lo por via permite a infiltração de plasma, o qual servirá como substrato para os microorganismos já presentes no interior endógena, através da circulação. (PRINZ, 1912.)

Por outro lado, além da capacidade de selamento, é de extrema importância que o material a ser empregado na obturação do sistema de canais radiculares seja biocompatível. A biocompatibilidade é definida como a capacidade de um material em extrair uma resposta biológica apropriada quando aplicado em um corpo em contato com os tecidos. O fato de um material ser biocompatível ou não, depende da função física que se solicita do material e de qual resposta biológica necessita-se dele (CRAIG; POWERS, 2004). Quando um biomaterial é colocado em contato com os tecidos e fluidos corporais, invariavelmente há alguma forma de interação entre o material e o ambiente biológico. Um material pode ser considerado biocompatível quando possui a qualidade de não ser destrutivo nesse ambiente. É importante observar que essa interação ocorre de ambos os lados, ou seja, o material pode ser

afetado de alguma forma pelo ambiente biológico, bem como o ambiente biológico pode ser afetado pelo material (VAN NOORT, 2004).

Atualmente, pode-se considerar a compatibilidade biológica de materiais obturadores como aspecto determinante da aceitação e inserção do mesmo no contexto odontológico. Essa preocupação fundamenta-se no fato de que o sucesso do tratamento depende, entre outros fatores, do potencial de irritação do material obturador, tendo em vista o contato deste com os tecidos dentários adjacentes até o término do reparo. Wenger et al. (1978) consideram óbvia a preferência por substâncias obturadoras que estimulam as menores reações inflamatórias.

Na prática clínica, para a obturação do sistema de canais radiculares usualmente são empregados materiais obturadores sólidos – como a guta-percha – associados a cimentos endodônticos (BALTHO, 2004). Isso porque, apesar de apresentar compatibilidade biológica, a guta-percha não sela completamente o canal radicular (CHONG; FORD; KARIYAWASAM, 1997; CINTRA et al., 2006; DEGROOD et al., 1995), necessitando do auxílio de cimentos para proteger os túbulos dentinários e o forame apical contra a invasão microbiana (PÉCORA; SOUZA-NETO, 2001).

Por outro lado, até o momento não se tem um cimento endodôntico com características ideais de biocompatibilidade (SCARPARO et al, 2009), e, na tentativa de selar todo o comprimento de trabalho, o cirurgião-dentista pode acidentalmente extravasar material para os tecidos periapicais. Sendo assim, a busca por cimentos que apresentem boa tolerância tecidual e capacidade de serem reabsorvidos ainda é almejada, visando minimizar os danos causados aos tecidos periapicais e evitar inflamação crônica persistente (SELTZER, 1967).

Dentro desse contexto, nos últimos anos uma variada gama de cimentos endodônticos vem sendo proposta visando aliar capacidade de selamento e biocompatibilidade (BERGER et al, 2002). Entre esses estão incluídos materiais tradicionais como os cimentos a base de óxido de zinco e eugenol, e materiais alternativos, como os cimentos à base de resina epóxica e, mais recentemente, cimentos que contém agregado trióxido mineral (MORGENTAL et al, 2011; TANOMARU-FILHO et al, 2009) .

O cimento Endofill (Dentsply HERO Indústria e Comércio Ltda. – Petrópolis-RJ, Brasil), a base de óxido de zinco e eugenol, possui aceitáveis propriedades físico-químicas. Porém, quando em contato com os tecidos periapicais provoca uma resposta inflamatória crônica (BARBOSA; ARAKI; SPANGBERG, 1993), e por esse motivo, vem sendo utilizado como controle em muitos estudos de biocompatibilidade. Já o cimento AH Plus (Dentsply HERO Indústria e Comércio Ltda. – Petrópolis- RJ, Brasil), a base de resina epóxi, demonstra reação moderada a severa nos primeiros 7 dias. No entanto, após longo período, a reação diminui exibindo resposta inflamatória aceitável, o que faz com que seja considerado “padrão ouro” na análise comparativa de vários estudos (SCARPARO et al., 2009; GRECCA et al., 2011; SILVEIRA et al., 2011; SOUZA et al., 2006; BATISTA et al 2007).

Muitos métodos para avaliar biocompatibilidade vêm sendo usados. Nesse contexto, testes de implantação subcutânea dos materiais em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos é considerado como uma etapa fundamental. A resposta inflamatória causada pela irritação do material pode ser avaliada histopatologicamente ao redor dos implantes (ZMENER et al., 1988; ECONOMIDES et al., 1995).

Por tudo isso, o objetivo deste estudo é analisar a biocompatibilidade de um novo cimento endodôntico, o MTA Fillapex (Ângelus, Londrina, PR, Brasil), comparativamente com os cimentos Endofill e AH Plus.

2 PROPRIEDADES GERAIS DOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS

O cimento obturador aliado à guta-percha são os materiais mais comumente aceitos para o preenchimento do canal radicular. (ESTRELA, 2004). No entanto, ainda não temos um material que reúna todas as propriedades ideais. (BERGER, 2002)

Com o objetivo de se conseguir um selamento ideal, surgiram diferentes cimento endodônticos. Destacam-se os cimentos à base de hidróxido de cálcio, à base de ionômero de vidro, à base de óxido de zinco e eugenol, à base de resina epóxica, e mais recentemente, à base de agregado de trióxido mineral (MTA). Na presente revisão serão abordados os três últimos materiais.

2.1 CIMENTOS À BASE DE ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL

O cimento de Rickert foi introduzido na Endodontia em 1927. Seu uso se consagrou devido às propriedades de estabilidade dimensional, adesão, solubilidade e desintegração, principalmente se comparando a outros cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (ESTRELA, 2004).

Mais tarde, com a colocação de 1% de delta-hidro cortisona na fórmula e observação de melhora no reparo, Sampaio (1972) deu origem ao N-Rickert. No entanto, Figueiredo (1993) constatou tatuagem na mucosa pela presença da prata na formulação deste cimento. Além disso, segundo Grossman (1976), endurece muito rapidamente não dando tempo para correções do cone caso seja necessário.

Em 1958 Grossman desenvolveu o cimento que leva seu nome a fim de aumentar o tempo de presa no momento da obturação. Posteriormente, diferentes versões e marcas comerciais deste cimento foram difundidas, como o FillCanal, EndoFill, Grosscanal e o PulpFill. Estes cimentos apresentam basicamente a seguinte fórmula:

Pó

- protóxido de zinco – 40,5g
- resina hidrogenada – 28g

- subcarbonato de bismuto – 16g
- sulfato de bário – 15g
- borato de sódio anidro – 0,5g

Líquido

- eugenol – 5ml
- óleo de amêndoas doces – 1ml

O cimento EndoFill, utilizado neste estudo, apresenta basicamente a composição original dos cimentos de óxido de zinco e eugenol. Este cimento apresenta facilidade de manipulação e propriedades antimicrobianas interessantes, sendo inclusive utilizado como controle positivo em muitos estudos (MAIA et al., 2010). No entanto, como aspectos negativos, apresenta solubilidade e desintegração elevados e em desacordo com as especificações da ADA (GARRIDO et al., 2010). Além disso, sua boa atividade antimicrobiana se deve ao fato de apresentar eugenol na composição, o que induz morte celular inibindo o crescimento bacteriano e, conseqüentemente, gerando destruição tecidual e inflamação nos tecidos periapicais. (GOMES et al, 2004; MAIA FILHO; BASTOS; NOVAIS, 2008; LEONARDO, 2000).

2.2 CIMENTOS À BASE DE RESINA EPÓXICA

Em 1957 surgiu um cimento a base de resina epóxica, o AH-26. Este cimento foi introduzido no mercado com características diferenciadas, como adesão à estrutura dentária, longo tempo de trabalho, facilidade de manipulação e bom escoamento (LEAL, 1988). Mais tarde, foram surgindo variações da fórmula deste cimento. O cimento AH Plus® (Dentsplay - Maillefer, Suíça), uma das variações do AH-26 (SALLES, 2001), que tem sido estudado e utilizado amplamente. Possui baixa citotoxicidade (SCHWARZE; LEYHAUZEN; GEURSTEN, 2002) e tem apresentado boa capacidade de selamento quando comparado com outros materiais (HAIKEL et al., 1999; DE ALMEIDA et al., 2000). Este cimento é comercializado em duas pastas (pasta epóxi e pasta amina) apresentando a seguinte formulação:

Pasta epóxi:

- resinas epóxicas
- tungstanato de cálcio
- óxido de zircônio
- sílica
- óxido de ferro

Pasta amina:

- aminas
- tungstanato de cálcio
- óxido de zircônio
- sílica
- óleo de silicone

Este cimento tem sido considerado “padrão ouro” em muitos estudos em função de apresentar propriedades físico-químicas e biológicas superiores à outros cimentos até o momento.

Segundo Garrido et al. (2010), Marin-Bauza et al. (2010), Flores et al. (2011) , o cimento AH Plus apresenta um tempo de presa prolongado (entre 8 e 10 horas) e conseqüente bom tempo de trabalho, radiopacidade, escoamento e solubilidade de acordo com as especificações da *American Dental Association*.

Quanto à resposta biológica, demonstra resposta inflamatória severa inicialmente, que diminui ao longo do tempo, assemelhando-se ao grupo controle em 30 dias (SILVEIRA, 2011).

2.3 CIMENTOS CONTENDO O AGREGADO DE TRIÓXIDO MINERAL – MTA

O Agregado de Trióxido Mineral (MTA) introduzido na endodontia em 1993 (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993). Este material tem diversas aplicações, tanto cirúrgicas, como não-cirúrgicas, como por exemplo, selamento de perfurações laterais e de furca, selamento de ápices abertos, capeamento pulpar direto e preenchimento de obturação retrógrada. (ABDULLAH et al., 2002; FORD et al., 1995).

O MTA é um pó composto por partículas finas hidrofílicas que iniciam sua presa, na presença de umidade. A hidratação do pó produz um gel coloidal que forma uma estrutura rígida após 21 dias (TORABINEJAD et al., 1995).

O material consiste principalmente de partículas de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato de ferro tetracálcico, óxido de bismuto e sulfato de cálcio hidratado. (CAMILLERI; PITT FORD., 2006)

Este material ganhou espaço na endodontia por apresentar propriedades físico-químicas interessantes e ser biocompatível (TORABINEJAD, 1995). Destacam-se as seguintes propriedades: estimulação do reparo dos tecidos periapicais (ECONOMIDES et al., 1995) a partir da neoformação de cimento e osso (HOLLAND et al., 2002; HOLLAND R., 2001), efeitos antibacterianos, por apresentar pH de 12,5 (TORABINEJAD et al., 1995), excelente vedação marginal, reduzindo a microinfiltração bacteriana (TORABINEJAD et al., 1997), baixa solubilidade e radiopacidade maior que a dentina (SHAH, 1996).

Da Silva et al (2010) avaliaram dois tipos de MTA existentes no mercado, o MTA ProRoot (Dentsply-Maillefer, Suíça) e o MTA Angelus (Ângelus, Brasil). O experimento avaliou resistência a compressão após 21 horas e 14 dias de imersão em água; radiopacidade; tempo de presa inicial e final; solubilidade; pH inicial, após 1 hora e após 24 horas. Os resultados para todas as propriedades físicas estavam de acordo com a norma ISSO 6876-2:2001.

A desvantagem deste material é relacionada com a dificuldade de manipulação e preenchimento no momento da obturação de canais radiculares. Visando aproveitar as boas propriedades biológicas do MTA, pesquisadores desenvolveram os cimentos a base de MTA com escoamento e manipulação melhorados.

O cimento Endo CPM (CPM Sealer; EGEO SRL, Buenos Aires, Argentina) apresenta como componentes principais o silicato tricálcico, o trióxido de cálcio, aluminato de tricálcico e outros óxidos. O líquido consiste de solução salina e cloreto de cálcio (OROSCO et al., 2008).

Scarparo et al.(2010) compararam a reação tecidual subcutânea do MTA, AH Plus e Endo CPM através do implante destes materiais em tubos de polietileno no dorso de ratos nos períodos de 7, 30 e 60 dias observando componentes celulares inflamatórios, condensação fibrosa e formação de abscesso. Após o período experimental de 30 dias foram observadas maiores quantidades de linfócitos e

plasmócitos para o cimento AH Plus. O comportamento do MTA e do cimento Endo CPM foi similar ao grupo controle durante todos os períodos, demonstrando o caráter biologicamente aceitável deste cimento.

Para Martínes Lalis et al (2009), que compararam o Cimento de Portland (CPM) e o agregado de trióxido mineral (MTA) também no tecido subcutâneo de ratos, todos os grupos apresentaram leve infiltrado inflamatório crônico nos períodos de 7 e 14 dias com predominância de células gigantes e necrose no grupo do MTA. Aos 30 dias do experimento todos os grupos apresentaram tecido fibroso maduro. No grupo do CPM eosinófilos em grandes quantidades foram observados em todos os períodos do experimento.

Assman (2011) relata que o cimento Endo CPM apresenta dificuldades quanto ao tempo de trabalho e escoamento. Recentemente surgiu no mercado mais um cimento endodôntico para obturação do canal radicular, Fillapex (Angelus, Brasil) que proporciona maior tempo de trabalho e melhor escoamento do que o cimento Endo CPM. Segundo o fabricante, agrega a capacidade seladora dos minerais trióxidos com a estimulação de deposição de tecido mineralizado apical. Este cimento pasta-pasta possui em sua formulação resina salicilato, resina diluente, resina natural, óxido de bismuto, sílica nanoparticulada, trióxido agregado mineral e pigmentos. Ao misturar as pastas, um polímero iônico se forma.

Morgental et al. (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana e o pH dos cimentos Endo CPM e Fillapex, utilizando como referências de comparação o cimento Endofill e o MTA. A bactéria *Enterococcus Faecalis* foi utilizada no teste antimicrobiano de difusão em ágar e de contato direto. O grupo encontrou como resultado pH>11 para o grupo do cimento Endo CPM, pH>10 para o grupo do Fillapex e pH>8 para o grupo do Endofill. O Teste de Difusão em Ágar apresentou zonas de inibição similares para os cimentos Fillapex e Endofill, e nenhum cimento demonstrou atividade antimicrobiana pelo Teste de contato direto. Esse resultado demonstra que o efeito antimicrobiano do Fillapex e Endofill se dá até o cimento tomar presa, mesmo que o pH seja alto.

Sagsen (2011) realizou um estudo de *push-out* testando os cimentos AH Plus, I Root SP (Innovative BioCeramix Inc, Vancouver, Canadá) e Fillapex. Foram selecionados 30 dentes unirradiculares e distribuídos em 3 grupos (n=10). Em cada

grupo foi feito o preparo do canal radicular e a obturação com técnica de condensação lateral utilizando guta-percha e o cimento respectivo a cada grupo. Foram feitos cortes de 1mm na porção coronária, média e apical das raízes para serem analisados pela Máquina de Teste Universal de *Push-out*. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para a parte coronária. Nos segmentos médio e apical, o Fillapex apresentou valores significativamente mais baixos que os outros dois grupos.

No entanto, o cimento Fillapex não apresenta trabalhos na literatura que comprovem a sua biocompatibilidade.

3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS CIMENTOS ENDODÔNTICOS

Como notória desvantagem, devido à capacidade de produzir morte celular do eugenol, o cimento Endofill® apresenta resposta inflamatória intensa no periápice. Scarparo, et al (2009) analisaram as reações inflamatórias aos cimentos AH Plus, EndoRez e Endofill nos tecidos subcutâneos de ratos e concluíram, assim como Batista et al (2007), que o cimento Endofill tem um grande potencial inflamatório. A irritação continuou intensa após os três períodos experimentais (7, 30 e 60 dias) podendo ser observado grande infiltrado linfoplasmocitário e macrófagos, além de abscesso. A condensação fibrosa foi considerada irrelevante ou inexistente após 7 dias e muito fina e desorganizada após 30 e 60 dias. Estas características indicam que a inflamação aguda permanece por longos períodos.

Com relação à compatibilidade biológica do AH Plus, Scarparo, Grecca e Fachin (2009) investigaram a reação inflamatória, formação de tecido fibroso e de abscesso. Os cimentos EndoRez, AH Plus e Endofill foram implantados dentro de tubos de polietileno no tecido subcutâneo do dorso de 18 ratos. Após 7, 30 e 60 dias as amostras foram processadas para análise histopatológica. No grupo do cimento AH Plus o número de células inflamatórias decresceram ao longo dos 3 períodos experimentais exibindo resposta similar ao grupo controle após longos períodos. Observaram também um aumento na condensação fibrosa após 60 dias quando comparado com o período de 7 dias.

Batista et al. (2006) avaliaram a reação inflamatória dos tecidos subcutâneos de ratos aos cimentos Endofill®, Endomethasone®, Sealer 26®, AH-Plus®, em 7, 14 e 30 dias após o implante desses cimentos, utilizando somente guta-percha no grupo controle. A análise histopatológica revelou que o cimento Endomethasone® obteve o melhor comportamento biológico para todos os períodos pós-implante, seguido Sealer 26® e AH Plus®. Este último produziu reação inflamatória de moderada a intensa aos 7 dias. Após 14 dias, houve uma variação significativa, sendo de moderada a intensa em algumas áreas e em outras áreas a reação foi discreta. Com 30 dias, a inflamação foi considerada discreta a moderada, demonstrando caráter irritativo apenas durante o período inicial pós-implante. O cimento Endofill® provocou reação mais severa produzindo inflamação moderada a

intensa em todos os tempo experimentais. Os autores chegaram a conclusão de que a intensidade da resposta inflamatória está relacionada com o tipo de selamento, quantidade de material utilizado e o período pós-implante.

No estudo de Farhad et al (2011) foram analisadas as reações inflamatórias de 30 ratos divididos em 3 grupos, sendo 10 ratos sacrificados no final de cada período (15, 30 e 60 dias). Os cimentos testados foram: AH Plus, Epiphany e Grossman. O cimento de Grossman obteve a reação inflamatória mais severa, seguido pelo Epiphany e AH Plus, que não obtiveram diferença na resposta inflamatória estatisticamente significativa. O cimento AH Plus revelou inflamação moderada aos 15 dias de experimento e leve aos 30 e 60 dias, confirmando o caráter decrescente da resposta inflamatória com o passar do tempo.

Com relação ao efeito citotóxico e mutagênico dos cimentos endodônticos AH 26 e AH Plus in vitro, Huang et al (2002) concluíram que ambos os cimentos apresentam efeitos citotóxicos e genotóxicos dependendo da dose utilizada, sendo que o AH Plus produziu mais danos ao DNA do que o AH-26 quando aplicadas mesmas doses.

Souza et al. (2006) avaliaram a compatibilidade intra-óssea dos cimentos AH Plus, EndoREZ e Epiphany em 30 *guinea pigs*. Foram divididos 10 animais para cada material em períodos experimentais de 4 e 12 semanas. Foi colocado um implante de cada lado da mandíbula e após os períodos de experiência, a reação inflamatória foi analisada através de exame histopatológico. Foi observada reação severa no cimento EndoREZ. No cimento Epiphany foi observado reação inflamatória leve ou nenhuma reação. No grupo do cimento AH Plus, foi observado reação severa no período de 4 semanas com presença de linfócitos, macrófagos e células gigantes, além de fragmentos ósseos necróticos. Ao final das 12 semanas tornou-se reação crônica moderada, com presença de células gigantes e formação de tecido ósseo imaturo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é analisar, em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, a resposta frente a um cimento endoôntico à base de salicilato contendo MTA (MTA Fillapex), comparando com os cimentos Endofill e AH Plus.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar histologicamente os componentes celulares do processo inflamatório;
- Avaliar histologicamente a condensação fibrosa desencadeada pelos materiais testados;
- Avaliar a formação de abcesso frente aos materiais testados.

5 METODOLOGIA

5.1 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo consiste em um trabalho experimental em animais. A fim de avaliar a biocompatibilidade de cimento endodôntico, foram realizados teste de implantação subcutânea de tubos de polietileno preenchidos pelos materiais experimentais em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Trata-se de um estudo cego, calibrado ($Kappa > 6$ para todas as variáveis avaliadas) controlado pela ausência de material inserido nos tubos de um dos grupos.

5.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo atende às normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA e do Código de Proteção aos Animais, havendo sido apresentado projeto aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob o número 20374.

5.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

A fase experimental desse estudo foi realizada nas instalações do Biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O preparo e análise das lâminas foram realizados no Laboratório de Patologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

5.4 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi composta de dezoito ratos *wistar* divididos em três períodos experimentais. Foram testados três cimentos endodônticos inseridos em tubos de polietileno. Como controle utilizaram-se tubos de polietileno vazios. Sendo assim, ficaram definidos 4 (quatro) grupos de estudo: cimento endodôntico à base de resina epóxica (AH Plus - Dentsply HERO Indústria e Comércio Ltda. – Petrópolis- RJ, Brasil) – Grupo I; cimento de óxido de zinco e eugenol (Endofill - Dentsply HERO

Indústria e Comércio Ltda. – Petrópolis- RJ, Brasil) – Grupo II; cimento a base de MTA (Fillapex – Ângelus, Londrina, PR, Brasil) – Grupo III; grupo controle (tubo vazio) – Grupo IV.

5.5 MÉTODOS EMPREGADOS

5.5.1 Etapa cirúrgica

Foi preparada a mesa operatória com material cirúrgico esterilizado. Os procedimentos foram realizados após anestesia geral por via intraperitoneal. Os animais foram anestesiados com 0,008ml/100g de Quetamina – Francotar (Virbac do Brasil indústria e comércio LTDA, São Paulo- SP, Brasil) – e 0,004ml/100g de Virbaxyl (Virbac do Brasil indústria e comércio LTDA, São Paulo- SP, Brasil) cloridrato de xilasina 2%.

A tricotomia da região dorsal foi realizada manualmente, a fim de evitar a penetração de pelos nas lojas cirúrgicas. Em seguida, a desinfecção da área foi feita com álcool iodado (Farmácia Fiton Farma, Porto Alegre, RS, Brasil) (95% álcool a 70% e 5% de iodo). Foram realizadas 4 incisões de 0,5 cm de comprimento no dorso do animal, estando estas dispostas com a distância de 2cm da coluna vertebral do animal e distantes pelo menos 2cm entre si. Desta forma, permitiu-se por meio da divulsão lateral do tecido subcutâneo do animal com tesoura de ponta romba a obtenção de 4 lojas cirúrgicas. O posicionamento das incisões para obtenção das lojas cirúrgicas pode ser observado na Figura 1.

Para a implantação dos cimentos foram utilizados tubos de polietileno, esterilizados, de aproximadamente 10mm de comprimento e 1,5mm de diâmetro (Abott Lab do Brasil. São Paulo, SP, Brasil), nos quais se mantiveram as duas extremidades abertas.

Os cimentos endodônticos, preparados de acordo com as orientações dos fabricantes, foram introduzidos imediatamente após preparos nos tubos com a utilização de seringas de insulina estéreis (Injex Indústria Cirúrgica Ltda. Ourinhos, SP, Brasil), evitando-se que ocorresse o seu extravasamento. Com o auxílio de uma pinça curva os tubos preenchidos com o material foram introduzidos na lojas

cirúrgicas em direção paralela à incisão, com uma das aberturas do tubo voltada para a cabeça do animal e a outra para o rabo.

O dorso do animal foi dividido em quadrantes, dispostos no sentido horário. Os tubos contendo os cimentos AH Plus (Grupo I), Endofill (Grupo II) e Fillapex (Grupo III) e o grupo controle representado pelos tubos vazios (Grupo IV) foram inseridos respectivamente nos quadrantes apontados na Figura 1. Após a implantação dos tubos de polietileno foi realizada a sutura com fio de seda montado 3-0 (Johnson e Johnson produtos profissionais Ltda. São José dos Campos, SP, Brasil).

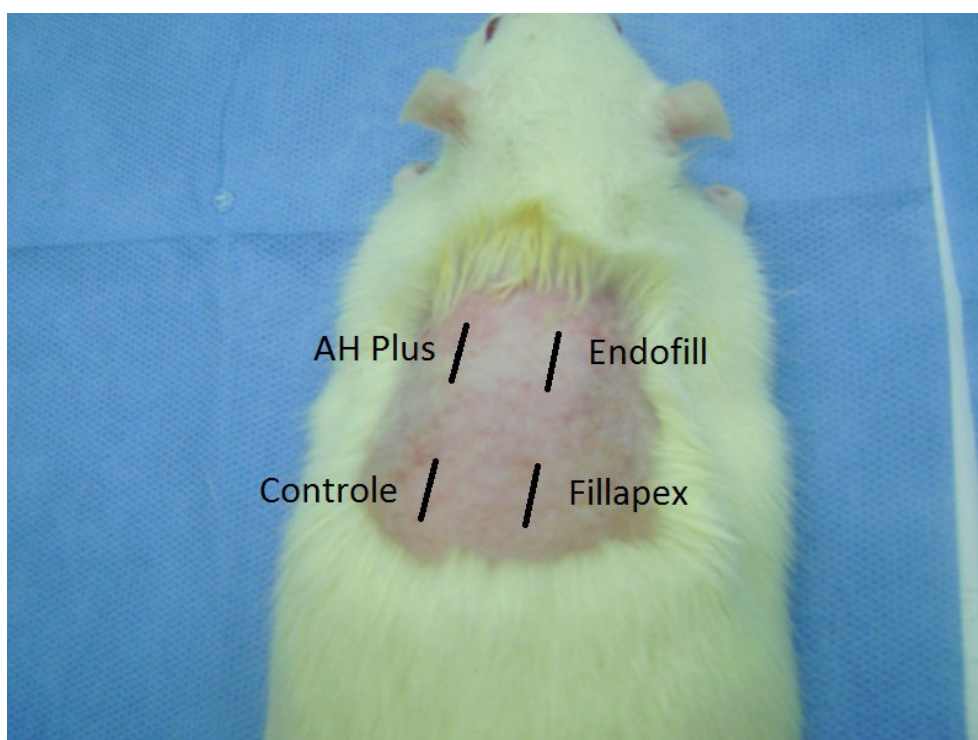


Fig. 1 - Posicionamento das incisões para obtenção das lojas cirúrgicas.

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

5.5.2 Eutanásia dos animais, biópsia e processamento histológico

A eutanásia foi realizada em 07 (sete) e 60 (sessenta) dias pós-operatórios. Decorridos estes períodos experimentais, os animais foram eutanasiados através da inalação de dióxido de carbono (CO₂). Nova tricotomia foi feita, e a biópsia excisional da área do implante realizada com margem de segurança de 1cm. As peças cirúrgicas foram posicionadas em disco de papel “cartolina” com tamanhos compatíveis, de maneira que o tecido conjuntivo do animal ficasse em contato com o papel. Este procedimento permitiu que as peças ficassem distendidas facilitando a fixação do tecido, a qual foi realizada em formalina a 10% tamponada com tampão fosfato pelo período de 24 horas (COSTA , 2001^a). As amostras permaneceram de 2 a 3 horas em formol glicerinado (11 de formalina 10% + 50 ml de glicerina). Após, os tubos de polietileno foram cuidadosamente removidos das peças cirúrgicas, as quais foram incluídas em blocos de parafina, com o auxílio das barras de Leuckhart. Nesse momento, foi realizada a codificação dos blocos por colaborador que não participou da leitura das lâminas, a fim de conferir caráter cego ao estudo. Cortes de 3 a 4 µm de espessura foram obtidos para a confecção das lâminas. Os cortes histológicos obtidos através do longo eixo do tubo foram corados com HE (Hematoxilina e Eosina), permitindo a avaliação da resposta tecidual presente na interface entre o material experimental e o tecido conjuntivo.

5.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

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

O treinamento do examinador foi realizado comparando seus resultados com os de um examinador experiente (padrão ouro) até que seu percentual de concordância atingisse valores próximos de 80% na leitura de 10 lâminas. Após, foi aferida a calibragem intra-examinador pelo cálculo Kappa. A concordância intra-examinador também foi verificada por meio do cálculo de Kappa, comparando a leitura de 10 lâminas realizadas em 2 períodos distintos, com intervalo de uma semana, obtendo-se resultado superior a 6 para todas as variáveis avaliadas.

As lâminas foram analisadas qualitativamente seguindo os critérios apontados por Figueiredo et al (2001) e utilizados por Scarparo et al (2010 e 2011). Observou-se o componente celular inflamatório a partir da presença de células como neutrófilos, linfócitos e plasmócitos, eosinófilos, macrófagos e gigantócitos. Também foram avaliados fenômenos como a condensação fibrosa e a ocorrência de abscesso. Os eventos celulares foram classificados de acordo com os seguintes escores:

- 1- Ausente (quando as células inflamatórias estavam ausentes ou se encontraram no interior de vasos sanguíneos);
- 2- Leve (quando as células estavam presentes de maneira esparsa ou com grupamentos muito reduzidos);
- 3- Moderado (elementos celulares presentes, porém sem dominar o campo microscópico);
- 4- Intenso (elementos celulares presentes sob a forma de infiltrado próxima ao material).

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

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

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

- 1- Ausência de abscesso;
- 2- Presença de abscesso em contato com o local que continha o material;

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

5.6.1 Análise estatística dos resultados

As variáveis relacionadas aos eventos celulares da inflamação (linfócitos e plasmócitos, neutrófilos, eosinófilos, células gigantes e macrófagos), as características da condensação fibrosa e à presença e características de abscesso inflamatório foram comparadas entre os grupos e nos diferentes períodos experimentais. Tais variáveis forneceram dados qualitativos, apresentando-se em escala ordinal.

A comparação dessas variáveis entre os grupos de estudo e entre os Períodos experimentais dentro de um mesmo grupo foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida de *post-hoc* de Bonferroni.

A análise estatística foi realizada utilizando o Software Graphpa Prism, versão 4.0 para o Windows (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

6 RESULTADOS

A leitura das lâminas de dois períodos experimentais, 7 (sete) e 60 (sessenta) dias, foi realizada a fim de se obterem resultados referentes aos eventos celulares da inflamação, aspectos relacionados a condensação fibrosa e formação de abscesso.

Por meio do teste ANOVA de duas vias, complementado pelo teste *post-hoc* de Bonferroni, foi possível observar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos e entre os períodos experimentais (Figura 2).

Em relação às diferenças entre os grupos de estudo, no período de 7 dias houve significância estatística para as variáveis linfócitos e fibras. Para a variável linfócitos, aos 7 dias pós-experimento, observou-se que os grupos dos cimentos AH Plus ($P < 0.5$), Endofill ($p < 0.01$) e Fillapex ($p < 0.01$) apresentaram escores significativamente superiores ao grupo controle (Figura 3A). Já em relação à condensação fibrosa, apenas o Fillapex mostrou escores significativamente inferiores em relação ao controle ($p < 0.01$) (Figura 3A, 3B e 3C). Para as variáveis neutrófilos e macrófagos não foi possível observar diferenças significativas no período de 7 dias, porém observa-se uma tendência ao maior envolvimento destas células nas respostas frente aos cimentos testados em comparação ao grupo controle. Da mesma forma, ainda que diferenças estatísticas não tenham sido detectadas nota-se uma tendência a presença de células gigantes as nos grupos dos cimentos Endofill e Fillapex (Figura 4A), assim como eosinófilos no grupo do cimento Endofill.

Para a variável abscesso também observa-se uma tendência a sua formação no período de 7 dias para os cimentos Endofill e Fillapex (Figura 3B, 3C) que permanece para o cimento Endofill no período de 60 dias.

Também em relação à comparação entre os grupos de estudo, no período de 60 dias, observaram-se diferenças significativas para as variáveis linfócitos e macrófagos, as quais apresentaram escores superiores dos grupos Endofill ($p < 0.01$) e Fillapex ($p < 0.05$) (Figuras 4A e 4B) em relação ao grupo controle. Nesse período experimental, apenas o cimento AH Plus apresentou comportamento semelhante ao do grupo controle no que se refere a essas variáveis (Figuras 4C e 4D).

Observaram-se ainda diferenças significantes entre os períodos experimentais de 7 e 60 dias dentro de um mesmo grupo para as variáveis neutrófilos (cimento Endofill – $p < 0.05$) e fibras (cimentos Endofill e Fillapex – $p < 0.0001$). No grupo do cimento Endofill neutrófilos apareciam de maneira esparsa no primeiro período experimental, não sendo identificados no segundo período de tempo avaliado. Em ambos os grupos (Endofill e Fillapex) houve um aumento na condensação fibrosa envolvendo o material testado, sendo que em algumas amostras formou-se no segundo período experimental uma camada espessa de fibras, principalmente no grupo do cimento Endofill. As demais variáveis não apresentaram modificações significativas ao longo dos períodos experimentais.

Figura 2: Resultados referentes à classificação da intensidade da ocorrência de neutrófilos, linfócitos, macrófagos, células gigantes, eosinófilos, fibras e abscesso para os quatro grupos de estudo. Nota-se diferenças estatisticamente significantes dos grupos teste em relação ao grupo controle (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) e na comparação entre os dois períodos avaliados considerando o mesmo material (+ $p < 0.05$; ++++ $p < 0.0001$).

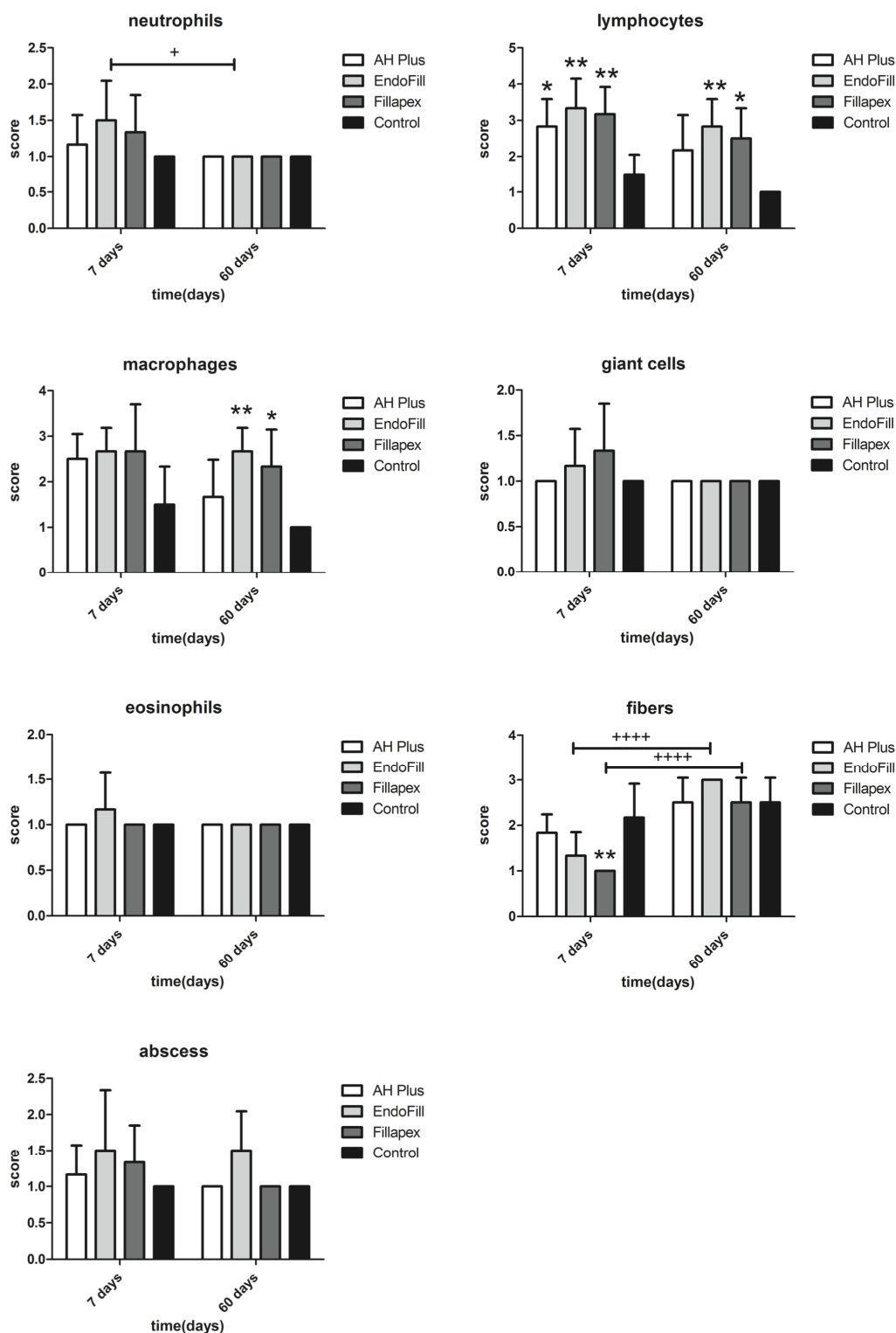


Figura 3. Resposta do tecido conjuntivo nos grupos controle (A) e no grupo do cimento MTA-Fillapex (B-C) 7 dias pós-operatório. Ao contrário dos grupos teste, já nesse período o grupo em que foi implantado o tubo vazio (EP) apresenta formação de tecido conjuntivo vascularizado e com poucas células inflamatórias (*) e condensação fibrosa (F). Já o MTA-Fillapex (FL) produziu reação inflamatória extensa composta principalmente por linfócitos (setas), não delimitada por cápsula fibrosa. Na amostra aqui representada, nota-se também a presença de alguns neutrófilos e a formação de abscesso próximo à saída do tubo (Δ).

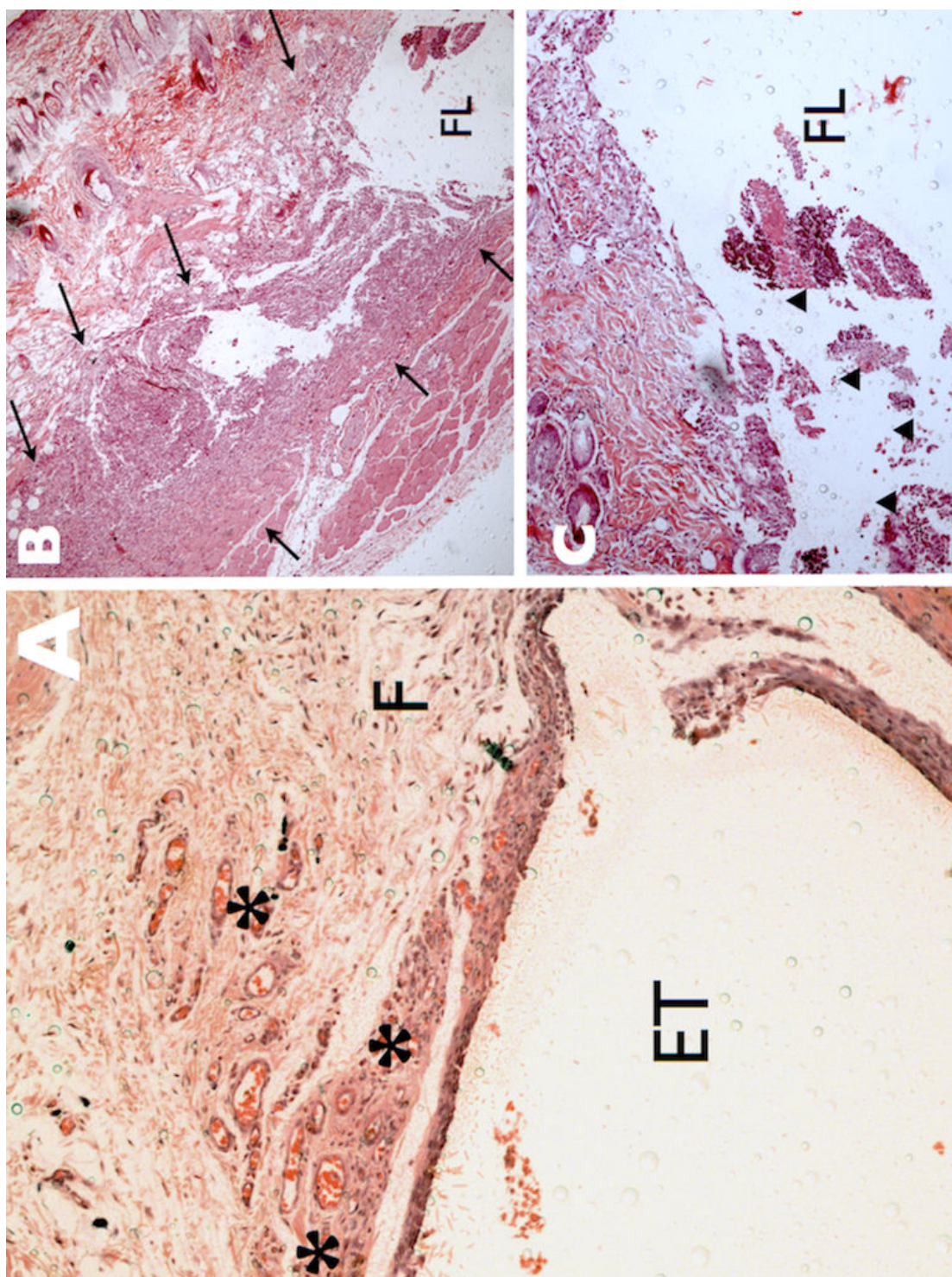
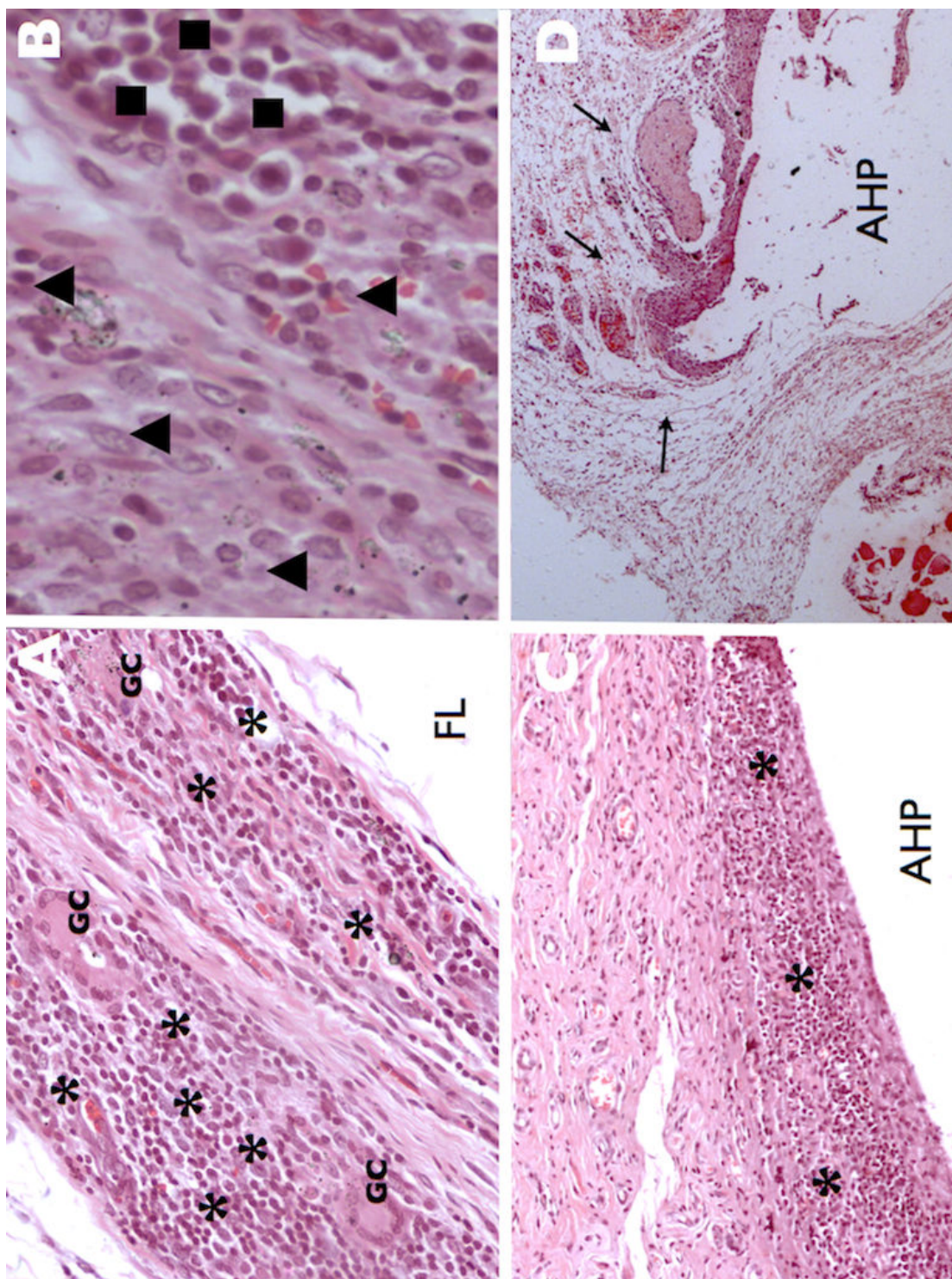


Figura 4. Reação aos cimentos testados. **(A)** Em 60 dias, para o cimento MTA-Fillapex (FL) nota-se infiltrado linfoplasmocitário (*) e células gigantes (GC). **(B)** No mesmo período, o cimento Endofill (B) promoveu manutenção de infiltrado linfoplasmocitário (•) e grande quantidade de macrófagos fagocitando o material (Δ). Já o cimento AH Plus (AHP) apresentou resposta inflamatória moderada (*) em 7 dias **(C)** a qual tornou-se branda e bem delimitada por cápsula fibrosa (setas) após 60 dias **(D)**.



7. DISCUSSÃO

7.1 METODOLOGIA EMPREGADA

7.1.1 Definição do Experimento

É indiscutível que qualquer material que entre em contato com tecidos vivos deve ser testado e avaliado quanto a sua biocompatibilidade antes da sua introdução ao uso clínico de rotina (LAWRENCE; MALIK; AUTIAN, 1974). Dentro desse contexto, testes primários de biocompatibilidade (testes de citotoxicidade *in vitro*, tais como ensaios de cultura de células e tecidos), testes secundários *in vivo* (referentes à resposta tecidual aos materiais) e testes de aplicação *in vivo* devem ser sequencialmente avaliados a fim de permitir a segurança da utilização de materiais odontológicos em humanos (CAMPS; ABOUT, 2003; SCARPARO; FACHIN; GRECCA, 2009).

No presente estudo optou-se pela realização de testes de implantação subcutânea de tubos de polietileno contendo cimentos endodônticos em ratos, o que caracteriza a realização de testes secundários da avaliação da resposta tecidual frente a esses materiais. Os testes secundários buscam complementar evidências iniciais relativas à citotoxicidade providenciadas por testes *in vitro*, uma vez que estes não demonstram a interação do material com todas as células e estruturas que caracterizam os tecidos e com as células que são atraídas em função da presença do material. Nesse sentido, os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol Endofill e à base de resina epóxica AH Plus já foram previamente avaliados em outros estudos (SCARPARO et al., 2009; SCARPARO et al., 2010; ZMENER et al., 2009), podendo ser considerados, além da ausência de materiais no interior dos implantes, como importantes padrões de comparação para a avaliação do cimento à base de agregado trióxido mineral MTA-Fillapex. Nesse sentido, diversos estudos apontam o AH Plus como “padrão ouro” no que se refere à biocompatibilidade de cimentos endodônticos (SCARPARO et al., 2009; GRECCA et al., 2011) enquanto os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol são considerados bastante agressivos às células e tecidos (SCARPARO et al., 2009; BATISTA et al., 2007) Em relação ao MTA Fillapex, os poucos estudos até o momento realizados com intuito de testar sua biocompatibilidade apresentam resultados de testes primários (SCELZA et al., 2012)

ou de testes secundários comparando a reação tecidual do Fillapex com o MTA ou com cimentos à base de hidróxido de cálcio (GOMES-FILHO et al., 2011). A escassez de investigações acerca das características biológicas do material, bem como a falta de concordância dos resultados até o momento apresentados justificam a realização do presente estudo.

Seguindo o modelo biológico padrão para testes secundários, foram utilizados ratos *Wistar* para a implantação dos tubos de polietileno (KAPLAN et al., 2003; ZMENER, 2004; ZMENER; BANEGAS; PAMEIJER, 2005), os quais são amplamente utilizados (KOLOKOURIS et al., 1998; MOLLOY et al., 1992; CINTRA et al., 2010; SCARPAR et al., 2010; BATISTA et al 2007; FARHAD et al., 2011; SILVEIRA et al., 2011; GRECCA et al., 2011) para este propósito e sua aceitabilidade foi comprovada por vários estudos (TORNECK, 1966; ONYCK., 1970).

O modelo animal e o tecido escolhido para implantação dos cimentos permitem a verificação de padrões semelhantes aos encontrados em condições clínicas. Ensaio em ratos são amplamente utilizados em virtude de fornecer informações sobre as propriedades biológicas (desenvolvimento de resposta inflamatória e imune), serem rápidos e econômicos. (FEDERATION DENTAIRE INTERNATIONALE, 1980; WATSON; PATERSON, 1992; MITTAL; CHANDRA E CHANDRA 1995), além desses animais apresentarem semelhança com humanos comprovada através do mapeamento do seu genoma (KOLA, 2004).

Já no que se refere a realização de implantes no tecido subcutâneo, ainda que não seja uma reprodução exata das condições humanas, os testes secundários em tecido conjuntivo permitem a observação do comportamento dos cimentos em contato com tecidos muito semelhantes aos envolvidos na terapia endodôntica, tornando possível a projeção dos efeitos dos materiais nos tecidos da região apical e periapical. Os materiais foram colocados em tubos assim que espatulados a fim de simular uma situação clínica em que o cimento entra em contato com os tecidos periapicais durante o tratamento endodôntico.

Neste estudo foram definidos períodos experimentais de sete, trinta e sessenta dias, de acordo com o descrito por outros autores (COSTA, 2001a; SCARPARO et al., 2010; SCARPARO et al., 2009). A análise histológica foi realizada apenas nos períodos de sete dias (para análise de resposta tecidual

imediate) e sessenta dias (para análise de resposta tecidual prolongada). Por motivo de falhas durante o processamento das lâminas referentes aos trinta dias pós-operatório não foi possível avaliar um período intermediário da reação tecidual aos materiais. Períodos mais curtos, que representariam a reação aguda inicial das primeiras 24-48h não foram estabelecidos em razão de que o próprio ato cirúrgico poderia mascarar a resposta inflamatória induzida pelos cimentos. Por esse motivo, o período de sete dias foi escolhido para análise de reação inicial (ISO 10993-6, 1994). Assim, podemos definir que a permanência de características relacionadas à inflamação aguda por períodos mais prolongados demonstra um caráter mais agressivo do material testado.

O período de sessenta dias revela uma situação inflamatória crônica, observando-se a adaptação da inflamação que permaneceu por um período prolongado. Neste período, quando o material apresenta boas características de biocompatibilidade, pode-se observar tecido cicatricial e condensação fibrosa espessa (SCARAPARO et al., 2010).

7.1.2 Avaliação dos resultados

A análise descritiva dos eventos inflamatórios observados foi utilizada em concordância com estudos como os de Molloy et al (1992), Kolokuris et al (1996) e Görduysus, Etikän e Gökös (1998).

Ainda que subjetivo, esse tipo de análise permite a observância dos diversos fatores envolvidos na inflamação e no processo de reparo, sendo considerados a intensidade e a duração do processo inflamatório. Dessa forma, através de escores de intensidade (ausente, leve, moderado e intenso), podemos classificar a análise descritiva e qualificar o tipo de reação para posteriormente avaliar a aceitabilidade do material.

O presente estudo utilizou o teste ANOVA complementado pelo teste *post-hoc* de Bonferroni para análise comparativa entre os grupos e entre os tempos experimentais de sete e sessenta dias. Ainda que o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seja amplamente utilizado nos dados categóricos, Montgomery (MONTGOMERY, 1976) refere que o teste ANOVA oferece maior consistência aos

resultados em que são utilizados categorias como medidas, especialmente pelo fato de que, quando complementado pelo *post-hoc* de Bonferroni, detecta de maneira mais eficiente as diferenças entre os grupos/periodos. Da mesma forma, outros autores estão de acordo com a utilização de ANOVA para dados não paramétricos. (TROIAN, 2006; GRÜNDLING, 2011; GOMES, 2007)

7.2 DOS RESULTADOS

O presente estudo segue os critérios de avaliação apontados por Figueiredo et al (2001) e utilizados por Scarparo et al (2010 e 2011) que possibilitam uma complementação da análise descritiva observada através de análise objetiva e qualificativa. Nesse sentido, além da magnitude da reação celular inflamatória, eventos importantes como condensação fibrosa e presença de abscesso puderam ser avaliados a fim de caracterizar a intensidade do processo desencadeado pelos materiais.

Em relação ao componente celular inflamatório, foram observadas a presença e a predominância de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e células gigantes. Entre os diferentes cimentos endodônticos testados, os resultados não apresentaram diferenças significantes. Entretanto, para algumas variáveis notou-se diferenças significativas de grupos teste em relação ao grupo controle, e dentro de um mesmo grupo houve diferenças significativas entre os períodos experimentais.

De maneira geral, a avaliação histológica mostrou ausência ou a presença reduzida de neutrófilos, o que é explicado pelo fato de períodos experimentais mais curtos, como 24 ou 48 horas pós-operatório, não terem sido observados. De acordo com (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008) os neutrófilos apresentam-se no tecido quando existe uma resposta aguda ao agente causal, caracterizando-se por serem a primeira linha de defesa. São células móveis e de atividade fagocitária. Concordando com o observado no presente estudo, os mesmos autores afirmam que em períodos mais longos, os quais normalmente caracterizam processos inflamatórios crônicos, neutrófilos apresentam-se em número reduzido. Por outro

lado, quando em forma de piócitos caracterizam o abscesso e merecem atenção no momento da classificação.

Neste estudo, ainda que não tenha ocorrido diferença significativa entre os grupos, houve uma tendência à presença de neutrófilos no grupo do cimento Endofill no primeiro período que reduziu com o passar dos sessenta dias, resultado que concorda com os dados de Scarparo et al (2009). Já o cimento AH Plus apresentou o menor índice de neutrófilos no período de sete dias, corroborando os resultados de estudos prévios que afirmam que esse material provoca reações menos intensas e duradouras (GRECCA et al., 2011; BATISTA et al., 2007; SOUZA et al., 2006). Quando observada a presença de abscessos notou-se uma maior tendência para sua ocorrência nos grupos dos cimentos Endofill e Fillapex.

Em relação aos linfócitos, a magnitude de sua ocorrência revela a intensidade de processos inflamatórios crônicos. Essas células são responsáveis pela defesa imunológica do organismo, uma vez que reconhecem moléculas estranhas e as combatem por meio de resposta humoral (produção de imunoglobulinas) e resposta citotóxica mediada por células. Para esta variável, no primeiro período experimental todos os grupos teste apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle, evidenciando seu potencial em promover resposta inflamatória quando em contato com o tecido. Até mesmo o cimento considerado padrão ouro (AH Plus) apresentou maior intensidade de infiltrado em relação à ausência de material, evidenciando a ausência de um cimento que desencadeie apenas uma resposta inflamatória pouco intensa e restrita a curtos períodos de tempo, o que caracterizaria um material com condições ideais de biocompatibilidade. No período de sessenta dias, houve uma redução no número de linfócitos para todos os grupos. No entanto, o grupo que demonstrou maior diminuição no número de células, assemelhando-se estatisticamente ao grupo controle, foi o cimento AH Plus. Esse resultado é corroborado com os observados em outros estudos, os quais também relatam menor severidade da resposta inflamatória do AH Plus em comparação com outros materiais (GRECCA et al., 2011; BATISTA et al., 2007; SOUZA et al., 2006). Também em relação a esse aspecto, é preciso enfatizar que o cimento Fillapex não demonstra vantagens biológicas em relação a outros materiais, ao contrário do demonstrado para outros cimentos à base de MTA como o Endo-CPM-Sealer (SCARPARO et al., 2010).

Nesse sentido, enquanto o Endo CPM-sealer apresenta basicamente a mesma composição do MTA original, o MTA-Fillapex apresenta modificações significantes em sua fórmula, apresentando-se como um sistema pasta-pasta que contém resinas, sílica e MTA (ASSSMAN et al., 2012). No estudo de Scarparo et al (2010), que apresenta a mesma metodologia do presente estudo, o cimento Endo CPM, também a base de MTA, apresentou resultados muito parecidos com o grupo controle, apresentando potencial biológico superior ao encontrado para o cimento AH Plus. O cimento Endo CPM apresenta reação inflamatória muito semelhante ao MTA e provavelmente esta relação se deve a composição deste cimento, que apresenta a mesma formulação do MTA com adição de carbonato de cálcio para redução do pH de 12,5 para 10,0 após a sua presa (CASTRO, 2003). No entanto, Assman et al (2011) relata que o cimento Endo CPM apresenta dificuldades quanto ao tempo de trabalho e escoamento.

O resultado mais agressivo do MTA-Fillapex pode ser explicado pela presença de resina salicilato, resina diluente e resina natural em sua formulação, que foram introduzidos a fim de melhorar o escoamento e o tempo de trabalho. Tais componentes se comportariam como agentes irritativos, o que já foi demonstrado em estudos *in vitro* (SCELZA et al., 2012) e em ensaios *in vivo* que testaram a aplicação do Fillapex como material retro-obturador (VOGT, 2011). É importante ressaltar que, diferentemente de outros cimento endodônticos à base de MTA, como o Endo-CPM-Sealer, a composição do MTA-Fillapex foi bastante alterada a fim de melhorar suas qualidades físico-químicas, o que provavelmente tem influência sobre seu potencial biológico a despeito da formulação do material incluir componentes do agregado trióxido mineral.

De maneira semelhante, o cimento MTA Fillapex também não apresentou vantagens em relação aos outros materiais quando a variável “macrófagos” foi avaliada. Nesse quesito, o Fillapex mostrou escores com valores estatisticamente superiores aos do grupo controle, de maneira semelhante ao Endofill e ao contrário do cimento AH Plus. Os macrófagos são células maturadas dos monócitos e constituem o sistema fagocitário mononuclear, fagocitando (entre outros) elementos inertes e elementos anormais da matriz extracelular. Possuem características morfológicas muito variáveis que dependem de seu estado de atividade funcional e do tecido que habitam. Dependendo da intensidade do estímulo podem agrupar-se e

fundir-se formando as células gigantes de corpo estranho. Além disso, são células secretoras que participam nas funções de defesa e reparo dos tecidos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). No presente estudo, para os grupos dos cimentos Endofill e Fillapex, a presença de macrófagos manteve-se intensa ao longo dos períodos avaliados. Tal resultado reflete o fato de que a resolução dos processos inflamatórios e de reparo se dá de forma mais lenta para esses materiais, confirmando o potencial irritante desses cimentos sobre as células e tecidos, e estando de acordo com os resultados de outros estudos relacionados a cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (SCARPARO et al., 2009) e ao MTA-Fillapex (VOGT, 2011; SCELZA et al., 2012)

No que diz respeito à presença de células gigantes, ainda que não houvesse diferenças significativas entre os grupos, pode-se observar uma tendência a presença dessas células no cimento Fillapex, o que também evidencia respostas mais severas à presença desse material. De maneira contrária, outros cimentos à base de MTA, como o Endo-CPM-sealer, apresentaram redução significativa de células gigantes (SCARPARO et al., 2010), o que provavelmente, assim como as diferenças observadas nas outras variáveis, tem relação a composição desse cimento.

A avaliação de eosinófilos foi realizada a fim de identificar potencial alérgeno dos materiais testados. Os eosinófilos fagocitam e digerem complexos de antígenos com anticorpos que aparecem em casos de alergia, e desempenham papel nas fases tardias de algumas inflamações (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Neste estudo não houve diferenças significativas em nenhum dos períodos experimentais, o que provavelmente está relacionado com a menor frequência com que se observam essas células. Esses resultados estão em concordância com Scarparo (2009) e Souza et al (2006), os quais também observaram uma tendência a presença dessas células no grupo do cimento Endofill, indicando maior agressividade deste material provavelmente em função do potencial alérgeno do eugenol (SCARPARO, 2009)

Por fim, a avaliação das características da condensação fibrosa provocada pelos materiais foi realizada a fim de verificar a capacidade do organismo conter a extensão do dano inflamatório produzido pelos cimentos. As fibras surgem no tecido

como forma de restringir o processo inflamatório na região agredida. A fibrose pode ocorrer de maneira esparsa ou em forma de cápsula fibrosa. A formação dessa estrutura é um critério de aceitabilidade do material, pois representa uma resposta do tecido imune que reconhece corpos estranhos e torna-os inofensivos ao organismo (PERASSI, 2004). Observou-se para essa variável uma desvantagem no primeiro período experimental para o cimento Fillapex, uma vez que a ausência de formação de cápsula fibrosa permitiu uma maior extensão do dano inflamatório. . A reação inflamatória difusa no tecido demonstra o prolongamento da resolução do processo reparativo. Por outro lado, houve um aumento significativo da formação de fibras nos grupos dos cimentos Endofill e Fillapex ao longo dos sessenta dias, limitando a zona da reação inflamatória às áreas mais próximas dos cimentos.

8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados conclui-se que o MTA-Fillapex não apresentou vantagens biológicas em relação aos cimentos Endofill e AH Plus quando avaliado em tecido subcutâneo de ratos.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, D. et al. An Evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. **Biomaterials**, v. 23, p. 4001-10, 2002.

ASSMAN, E et al. Dentin bond strength of two mineral trioxide aggregate-based and one epoxy resin-based sealers. **JOE**, 2011. Disponível em: [http://www.jendodon.com/article/S0099-2399\(11\)01207-6/abstract](http://www.jendodon.com/article/S0099-2399(11)01207-6/abstract). Acessado em: 06 de janeiro de 2012.

BALTHO, H. A. Attachment and morphological behavior of human periodontal ligament fibroblasts to mineral trioxide aggregate: a scanning electron microscope study. **J Endod**, v. 30, n. 1, p. 25-9, 2004.

BARBOSA, S.V.; ARAKI, K.; SPANGBERG, L.S.W. Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. **Oral surg, Oral Med, Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 75, p. 357-61, 1993.

BATISTA, R.F.C., et al. Microscopic Evaluation of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. **J Biomed Mater Res**, v. 81^a, p. 171 – 177, 2007.

BERGER, C.R. et al. Obturação dos Canais Radiculares. In: BERGER, C.R., **Endodontia Clínica**. Ed. Pancast: 2002. Cap. 17, p.535.

BUCKLEY, J.P. The pulpless tooth, its pathology and conservation; a new method and technic of filling root canals. **J. Amer Dent. Assoc.**, v.16, n.1, p. 44-6,1 Jan. 1929.

CAMILLERI, J.; PITT FORD, T.R. Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. **Int Endod J**, v. 39, p. 747-754, 2006.

CAMPS, J, ABOUT, I. Cytotoxicity of endodontic sealers: a ew method. **J Endod**, v. 29, p.583-586, 2003.

CASTRO et al 2003. Trióxidos minerales agregados – CPM y EndoCPM sealer **[monograph]**. Buenos Aires, Argentina: Centro de Investigaciones Odontológicas; 2003.

CINTRA L.T.A., et al. Evaluation of tissue response to MTA and MBPc. Microscopic analyses of implants in alveolar bone of rats. **J Endod**, v. 32, n. 6, p. 556-9, 2006.

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 Appl Oral Sci**, v. 18, n. 1, Jan./Feb. 2010.

CHONG B.S., FORD T.R., KARIYAWASAM S.P. Tissue response to potencial root-end filling materials in infected root canals. **Int Endod J**. v. 30, n.2, p.102-14, 1997.

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

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

DA SILVA, W.J. et al. Mineral trioxide aggregate as root canal filling material: comparative study of physical properties. **Rev. odonto ciênc.**, v. 25, n. 4, p. 386-390, 2010.

DE ALMEIDA, W.A. et al. Evaluation of apical sealing of three endodontic sealers. **Int. Endod. J.**, v. 33, n. 1, p. 25-27, Jan. 2000.

DEGROOD M.E., et al. A comparison of tissue reactions to Ketac-Fill and Amalgam. **J Endod**, v. 21, n. 2, p. 65-9, 1995.

ECONOMIDES, N. et al. Experimental study of biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. **J Endod**, v. 2, p. 122-127, 1995.

ECONOMIDES, N., et al. Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate (MTA) as root-end filling material. **J Endod**, v. 21, p. 349-353, 1995.

ESTRELA, C. Obturação do canal radicular. In: ESTRELA, C., **Ciência Endodôntica**, v. 2, Edição: 1/2004. Ed. Artes Médicas: 2004. Cap. 13, p. 539.

FARHAD, A.R. et al. Histopathologic evaluation of subcutaneous tissue response to three endodontic sealers in rats. **J Oral Sci**, v. 53, p. 15-21, 2011.

FEDERATION DENTAIRE INTERNATIONALE. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **Int Dent J**, v. 30, p. 140-188, 1980.

FIGUEIREDO, M.A.Z. Introdução à formulação de tatuagem em mucosa bucal de coelhos a partir de injeção submucosa de dois cimentos endodônticos: avaliação clínica e histopatológica. (**Tese de Doutorado**). Porto Alegre: Faculdade de Odontologia da PUC/RS; 1993. 118p.

FIGUEIREDO, J. A. P. et al. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 377-385, July 2001.

FLORES, D.S.H. et al Evaluation of physicochemical properties of four root canal sealers. **Int. Endod J.**, v. 44, p. 126-135, 2011.

FORD T. R., et al. Use of Mineral trioxide Aggregate for repair of furcal perforations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 79, p. 756-63, 1995.

GARRIDO, A.D.B. et al. Laboratory evaluation of the physicochemical properties of a new root canal sealer based on Copaifera multijuga oil-resin. **Int. Endod. J.**, v. 43, p. 283-291, 2010.

GOMES, B.P. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. **Braz Dent J**, v. 15, n.1, p. 30-5, 2004.

GOMES MS et al. Microbial leakage and apical inflammatory response in dog's teeth after root canal filling with different sealers, post space preparation and exposure to the oral environment. **J Appl Oral Sci**, v. 15, p. 429-36, 2007.

GOMES-FILHO, J.E. et al. Rat tissue reaction to MTA Fillapex. **Dental traumatol.** 2011. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/?dopt=abstract-rattissuereactiontoMTAFILLAPEX\(®\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/?dopt=abstract-rattissuereactiontoMTAFILLAPEX(®)). [Dent taru – Windows Explorer. Acesso em: 05-01-12.

GÖRDUYSUS, M.O.; ETIKÄN, I.; GÖKÖS, A. Histopathological evaluation of the tissue reactions to Endo-Fill root canal sealant and filling material in rats. **J. Endod.**, Chicago, v. 24, n. 3, p. 194-196, Mar. 1998.

GRECCA, F.S., et al. Biocompatibility of RealSeal, its primer and AH Plus implanted in subcutaneous connective tissue of rats. **J Appl Oral Sci.**, v. 19, n. 1, p.52-56, 2011.

GROSSMAN, L.I. An improved root canal cement. **J Amer Dent Assoc**, Chicago, v. 56, n. 3, p. 381-385, Mar. 1958.

GROSSMAN, L.I. Obturação do Canal Radicular. In: Grossman L.I. **Endodontia Prática**. 8a ed. Ed. Guanabara Koogan, 1976. Cap. 16, p.299-302.

GRÜNDLING et al. Effect of ultrasonics on Enterococcus faecalis biofilm in a bovine tooth model. **J Endod**, v. 37, p. 1128-33, 2011.

HAIKEL, Y. et al. A new method for the quantitative analysis of endodontic microleakage. **J. Endod**, v. 25, n. 3, p. 172-177, Mar. 1999.

HOLLAND R.; SOUZA V.; NERY M.J.; BERNABÉ P.F.E.; OTOBONI FILHO J.A.; DEZAN JÚNIOR E.; MURATA S.S. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. **J Endod**, v. 28, p. 173-6, 2002.

HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. **Braz Dent J**, v. 12, p. 3-8, 2001.

HUANG, T.; et al. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. **Biomat.**, v. 23, p. 77-83, 2002.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION. Biological testing of dental materials and devices. **ISO 10993-6 draft document**. 1994.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Células do Sangue. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Ed. Guanabara koogan: 2008. Cap. 12, p. 221.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 20, p. 340-349, Sep. 1968.

KAPLAN, A.E. et al. Rheological proprieties and biocompatibility of endodontic sealers. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 527-532, Aug. 2003.

KAPSIMALIS, P.; EVANS, R. Sealing properties of endodontic filling materials using radioactive polar and non polar isotopes. **Oral Surg.**, v. 22, n. 3, p. 386-393, 1966.

KOLA, I. Putting the rat on the map. **Nat. Biotechnol.**, v. 22, n. 5, p. 529-531, May 2004.

KOLOKOURIS, I. et al. In vivo comparasion of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. **J. Endod.**, Chicago, v. 24, n. 2, p. 82-85, Feb. 1998.

LAWRENCE WH, MALIK M, AUTIAN J. Development of a toxicity program for dental materials and products. **J Biomed Mat Res**, v.8, p. 11-34, 1974.

LEAL J. M. Obturação dos canais radiculares: considerações gerais. In: LEONARDO M.R., LEAL J.M., **Endodontia: Tratamento de Canais Radiculares**. 3ªed. São Paulo: Panamericana: 1988. Cap. 25, p. 535-607.

LEE, S.J.; MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforation. **J Endod**, v.19, p. 541-4, 1993.

LEONARDO MR, et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers 26 and pastes used in endodontics. **J Endod**, v. 26, n.7, p.391-4, 2000.

MAIA, C.C.R.; et al. Atividade Antimicrobiana de um Cimento Endodôntico à Base de Poliuretana Frente a Enterococcus Faecalis. **Revista de Investigação Biomédica do Uniceuma**, n.2, p.19-26, 2010

MAIA FILHO, E.M.M.C.; BASTOS A.C.S.C.; NOVAIS T.M.G.. Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicações endodôntica e própolis sobre Enterococcus faecalis. **RGO**. v. 56, n.1, p. 21-5, 2008.

MARIN-BAUZA, G.A. et al. Physicochemical properties of methacrylate resin-based root canal sealers. **JOE**, v. 36, n. 9, p. 1531-36, 2010.

MARTÍNEZ-LALIS, R. et al. Rat subcutaneous tissue response to modified portland cement, a new mineral trioxide aggregate. **Braz Dent J.**, v. 20, n. 2, p. 112-117, 2009.

MITTAL, M.; CHANDRA, S.; CHANDRA, S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. **J. Endod.**, v. 21, n. 12, p. 622-624, Dec. 1995.

MOLLOY, E. et al. Comparative tissue tolerance of a new endodontic sealer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, St. Louis, v.73, n.4, p.490, apr 1992.

MONTGOMERY, D.C. Design and Analysis of Experiments. **New York: John & Wiley Sons**, 1976. P. 118.

MORGENTAL, R.D. et al. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. **I Endod J.**, v. 44, n. 12, p. 1128-33, 2011.

OLSSON, B.; SLIWKOWSKI, A.; LANGELAN, K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. **J. Endod.**, v. 7, n. 8, p. 355-367, Aug. 1981.

ONYCK, J. Methods and criteria in evaluation of periapical tissue response. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 533-538, Mar. 1970.

OROSCO 2008. Sealing ability of gran MTA Angelus™, CPM™ and MBPc used as apical plugs. **J Appl Oral Sci**, v.16, n.1, p.50-4, Jan-Feb 2008.

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

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

PRINZ, H. Filling root-canals with an improved parafinn compound. **D. Cosmos**, v. 54, n. 2, p. 1081-94 Oct 1912.

SAGSEN, B. et al. Push-out Bond strength of two new calcium silicate-based endodontic sealers to root canal dentine. **Int Endod J.**, v. 44, n. 12, p. 1088-91, 2011.

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

SAMPAIO J.M.P. Contribuição ao estudo do processo reparador do tecido conjuntivo de ratos, quando da introdução de tubos de polietileno contendo dois materiais empregados na obturação de condutos radiculares nas suas fórmulas originais e acrescidos de delta-hidro cortisona. (**Tese de Doutorado**). São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP, 1972. 57p.

SCARPARO, R.K.; FACHIN, E.V.F.; GRECCA, F.S. Methodologies for preliminary assessment of biocompatibility of endodontic materials in connective tissue: a review. **Rev. Fac. Odontol.** Porto Alegre, v. 50, n. 3, p. 32-35, set./dez., 2009.

SCARPARO, R.K.; GRECCA, F.S.; FACHIN, E.V.F. Analysis of Tissue Reactions to Methacrylate Resin-Based, Epoxy Resin-Based, and Zinc Oxide-Eugenol Endodontic Sealers. **JOE** v.35, n.2, feb 2009.

SCARPARO, R.K. et al. Mineral trioxide aggregate–based sealer: analysis of tissue reactions to a new endodontic material. **J Endod.**, Chicago, v.36, no. 7, p. 1174-1178, July 2010.

SCARPARO, R.K. et al. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. **J Endod.**, v. 37, n. 8, p. 1069-73, Aug. 2011

SCELZA, M.Z. et al. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. **Int Endod J.**, v. 45, n. 1, p. 12-18, Jan. 2012.

SCHWARZE, T.; LEYHAUZEN, G.; GEURSTEN, W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. **J. Endod.**, v. 28, n. 11, p. 749-753, Nov. 2002.

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

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, 2011.

SHAH, P.M.M. et al. Radiopacity of potential root end filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod**, v. 8, p. 476-9, 1996.

SOUZA, C.J.A. et al. Comparision of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoRez and Epyphany root canal sealers. **J. Endod.**, Baltimore, v.32, n. 7, p. 656-662. Jul 2006.

TANOMARU-FILHO, M., et al. Evaluation of pH calcium ion release of root-end filing materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. **JOE**, v. 35, n. 10, p. 1418-1421, 2009.

TORABINEJAD, M. et al. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **J Endod**, v. 21, p. 349-53, 1995.

TORABINEJAD, M. et al. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. **J Endod**, v. 21, p. 603-8, 1995.

TORABINEJAD, M. Tibia and mandible reactions to implanted root-end fillings materials (abstract 56). **J Endod**, v. 23, n. 263, 1997.

TORABINEJAD, M. et al. Antibacterial effects of some root-end filling materials. **J Endod**, v. 21, p. 403-6, 1995.

TORABINEJAD, M. et al. Cytotoxicity of four root end filling materiais. **J Endod**, v. 21, p. 489-92, 1995.

TORNECK, C.D. Reaction of a rat connective tissue to polyethylene tube implants. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 21, n. 3, p. 379-387, Mar. 1966.

TROIAN, et al. Deformation and fracture of RaCe and K3 endodontic instruments according to the number of uses. **Int Endod J.**, v. 39, p. 616-25, 2006.

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

VOGT, B. Efeito do Agregado Trióxido Mineral intracanal em um modelo de reimplante tardio em dentes de ratos : análise histológica e imunohistoquímica. 2011. 91f. Tese (Doutorado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WATSON, A.; PATERSON, R.C. Initial biological testing of root canal sealing materials. A critical review. **J Dent**, v. 20, p.259-265, 1992.

WENGER, J.S. et al. The effects of partially filled polyethylene tube intraosseous implants in rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 46, n. 1, p. 88-100, Jul. 1978.

ZMENER, O.; GUGLIELMOTTI, M.B.; CABRINI, R.L. Biocompatibility of two calcium hydroxide-based endodontic sealers: a quantitative study in the subcutaneous connective tissue of the rat. **J Endod**, v. 14, p. 229-235, 1988.

ZMENER, O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. **J. Endod.**, Chicago, v. 30, n. 5, p. 348-351, May 2004.

ZMENER, O.; BANEGAS, G.; PAMEIJER, C.H. Bone tissue response to a methacrilate-based endodontic sealer: a histological and histometric study. **J. Endod.**, Chicago, v. 31, no. 6, p. 457-459, July 2005.

ZMENER, O. et al. Efficacy of the NaviTip FX irrigation needle in removing post instrumentation canal smear layer and debris in curved root canals. **Journal of Endodontics**, v. 35, p. 1270–3, 2009.