

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

**AMANDA BERTON
MARCELA VICENTINI SIMONETTI**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA REAÇÃO DO
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS À
IMPLANTAÇÃO DO CIMENTO PORTLAND
ASSOCIADO AO AH PLUS EM DIFERENTES
PROPORÇÕES**

**Bauru
2012**

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

**AMANDA BERTON
MARCELA VICENTINI SIMONETTI**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA REAÇÃO DO
TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS À
IMPLANTAÇÃO DO CIMENTO PORTLAND
ASSOCIADO AO AH PLUS EM DIFERENTES
PROPORÇÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências
da Saúde da Universidade Sagrado
Coração como parte dos requisitos
para obtenção do título de Cirurgiã-
Dentista sob orientação do Prof. Dr.
Rodrigo Ricci Vivan.

**Bauru
2012**

Berton, Amanda

B547a

Atividade antimicrobiana e da reação do tecido subcutâneo de ratos à implantação do cimento Portland associado ao AH Plus em diferentes proporções / Amanda Berton, Marcela Vicentini Simonetti -- 2012.

49f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Cimento Portland. 2. AH Plus. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Biocompatibilidade. 5. Materiais retrobturadores. I. Simonetti, Marcela Vicentini. II. Vivan, Rodrigo Ricci. III. Título.

**AMANDA BERTON
MARCELA VICENTINI SIMONETTI**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DA REAÇÃO DO TECIDO
SUBCUTÂNEO DE RATOS Á IMPLANTAÇÃO DO CIMENTO
PORTLAND ASSOCIADO AO AH PLUS EM DIFERENTES
PROPORÇÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Sagrado Coração como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgiã-Dentista sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan
Universidade Sagrado Coração - USC

Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth
Universidade Sagrado Coração - USC

Prof. Dr. Sylvio de Campos Fraga
Universidade Sagrado Coração - USC

Bauru, 13 de Novembro de 2012.

DEDICATÓRIA

Amanda Berton

Dedico este trabalho especialmente ao meu pai **Renato**, por todo carinho, amor e confiança durante todos estes anos e por toda a minha vida.

À minha mãe **Alexandra**, por todo amor recebido durante toda a minha vida.

A minha irmã **Renata**, que sempre esteve ao meu lado e me apoiou em todas as minhas decisões.

A toda minha família, em especial ao meu avô **Cynaldo**, que sempre esteve preocupado com o meu desempenho durante todos estes anos cursados nesta faculdade.

Marcela Vicentini Simonetti

Dedico este trabalho ao meu pai **Luiz Antônio**, por todo apoio, confiança e amor depositados sobre mim nesses anos de faculdade e por toda minha vida.

À minha mãe **Elaine**, que está sempre ao meu lado, me ajudando, dando forças pra lutar e por todo amor recebido.

Às minhas irmãs **Amanda** e **Giovanna** que são minhas melhores amigas, estão sempre ao meu lado e acreditaram no meu potencial.

Ao meu namorado **Rodrigo**, que soube compartilhar momentos alegres e difíceis, me ajudando e acreditando na minha capacidade.

A toda minha família, **tios**, **avós** e **primos**, que sempre depositaram em mim toda confiança, amor, dedicação e que estiveram sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Amanda Berton

Agradeço primeiramente a **Deus**, pela minha vida e pela força recebida principalmente nos momentos difíceis que enfrentei, e pela família maravilhosa que eu tenho.

Agradeço de coração ao meu querido professor **Rodrigo Ricci Vivan**, pela confiança depositada sobre mim e pelo reconhecimento do meu esforço durante todos estes anos de faculdade.

Agradeço também ao professor **Paulo Henrique Weckwerth**, que nos ajudou com muito carinho para que este trabalho fosse realizado.

E a todos os meus **amigos**, que sempre estiveram comigo e me apoiaram em toda a minha trajetória.

À FAP/USC pelo apoio a pesquisa.

Marcela Vicentini Simonetti

Primeiramente, agradeço **especialmente a Deus**, pela família abençoada que eu tenho, por toda minha vida e por me dar forças pra alcançar meus objetivos, não permitindo nunca que eu desista.

Agradeço ao meu professor orientador **Rodrigo Ricci Vivan**, que me ajudou durante a faculdade e principalmente para que esse trabalho fosse realizado.

Agradeço também aos professores **Leandro de Andrade Holgado** e **Mariza Akemi Matsumoto**, que fizeram parte deste trabalho para que ele fosse concluído.

A todos meus **amigos** e os que fizeram parte da realização deste sonho.

À FAP/USC pelo apoio a pesquisa.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e a resposta do tecido subcutâneo de ratos à implantação do cimento Portland associado ao AH Plus em diferentes proporções (50% de cimento AH Plus + 50% de cimento Portland; 60% de cimento AH Plus + 40 % de cimento Portland; 70% de cimento AH Plus + 30% de cimento Portland; 80% de cimento AH Plus + 20% de cimento Portland; 90% de cimento AH Plus + 10% de cimento Portland; 100% cimento Portland; 100% AH Plus). Para a avaliação da ação biológica, foram utilizados 42 ratos (*Rattus Norvegicus*), que foram divididos em 14 animais para cada período experimental. Cada animal recebeu quatro implantes de tubos de polietileno, preenchidos com os materiais recém-espaturados. Após 7, 14 e 30 dias, os animais foram eutanaziados e os espécimes foram preparados para análise microscópica. A análise microscópica foi realizada considerando-se o tecido presente na embocadura do tubo de polietileno, em contato com o material a ser testado. Para se avaliar a sensibilidade bacteriana aos cimentos estudados, foi utilizada a técnica de difusão radial da substância sobre a superfície de placas de Mueller-Hintonagar. As bactérias testadas foram de linhagens de campo e 1 ATCC 29212. As estirpes foram retiradas da bacterioteca e ativadas sobre a superfície de placas de Brucellaagar suplementado com 5% de sangue de carneiro, incubadas a 36°C por 24 horas. A partir dessas placas, 5 colônias foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI que foi incubado a 36°C “overnight”. A partir do crescimento, foi preparado em salina estéril o ajuste para a densidade ótica do padrão de turbidez da escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias /mL). Placas de Petri de 100 x 10 mm previamente preparadas com Mueller-Hintonagar (Merck®) na espessura de 6 mm foram escavadas em poços com 5 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade. Uma vez ajustada a densidade do inóculo, a sementeira foi feita através de zaragatoa de algodão estéril na superfície das placas, tomando-se o cuidado de não semear o interior das escavações. As placas foram colocadas em estufa por 30 minutos para secagem da superfície do meio de cultura antes da colocação dos cimentos. Os seguintes cimentos foram utilizados no teste: 50% de cimento AH Plus + 50% de cimento Portland; 60% de cimento AH Plus + 40 % de cimento Portland; 70% de cimento AH Plus + 30% de cimento Portland; 80% de cimento AH Plus + 20% de cimento Portland; 90% de cimento AH Plus + 10% de cimento Portland; 100% cimento Portland; 100% AH Plus. Os materiais foram proporcionados em massa. Após a espaturação os poços foram preenchidos com os cimentos através de seringas tipo Luer-Look e as placas foram deixadas 2 horas em temperatura ambiente para pré-incubação. Após, foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C, sob condições atmosféricas adequadas por 24 horas. Os halos de inibição foram mensurados com auxílio de um paquímetro digital, sob intensa luminosidade. Com os dados em mãos, os mesmos foram submetidos a análise estatística, empregando-se o teste Kruskal-Wallis para comparação global e o teste de Miller para as comparações individuais com nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que na proporção 50/50, aos 7 dias observou-se material granular birrefringente em meio a tecido de granulação infiltrado por leucócitos mononucleares, com discreta deposição de matriz colágena. Aos 14 dias, discretas fibras colágenas estavam organizadamente depositadas, permeadas por discreto a moderado infiltrado inflamatório mononuclear. Aos 30 dias, observou-se persistência do infiltrado inflamatório mononuclear, com padrão microscópico semelhante ao período de 14 dias. Na proporção 40/60, no período de 7 dias visualizou-se material granular birrefringente circular, em meio a tecido de granulação ricamente celularizado e infiltrado por moderado infiltrado inflamatório mononuclear. Após 14 dias já se notou deposição organizada das fibras colágenas em meio a discreto infiltrado mononuclear. No período de 30 dias, já se observou a presença de tecido conjuntivo fibroso permeado por eventuais leucócitos mononucleares. A proporção 70/30, Aos 7 dias notou-se

tecido de granulação ricamente celularizado permeado por moderado infiltrado mononuclear. Após 14 dias, o tecido apresentou-se em organização, com deposição organizada das fibras colágenas. Aos 30 dias, notou-se presença de tecido conjuntivo fibroso e eventuais células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho. Na proporção 80/20, após 7 dias observou-se a presença de tecido de granulação ricamente vascularizado. Aos 14 dias a deposição organizada de fibras colágenas foi visualizada, em meio a discreto infiltrado mononuclear e discretas células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho. Em 30 dias, células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho foram visualizadas em meio a tecido conjuntivo fibroso em organização. Na proporção 90/10, no período de 7 dias, focos de degeneração tecidual foram observados em meio aos grânulos do material e tecido de granulação moderadamente infiltrado por leucócitos mononucleares. Aos 14 dias, houve deposição organizada de fibras colágenas em meio a moderado infiltrado inflamatório mononuclear, com persistência de eventuais áreas de degeneração tecidual próximo ao material. Após 30 dias, organização do tecido conjuntivo fibroso foi observada, permeado por discreto infiltrado mononuclear. Os resultados da atividade antimicrobiana mostraram que as proporções de 80/20, 90/10 e 100% AH Plus apresentaram atividade antimicrobiana, tanto em 24, quanto em 48 horas, com diferença estatisticamente significativa com relação aos outros grupos. Conclui-se que a associação do AH Plus ao cimento Portland apresenta boa resposta tecidual e atividade antimicrobiana, em algumas proporções.

Palavras-chave: Cimento Portland. AH Plus. Atividade antimicrobiana. Biocompatibilidade. Materiais retrobturadores. Cirurgia parendodôntica.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate antimicrobial activity and the response of the subcutaneous tissue of rats to the deployment of associated Portland cement to AH Plus in different proportions (50 AH Plus cement Portland cement 50; 60 AH Plus cement cement Portland 40; 70 AH Plus cement cement Portland 30; 80 AH Plus cement cement Portland 20; 90 AH Plus cement cement Portland 10; 100 Portland cement; 100 AH Plus). 42 rats were used (*RattusNorvegicus*), divided into 14 animals for each experimental period. Each animal received four polyethylene tubes, implants filled with manipulated materials on one side, and with gutta-percha on the other side. After 7, 15 and 30 days, the animals were killed and the specimens were prepared for microscopic analysis. Microscopic analysis of all specimens was conducted considering the tissue present at the mouth of the polyethylene tube in contact with the material to be tested. To evaluate the bacterial sensitivity to cements, was used the technique of radial diffusion of the substance on the surface of plates of Mueller-Hintonagar. The bacteria tested were of field strains and 1 ATCC (TypeCultureCollection), was a strain of *Enterococcusfaecalis* ATCC 29212. The isolates were taken from bacterioteca and activated on the surface of plates of Brucellaagar supplemented with 5 sheep blood incubated at 36oC by 12:0 am. From these plates, 5 colonies were transferred to a tube containing 5 mL of BHI broth which was incubated at 36oC "overnight". From growth, was prepared in sterile saline adjustment for standard optical density turbidity of 0.5 McFarland range (1.5 x 10⁸ colony forming units mL). Petri dishes of 100 x 10 mm previously prepared with Mueller-Hintonagar (Merck ®) in the thickness of 6 mm were excavated in wells with 5 mm diameter by 3 mm deep. Once adjusted the inoculum density, sowing was made through a sterile cotton swab on the surface of the plates, taking care not to sow the interior of excavations. The plates were placed in an oven for 30 minutes to dry the surface of the culture medium prior to placement of the cements. The following are cements used in the test: 50% AH Plus and 50% of Portland cement; 60% AH Plus cement and 40% of Portland cement; 70% AH Plus and 30% of Portland cement; 80% AH Plus and 20% of Portland cement; 90% AH Plus and 10% of Portland cement; 100% of Portland cement; 100% AH Plus. The materials were provided. After mixing the wells were filled with the Luer syringe through cements-Look and the plates were left 2 hours at room temperature for incubation. After, were incubated in bacteriological oven at 36oC, under appropriate weather conditions by 12:0 am. The halos of inhibition were measured with the aid of a digital pachymeter, under intense luminosity. With data in hand, they were subjected to statistical analysis, using the Kruskal-Wallis test for global comparison and the Miller test for individual comparisons with a significance level of 5. The results showed that in proportion to 5050, to 7 days birrefringente granular material was found in the midst of granulation tissue infiltrated by mononuclear leukocytes, with discrete matrix collagen deposition. To 14 days, discrete Collagen fibers were neatly filed, permeated by discreet mononuclear inflammatory infiltrate to moderate. To 30 days, noted the persistence of mononuclear inflammatory infiltrate, with microscopic pattern similar to the period of 14 days. In proportion to 4060, within 7 days visualized yourself granular material circular birrefringente, amidst the richly celularizado granulation tissue and infiltrated by mononuclear inflammatory infiltrate tempered. After 14 days have already noticed organised deposition of collagen fibers in the midst of discreet mononuclear infiltrate. In the period of 30 days, has already noted thethe presence of fibrous connective tissue permeated by any mononuclear leukocytes. The proportion 7030, To 7 days notice-if granulation tissue richly celularizado permeated by mononuclear infiltrate tempered. After 14 days, the material presented in the Organization, with organised deposition of collagen fibers.

To 30 days, it was noted the presence of fibrous connective tissue and eventual foreign body type multinucleated giant cells. In proportion to 80/20, after 7 days it was observed the presence of granulation tissue richly vascularized. To 14 days organised deposition of collagen fibers was displayed amid low-key mononuclear infiltrate and discreet foreign body type multinucleated giant cells. In 30 days, foreign body type multinucleated giant cells were visualized in the midst of fibrous connective tissue in the organization. In proportion to 90/10, 7 days period, outbreaks of tissue degeneration were observed between the material and beadsgranulation tissue moderately infiltrated by mononuclear leukocytes. To 14 days there Collagen fibers organized deposition amid moderate mononuclear inflammatory infiltrate, with persistence of any tissue degeneration areas next to the material. After 30 days, the Organization of fibrous connective tissue was observed, permeated by discreet mononuclear infiltrate. The results of antimicrobial activity showed that the proportions of 80/20, 90/10 and 100 AH Plus showed antimicrobial activity, both 24, and 48 hours, with no statistically significant difference in relation to other groups. It is concluded that the Association of AH Plus to Portland cement enhances its antimicrobial and biocompatibility action.

Keywords: Portland cement. AH Plus. Antimicrobial activity. Biocompatibility. Root-end filling materials. Apicalsurgery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fluxograma de identificação das proporções associadas.....	19
Figura 2: Halos de inibição que foram formados ao redor do material.....	20
Figura 3: Tricotomia na região dorsal dos ratos.....	21
Figura 4: Incisão com lâmina de bisturi número 15, na região dorsal.....	21
Figura 5: Divulsão com tesoura de ponta romba.....	22
Figura 6: Implantação dos tubos de polietileno com material recém-espaturado.....	22
Figura 7: Implantação de 4 tubos de polietileno na região dorsal, dois do lado direito e dois do lado esquerdo.....	23
Figura 8: Sutura com fio de Nylon 4.0.....	23
Figura 9: Resultados histológicos da proporção 50/50.....	27
Figura 10: Resultados histológicos da proporção 60/40.....	28
Figura 11: Resultados histológicos da proporção 70/30.....	29
Figura 12: Resultados histológicos da proporção 80/20.....	30
Figura 13: Resultados histológicos da proporção 90/10.....	31
Figura 14: Resultados histológicos da proporção 100% AH Plus.....	32
Figura 15: Gráfico da atividade antimicrobiana no período de 24 horas.....	35
Figura 16: Gráfico da atividade antimicrobiana no período de 48 horas.....	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Gerais.....	17
2.2. Específicos.....	17
3. METODOLOGIA.....	18
3.1. Material.....	18
3.2. Métodos.....	19
4. RESULTADOS.....	25
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÃO.....	43
7. REFERÊNCIAS.....	44

1 INTRODUÇÃO

A endodontia vem sofrendo um processo de evolução muito grande nos últimos anos. Assim, procedimentos que eram realizados de forma empírica, hoje estão alicerçados em bases científicas, procurando apoiar-se nas respostas biológicas e no conhecimento de como os materiais utilizados nos tratamentos interagem com os tecidos apicais e periapicais (LEONARDO, 2005).

Apesar dessa grande evolução técnico-científica, infelizmente o tratamento endodôntico convencional ainda não possibilita a obtenção do sucesso total. Algumas situações clínicas, como a presença de um instrumento fraturado, perfurações radiculares, calcificações e variações anatômicas severas podem dificultar ou, até mesmo, impossibilitar o sucesso do tratamento endodôntico convencional. (BRAMANTE e BERBERT, 2003). Da mesma forma, a possibilidade da existência de biofilmes periapicais ou de alguns outros fatores irritantes pode dificultar o sucesso do tratamento via canal (LEONARDO et al., 2007). Frente a essa situação, o profissional recorre ao procedimento cirúrgico como último recurso terapêutico.

Até a década de 70 a cirurgia parentodôntica apresentava índices de sucesso que variavam de 50% a 70%. (RUD; ANDREASEN; JENSEN, 1972). Esses valores estariam relacionados aos procedimentos operacionais e aos materiais utilizados no selamento das cavidades retrógradas. Com base naquele estudo, a comunidade científica começou a realizar pesquisas para a avaliação dos procedimentos e, principalmente, dos materiais utilizados, uma vez que os mesmos permanecem em contato íntimo e permanente com os tecidos apicais e periapicais.

Assim, os materiais retrobturadores devem apresentar propriedades ideais, tanto físico-químicas quanto biológicas, para que se obtenha o melhor resultado quando de suas aplicações. Tais propriedades englobam um bom selamento marginal, estabilidade dimensional, insolubilidade frente aos fluídos tissulares, boa radiopacidade, fácil manipulação e inserção, tempo de presa curto, atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, e, se possível, estimular o processo de reparo tecidual.

Espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Enterococcus* pode ser encontrado em diversos envoltimentos, tais como o trato gastrointestinal de humanos e outras espécies,

plantas e solo. Estes microorganismos também são capazes de colonizar o trato genitourinário e cavidade oral (KONEMAN et al., 2001).

O *Enterococcus* é um anaeróbio facultativo, fermentativo, Gram-positivo, apresentando forma ovalada e com diâmetro de 0,5 a 1,0 micrometro, podendo apresentar-se isolado ou em pequenas cadeias (KONEMAN et al., 2001)

Das espécies de *Enterococcus*, o *Enterococcusfaecalis* é o mais comumente detectado, estando presentes em infecções orais como periodontite marginal, infecções endodônticas e abscesso periradicular e fracassos endodônticos (ROÇAS et al., 2004).

Peciulienet al. (2001) analisaram a presença de fungos e bactérias entéricas em dentes obturados e com lesão periapical, isolaram o *Enterococcusfaecalis* em 21 dentes de 33 dentes, sendo onze em cultura pura, ou seja, como o único microorganismo presente. O crescimento foi detectado após a segunda cultura em 10 dentes.

Em 2003, Pinheiro et al. analisaram, também, o tipo de microorganismo presente em dentes obturados com fracasso endodôntico, verificaram que 57,4% eram espécies de anaeróbios facultativos, sendo que 83,3% eram Gram-positivo. Observaram também que o *Enterococcusfaecalis* foi a espécie bacteriana mais comumente encontrada.

Analisando a associação de *Enterococcusfaecalis* com diferentes formas de doença periradicular, Rôçaset al. (2004) observaram a presença desta espécie em 7 de 21 dentes com lesão periradicular crônica assintomática, em 1 caso de 10 dentes com periodontite apical aguda e em 1 de 19 amostras de pus aspirado de abscesso periradicular agudo. Verificaram que o *Enterococcusfaecalis* está significativamente associado mais com casos assintomáticos do que com casos sintomáticos. Quanto aos fracassos endodônticos o *Enterococcusfaecalis* estava presente em 20 de 30 dentes. No confronto entre dentes com infecção primária e em casos com infecção persistente, verificaram maior relação com casos de fracassos endodônticos.

Molanderet al. (1998) também isolaram *Enterococcusfaecalis* em casos de retratamento com peridontite apical, averiguando intenso crescimento destes microrganismos nesta situação clínica. Sirenet al. (1997) mostraram que estas bactérias entéricas foram cultivadas quando os canais estavam sem selamento, concluindo haver grande risco de contaminação por parte destes microrganismos quando se deixa um dente com a cavidade pulpar exposta ao meio bucal. Diante dos fatos mencionados acima verifica-se que o *Enterococcusfaecalis*, está relacionado à fracassos endodônticos, resistindo muitas vezes a um tratamento endodôntico prévio.

Torabinejadet al. (1995) compararam os efeitos antibacterianos do amálgama, óxido de zinco

eugenol, Super EBA e um agregado trióxido mineral frente a nove bactérias facultativas *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, lactobacilos, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* B e sete bactérias anaeróbias estritas, *Prevotella buccae* (*Bacteroides*), *Bacteroides fragilis*, *Prevotella* (*Bacteroides*) *intermedia*, *Prevotella* (*Bacteroides*) *melaninogenica*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus* e anaeróbios. Após o crescimento dessas bactérias em meios sólidos, recentemente misturadas e materiais de teste de 24 h foram colocados sobre a superfície dessas mídias inoculadas e incubadas em uma atmosfera adequada para 24-48 horas a 37 graus C. Discos impregnados com o líquido Super EBA foram utilizados como controle positivo. O efeito antibacteriano de cada material foram medidos em milímetros, e os dados foram analisados usando análise de variância e teste de Scheffé para determinar as diferenças estatísticas entre os efeitos antibacterianos dos materiais de ensaio. Discos impregnados com Super EBA líquido causou diferentes graus de inibição do crescimento de bactérias anaeróbias facultativas e estritas. Outros autores comprovam a atividade antimicrobiana do MTA (TORABINEJAD et al., 1995; PARIROKH E TORABINEJAD, 2010; HASAN ZARRABI et al., 2009; ELDENIZ et al., 2006; AL-HEZAIMI et al., 2005) TANOMARU-FILHO et al., 2007; SIPERT et al., 2005; ESTRELA et al., 2000) e também atividade antifúngica (AL-NAZHAN e AL-JUDAI, 2003).

Até o momento, não há um material retrobturador que reúna todas as propriedades ideais exigidas do mesmo. Por isso, há uma busca incessante por parte dos pesquisadores para o desenvolvimento de um material que se aproxime, ao máximo, do ideal.

Alguns materiais já foram propostos como retrobturadores, e, dentre eles, podemos citar o amálgama de prata (MESSING, 1967), a guta-percha (MARCOTTE; DOWSON; ROWE, 1975), os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol (GARTNER; DORN, 1992), os cimentos com hidróxido de cálcio (LUIZ, 2002, TANOMARU-FILHO, 1998) e os cimentos à base de agregado de trióxido mineral. (TORABINEJAD et al., 1993, HOLLAND et al., 1999, HOLLAND et al., 2002).

Na atualidade, o material mais estudado e mais utilizado em obturações retrógradas é o MTA (agregado de trióxido mineral). Desde sua introdução na Odontologia, em 1993, esse material tem sido objeto de muitos estudos, quer seja para conhecer seus reais componentes, quer seja para tentar melhorar suas propriedades físicas, principalmente. Suas indicações também foram ampliadas passando, daquela inicial, de selar em definitivo as comunicações

entre a cavidade pulpar e o periodonto, para material retrobturador, capeador em pulpotomias, proteções pulpares diretas, reabsorções dentárias internas e externas, rizogênese incompleta, como *plug* apical, em fraturas dentárias e obturação dos canais radiculares. (JACOBOVITZ;DE LIMA, 2008, PACE; GIULIANI;PAGAVINO, 2008, OLIVEIRA et al., 2008, SRINIVASAN;WATERHOUSE;WHITWORTH, 2009).

Em relação às suas propriedades físico-químicas, o MTA tem demonstrado ser um bom selador marginal (LEE et al., 1993, TORABINEJAD et al., 1993), possui alcalinidade (TORABINEJAD et al.,1995; DUARTE et al.,2003; VASCONCELOS, 2006, VIVAN et al., 2010), boa radiopacidade (TORABINEJAD et al., 1995; VIVAN et al., 2009). Juntamente com essas excelentes propriedades físico-químicas, o MTA tem proporcionado respostas teciduais com resultados muito semelhantes aos encontrados com o uso do hidróxido de cálcio, inclusive, induzindo a deposição de tecido mineralizado sobre sua superfície. (LUIZ, 2002). Todavia, a dificuldade de sua manipulação fez com que alguns pesquisadores alterassem sua composição adicionando-lhe outros componentes (CAMILLERI et al., 2010). Aditivos foram incluídos ao MTA visando diminuir seu tempo de presa (BORTOLUZZI, et al., 2006), chegando inclusive ao surgimento do MTA fotopolimerizável. (GOMES-FILHO et al., 2008; VIVAN et al., 2009; VIVAN et al., 2010).

À época do seu lançamento, em 1995, pela *Dentsply/Tulsa*, quando recebeu a denominação de ProRoot MTA, o fabricante descrevia-o como possuidor das seguintes substâncias: silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, ferroaluminatotetracálcico, além de outros óxidos em menor quantidade.

Todavia em 1999, Wucherpfenning e Green publicaram um *abstract*, onde concluíram que o MTA e o cimento Portland eram semelhantes macro e microscopicamente. Posteriormente a *Dentsply/Tulsa* passou a informar na bula a presença de 75% de cimento Portland, 5% de sulfato de cálcio di-hidratado e 20% de óxido de bismuto. Estrela et al., em 2000, analisaram os elementos químicos do cimento Portland e do MTA e concluíram que o cimento Portland contém os mesmos elementos químicos do MTA, com exceção do óxido de bismuto. A partir deste trabalho, vários foram realizados com a mesma finalidade. (CAMILLERI et al., 2005, DAMMASCHKE et al., 2005, DEAL et al., 2002, FERREIRA et al., 2005, FUNTEAS; WALLACE; FOCHTMAN, 2002, ISLAM; CHNG; YAP, 2006, SONG et al., 2006). Outros trabalhos foram realizados comparando o MTA com o cimento Portland, analisando e verificando a similaridade quando utilizados em tecido subcutâneo de ratos (HOLLAND et al., 2001a; CINTRA et al., 2010,MCNAMARA et al., 2010), em capeamentos

pulpaes (ACCORINTE et al., 2009), em pulpotomias de dentes de cães (HOLLAND et al., 2001b, MENEZES et al., 2004), em obturações de canais radiculares de dentes de cães (HOLLAND et al., 2001c), quando implantados em mandíbulas de cobaias (SAIDON et al., 2002), em retrobturações de canais radiculares de dentes de cães. (BERNABÉ; HOLLAND, 2004).

Hollandet al. (1999) verificaram similaridade entre o hidróxido de cálcio e MTA. Ambos os materiais determinaram a formação de granulações de calcita e uma ponte de tecido mineralizado subjacente. Portanto, sugeriram que o mecanismo de ação de ambos os materiais são semelhantes. O óxido de cálcio do pó do MTA, ao se misturar com a água no processo de manipulação, é convertido em hidróxido de cálcio. Esse último, em contato com os fluídos tissulares, se dissocia em íons cálcio e hidroxila. Os íons cálcio reagindo com o gás carbônico dos tecidos, dará origem as granulações de calcita. Junto a essas granulações, há acúmulo de fibronectina (SEUX et al., 1991), a qual permite adesão e diferenciação celular. Na sequencia, tem-se a formação do tecido mineralizado.

Hollandet al. (2001a) avaliaram em tecido subcutâneo de ratos a implantação de tubos de dentina com MTA, cimento Portland e hidróxido de cálcio. Os animais foram sacrificados em 7 e 30 dias e realizados as análises histológicas pela coloração de Von Kossa. Concluíram que o mecanismo de ação das substâncias estudadas é similar.

Outra hipótese, seria que 13 a 17% do cimento Portland é solúvel em forma de hidróxido de cálcio, dando a mesma sequencia de formação de tecido mineralizado citado acima. (PETRUCCI, 1998).

Além dos cimentos retrobturadores, um cimento obturador de canal, o AH Plus, tem apresentado excelentes resultados físico-químico- mecânicos (DUARTE et al., 2004; ALFREDO et al., 2008; NUNES et al., 2008) e biológicos (SOUSA et al., 2006, GOMES-FILHO et al., 2007, OLIVEIRA et al., 2010).

Sousa et al. (2006) avaliaram a biocompatibilidade de 3 cimentos endodônticos, dentre eles, o AH Plus. Realizaram implantes em porcos e avaliaram em 4 e 12 semanas. Concluíram que o cimento Epiphany apresentou melhores resultados de biocompatibilidade, enquanto que o AH Plus, foi moderado.

Gomes-Filho et al. (2007) avaliaram a biocompatibilidade de alguns cimentos endodônticos (Endomethasone, Pulp Canal Sealer EWT e AH Plus). Utilizaram tubos de polietileno em subcutâneo de ratos e avaliaram em 3, 7 e 30 dias. O cimento Pulp Canal

Sealer EWT apresentou os melhores resultados, enquanto que o Endomethasone e AH Plus resultados semelhantes, mas os três cimentos com padrões semelhantes entre si.

Oliveira et al. (2010) avaliaram a resposta biológica do cimento AH Plus associado a 5% de hidróxido de cálcio em subcutâneo de ratos. O período de análise foi de 14 dias. Concluíram que a adição de 5% de hidróxido de cálcio ao cimento AH Plus, melhorou o seu comportamento, produzindo reação inflamatória menos severa, quando implantados em subcutâneo de ratos.

Não há na literatura relatos sobre a associação do cimento Portland com o AH Plus. Sabendo da semelhança do cimento Portland com o MTA, e que esse último apresenta bons resultados biológicos, surge a dúvida da possibilidade da associação, com a finalidade de melhorar as propriedades de manipulação do cimento Portland, e adicionar as excelentes propriedades biológicas do AH Plus.

Sabe-se, também, que as respostas biológicas de um material estão na dependência de algumas de suas propriedades físico-químicas. Uma vez que o material apresente um pH compatível com o organismo, liberação de íons cálcio e hidroxila, solubilidade e tempo de presa satisfatórios, e um bom selamento marginal, esse material apresentará boas propriedades biológicas. Diante disso, torna-se necessário a realização de testes biológicos, para esclarecer e corroborar com os resultados físico-químicos-mecânicos.

Muitas foram as tentativas de pesquisadores para se aproximar de um cimento retrobturador ideal, criando alguns ou realizando modificações em outros, visando à obtenção de determinada propriedade ou a melhoria de outras. Diante do exposto, fica a interrogação da proposta da associação do cimento Portland ao AH Plus, o que justifica a realização da presente pesquisa.

Diante do exposto, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana e ação biológica da associação do cimento Portland ao AH Plus em diferentes proporções.

2OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a atividade antimicrobiana e a resposta do tecido subcutâneo de ratos a implantação do cimento Portland associado ao cimento AH Plus em diferentes proporções.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana e a resposta do tecido subcutâneo de ratos a implantação do cimento Portland associado ao cimento AH Plus nas seguintes proporções:

- 50% de cimento AH Plus + 50% de cimento Portland
- 60% de cimento AH Plus + 40 % de cimento Portland
- 70% de cimento AH Plus + 30% de cimento Portland
- 80% de cimento AH Plus + 20% de cimento Portland
- 90% de cimento AH Plus + 10% de cimento Portland
- 100% cimento Portland
- 100% AH Plus.

- Determinar qual a melhor proporção para associação do cimento Portland ao AH Plus em relação à atividade antimicrobiana e a resposta do tecido subcutâneo de ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Os materiais testados foram o cimento Portland associado ao cimento AH Plus em diferentes proporções, os quais foram associados em massa, conforme a tabela 1:

Grupos	Cimentos
Grupo 1	50% de cimento AH Plus + 50% de Portland
Grupo 2	60% de cimento AH Plus + 40 % de Portland
Grupo 3	70% de cimento AH Plus + 30% de Portland
Grupo 4	80% de cimento AH Plus + 20% de Portland
Grupo 5	90% de cimento AH Plus + 10% de Portland
Grupo 6	100% cimento Portland (controle)
Grupo 7	100% AH Plus (controle)

Tabela 1: grupos experimentais.

A composição dos materiais testados apresenta-se na tabela 2.

Cimento	Composição	Fabricante
Cimento Portland	Silicato tricálcio; silicato dicálcico; aluminato tricálcico; ferroaluminatotetracálcico; sulfato de cálcio dihidratado; óxidos alcalinos; outros constituintes.	Votorantim Cimentos, São Paulo, São Paulo, Brasil.
AH Plus	Pasta A: resina epóxi; tungstênio de cálcio; óxido de zircônio; aerosil e óxido de ferro. Pasta B: amina adamantana; N, N-Diberncil-5-oxanonano-diamina-1,9; TCD-Diamina; tungsteanato de cálcio; óxido de zircônio; aerosil e óleo de silicone.	Dentsply/De Trey, Konstanz, Alemanha

Tabela 2: composição e fabricante dos materiais a serem testados.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram avaliadas 30 estirpes de *Enterococcus faecalis* (Figura 1), sendo 30 de campos e 1 ATCC 29212 pertencentes à bacterioteca do laboratório de Microbiologia da Universidade do Sagrado Coração – USC, previamente recuperadas por cultura bacteriológica de amostras da cavidade oral de pacientes atendidos no serviço de Endodontia da Clínica de Odontologia da USC – Bauru – SP. Todas as estirpes encontravam-se congeladas a -20°C e foram isoladas em meio M-Enterococcus ágar (Difco[®]) e identificadas conforme fluxograma de identificação segundo Koneman et al., 2001 (Figura 1).

As estirpes foram ativadas em placas de M-Enterococcus ágar (Difco[®]) que foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C por 18-24 horas. A partir das placas, colônias foram repicadas para o caldo BHI (Oxoid[®]) até turvação total do meio.

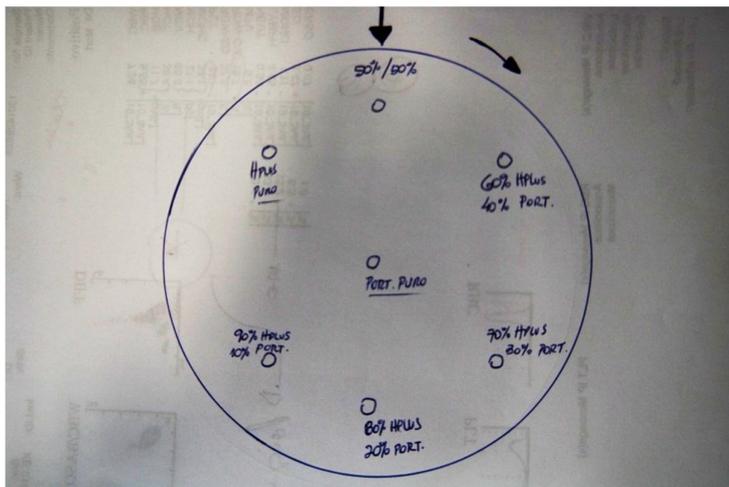


Figura 1: Fluxograma de identificação das proporções associadas

Para se avaliar a sensibilidade bacteriana aos cimentos estudados, foi utilizada a técnica de difusão radial da substância sobre a superfície de placas de Mueller-Hintonagar.

As bactérias testadas foram de linhagens de campo e 1 ATCC (American Type Culture Collection), sendo uma estirpe de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. As estirpes foram retiradas da bacterioteca e ativadas sobre a superfície de placas de Brucellaagar suplementado com 5% de sangue de carneiro incubadas a 36°C por 24 horas. A partir dessas placas, 5 colônias foram transferidas para um tubo contendo 5 mL de caldo BHI que foi

incubado a 36°C “overnight”. A partir do crescimento, foi preparado em salina estéril o ajuste para a densidade ótica do padrão de turbidez da escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias /mL). Placas de Petri de 100 x 10 mm previamente preparadas com Mueller-Hintonagar (Merck®) na espessura de 6 mm foram escavadas em poços com 5 mm de diâmetro por 3 mm de profundidade. Uma vez ajustada a densidade do inóculo, a semeadura foi feita através de zaragatoa de algodão estéril na superfície das placas, tomando-se o cuidado de não semear o interior das escavações. As placas foram colocadas em estufa por 30 minutos para secagem da superfície do meio de cultura antes da colocação dos cimentos. Os seguintes cimentos foram utilizados no teste: 50% de cimento AH Plus + 50% de cimento Portland; 60% de cimento AH Plus + 40 % de cimento Portland; 70% de cimento AH Plus + 30% de cimento Portland; 80% de cimento AH Plus + 20% de cimento Portland; 90% de cimento AH Plus + 10% de cimento Portland; 100% cimento Portland; 100% AH Plus. Os materiais foram proporcionados em massa. Após a espatulação os poços foram preenchidos com os cimentos através de seringas tipo Luer-Look e as placas foram deixadas 2 horas em temperatura ambiente para pré-incubação. Após, foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C, sob condições atmosféricas adequadas por 24 horas. Os halos de inibição foram mensurados com auxílio de um paquímetro digital, sob intensa luminosidade (Figura 2).



Figura 2: Halos de inibição que foram formados ao redor do material

3.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com os dados em mãos, foi aplicado os testes estatísticos de Kruskal-Wallis para comparação global e Dunn para comparações individuais, com nível de significância de 5%.

3.2.3. SELEÇÃO DOS ANIMAIS E IMPLANTAÇÃO DOS MATERIAIS

Foram utilizados 42 ratos (*Rattus norvegicus albinus* Holtzman), adultos-jovens, pesando em média 250g (aproximadamente 75 dias), que foram mantidos no Biotério da Universidade Sagrado Coração – USC, durante o período descrito, sendo que o projeto foi aprovado pelo comitê de ética da mesma instituição com Protocolo, sob protocolo 147/11.

Os materiais em estudo nesta etapa, foram acondicionados em tubos de polietileno com 1,5mm de diâmetro e 1 cm de comprimento, com uma das extremidades fechada.

A anestesia dos animais foi efetuada com Dopalen – *Cloridrato de Ketamina 0,08mL* e Virbaxyl 2% - *Cloridrato de Xilazina 0,02mL*, na dosagem de 100mg/kg de peso corpóreo, injetando-se na região intra-peritoneal e, então foi realizado a cirurgia de implantação dos tubos.

Inicialmente foi realizada tricotomia (Figura 3), na parte dorsal anterior do animal antissepsia local com povidine, seguida da demarcação dos quadrantes. Posteriormente foram realizadas as incisões com lâmina de bisturi número 15 (Figura 4), divulsão com tesoura de ponta romba e pinça hemostática (Figura 5). Em seguida, os tubos contendo os materiais foram implantados (Figura 6), sendo divididos nos seguintes grupos experimentais (Tabela 3).

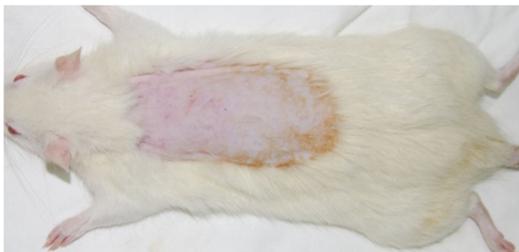


Figura 3: Tricotomia na região dorsal dos ratos



Figura 4: Incisão com lâmina de bisturi número 15, na região dorsal

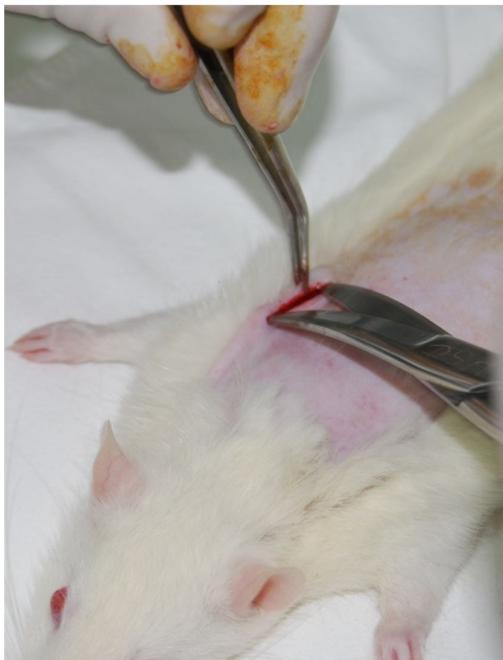


Figura 5: Divulsão com tesoura de ponta romba



Figura 6: Implantação dos tubos de polietileno com material recém-espaturado

Grupos	Cimentos
Grupo 1	50% de cimento AH Plus + 50% de Portland
Grupo 2	60% de cimento AH Plus + 40 % de Portland
Grupo 3	70% de cimento AH Plus + 30% de Portland
Grupo 4	80% de cimento AH Plus + 20% de Portland
Grupo 5	90% de cimento AH Plus + 10% de Portland
Grupo 6	100% cimento Portland (controle)
Grupo 7	100% AH Plus(controle)

Tabela 3: grupos experimentais.

Foram utilizados 14 animais por período experimental, sendo que cada animal recebeu 4 tubos na região dorsal, dois do lado direito e dois no lado esquerdo (Figura 7). Para cada animal, os tubos foram implantados com diferentes materiais. Após a implantação dos tubos, foi realizada a sutura da incisão com fio de Nylon 4.0 (Figura 8).



Figura 7: Implantação de 4 tubos de polietileno na região dorsal, dois do lado direito e dois do lado esquerdo



Figura 8: Sutura com fio de Nylon 4.0

Decorridos os períodos experimentais de 7, 15 e 30 dias, os animais foram novamente anestesiados, nova tricotomia foi realizada e os tubos localizados por palpação seguida da remoção dos blocos de tecido adjacente aos mesmos, com margem de segurança, para possibilitar, após a tramitação laboratorial o exame histopatológico. Após remoção dos tecidos, os animais foram mortos por overdose anestésica.

3.4. PREPARO HISTOLÓGICO

Após a remoção dos tecidos, os mesmos foram colocados imediatamente em formalina a 10% tamponada para fixação das peças.

Após a fixação, os blocos de tecido contendo os tubos de polietileno foram imersos em frascos rotulados com identificação do animal, região da biópsia, material e período experimental. Com o objetivo de reduzir o tamanho das peças, os tecidos foram cortados e se

removeu os tubos de polietileno. Em seguida foi realizada a rotina laboratorial convencional até a obtenção de blocos de parafina contendo os respectivos materiais e os tecidos adjacentes (devidamente etiquetados para identificação) para avaliação. Os espécimes foram preparados para a obtenção de cortes seriados com a espessura em torno de 6 μm , para confecção das lâminas.

Os preparos para leitura microscópica foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e avaliados em microscopia ótica comum para análise descritiva do quadro histopatológico ao redor do material implantado. A análise será descritiva e por meio de morfometria.

4 RESULTADOS

Quanto a reação do tecido subcutâneo de ratos, a análise microscópica de todos os espécimes foi realizada considerando-se o tecido presente na embocadura do tubo de polietileno, em contato com o material a ser testado.

Na proporção de 50% de cimento Portland e 50% AH Plus, aos 7 dias observou-se material granular birrefringente em meio a tecido de granulação infiltrado por leucócitos mononucleares, com discreta deposição de matriz colágena. Eventualmente, visualizou-se material degenerado em contato com o material. Aos 14 dias, discretas fibras colágenas estavam organizadamente depositadas, permeadas por discreto a moderado infiltrado inflamatório mononuclear. Aos 30 dias, observou-se persistência do infiltrado inflamatório mononuclear, com padrão microscópico semelhante ao período de 14 dias (Figura 9 a, b, c).

Na proporção de 40% de cimento Portland e 60% AH Plus – No período de 7 dias visualizou-se material granular birrefringente circular, em meio a tecido de granulação ricamente celularizado e infiltrado por moderado infiltrado inflamatório mononuclear. Após 14 dias já se notou deposição organizada das fibras colágenas em meio a discreto infiltrado mononuclear. No período de 30 dias, já se observou a presença de tecido conjuntivo fibroso permeado por eventuais leucócitos mononucleares (Figura 10 a, b, c).

Na proporção de 30% de cimento Portland e 70% AH Plus- Aos 7 dias notou-se tecido de granulação ricamente celularizado permeado por moderado infiltrado mononuclear. Após 14 dias, o tecido apresentou-se em organização, com deposição organizada das fibras colágenas. Aos 30 dias, notou-se presença de tecido conjuntivo fibroso e eventuais células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (Figura 11 a, b, c).

Na proporção de 20% de cimento Portland e 80% AH Plus – Após 7 dias observou-se a presença de tecido de granulação ricamente vascularizado. Assim como os demais grupos, aos 14 dias a deposição organizada de fibras colágenas foi visualizada, em meio a discreto infiltrado mononuclear e discretas células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho. No período de 30 dias, células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho foram visualizadas em meio a tecido conjuntivo fibroso em organização (Figura 12 a, b, c).

Na proporção de 10% de cimento Portland e 90% AH Plus – No período de 7 dias, focos de degeneração tecidual foram observados em meio aos grânulos do material e tecido de granulação moderadamente infiltrado por leucócitos mononucleares. Aos 14 dias, houve deposição organizada de fibras colágenas em meio a moderado infiltrado inflamatório mononuclear, com persistência de eventuais áreas de degeneração tecidual próximo ao material. Após 30 dias, organização do tecido conjuntivo fibroso foi observada, permeado por discreto infiltrado mononuclear (Figura 13 a, b, c).

Na proporção de 100% – Aos 7 dias notou-se presença de tecido de granulação permeado por moderado infiltrado leucocitário mononuclear. No período de 14 dias também se observou organização do tecido de granulação, bem como eventuais células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho. Aos 30 dias, mesmo em meio à presença do material, houve a organização do tecido conjuntivo fibroso (Figura 14 a, b, c).

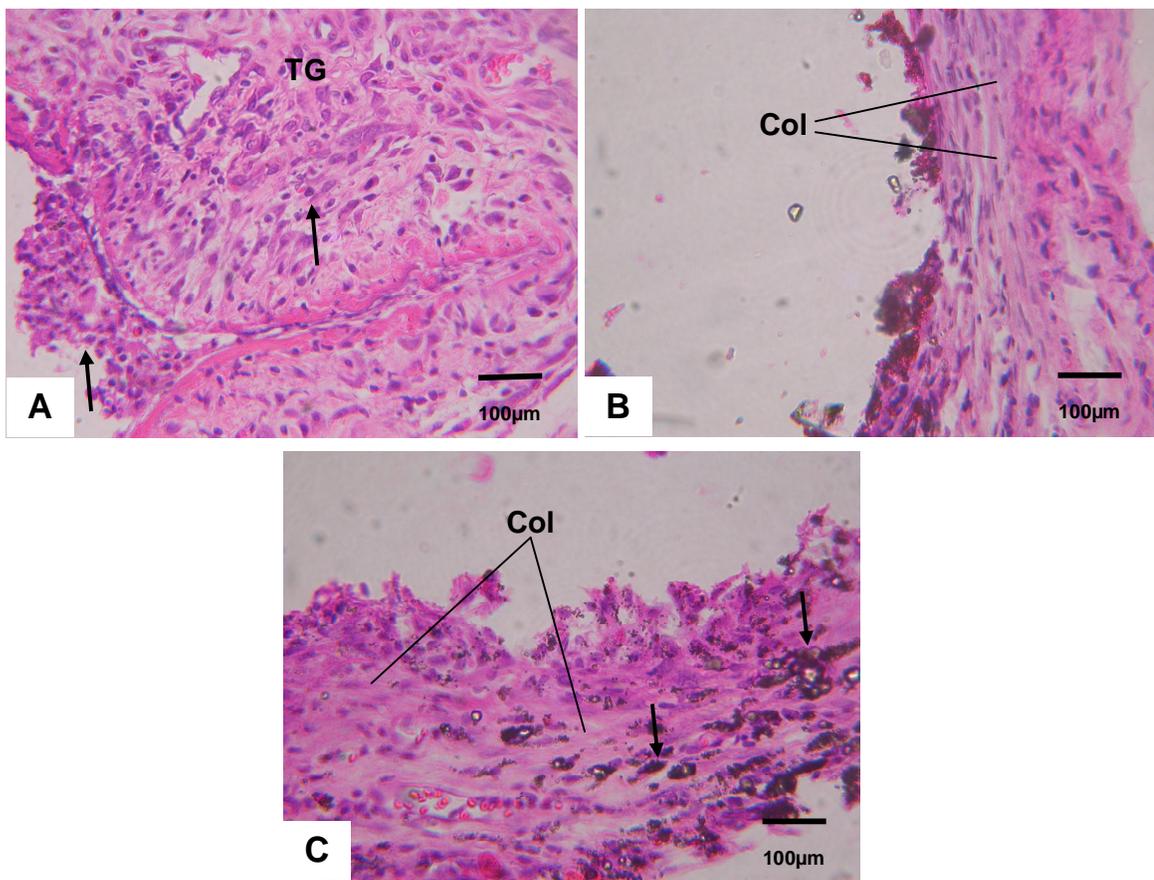


Figura 9 (50/50) – A) 7 dias - Tecido de granulação (TG) com moderado infiltrado inflamatório (setas) próximo à superfície do material; B) 14 dias – Deposição de fibras colágenas paralelas entre si (Col); C) 30 dias – Deposição de fibras colágenas (Col) em meio a grânulos do material (setas).

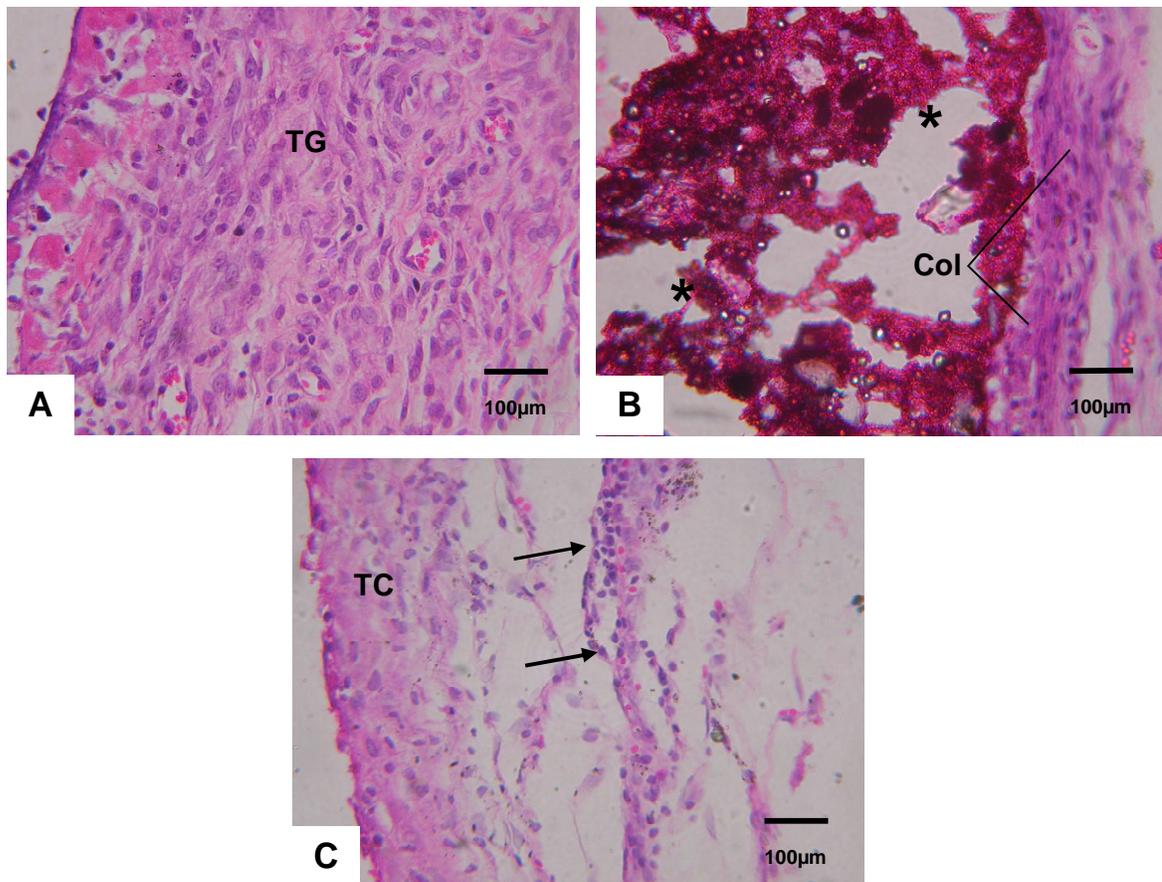


Figura 10 (40/60) – A) 7 dias – Tecido de granulação com moderado infiltrado mononuclear (TG); B) 14 dias - Fibras colágenas organizadas (Col) próximas à superfície do material (*); C) 30 dias - Tecido conjuntivo fibroso (TC) em meio a focos de discreto infiltrado mononuclear (setas).

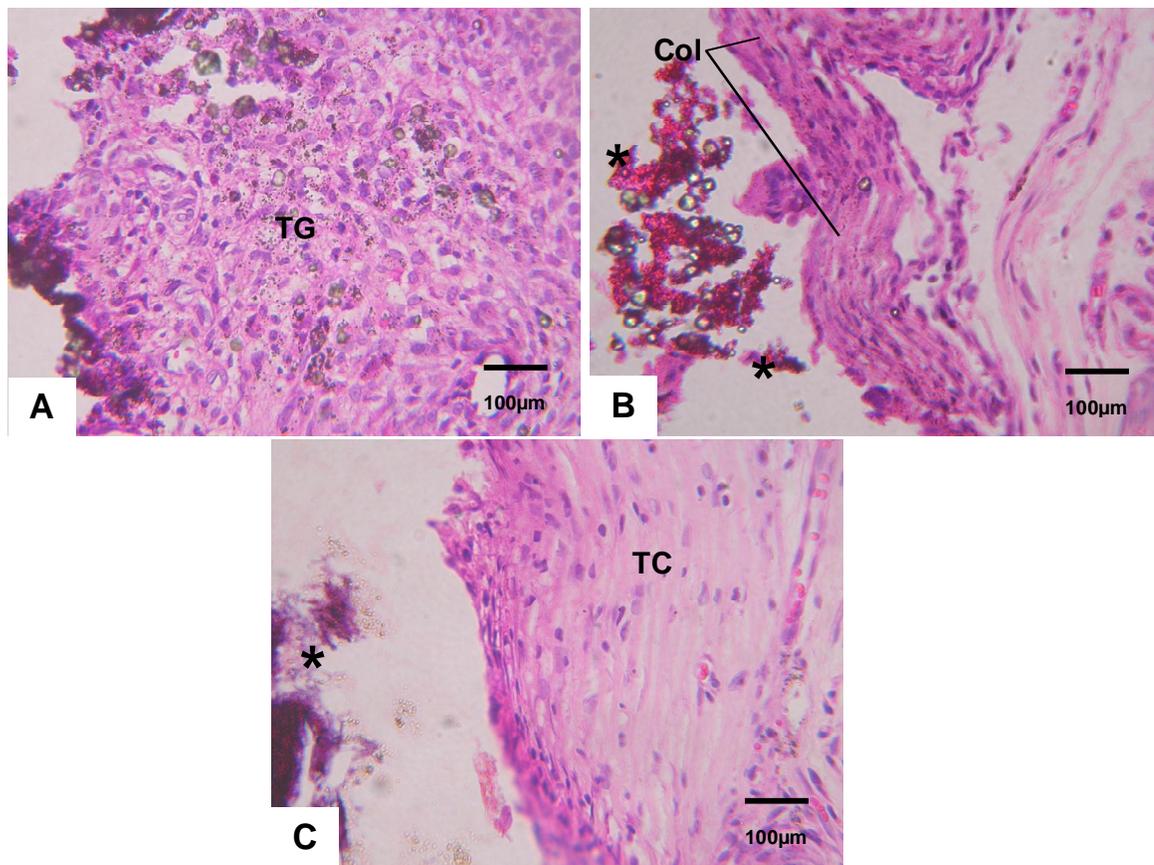


Figura 11 (70/30) – A) 7 dias - Tecido de granulação permeado por moderado infiltrado mononuclear (TG); B) 14 dias – Deposição organizada das fibras colágenas (Col); C) 30 dias – Tecido conjuntivo organizado (TC). Material (*)

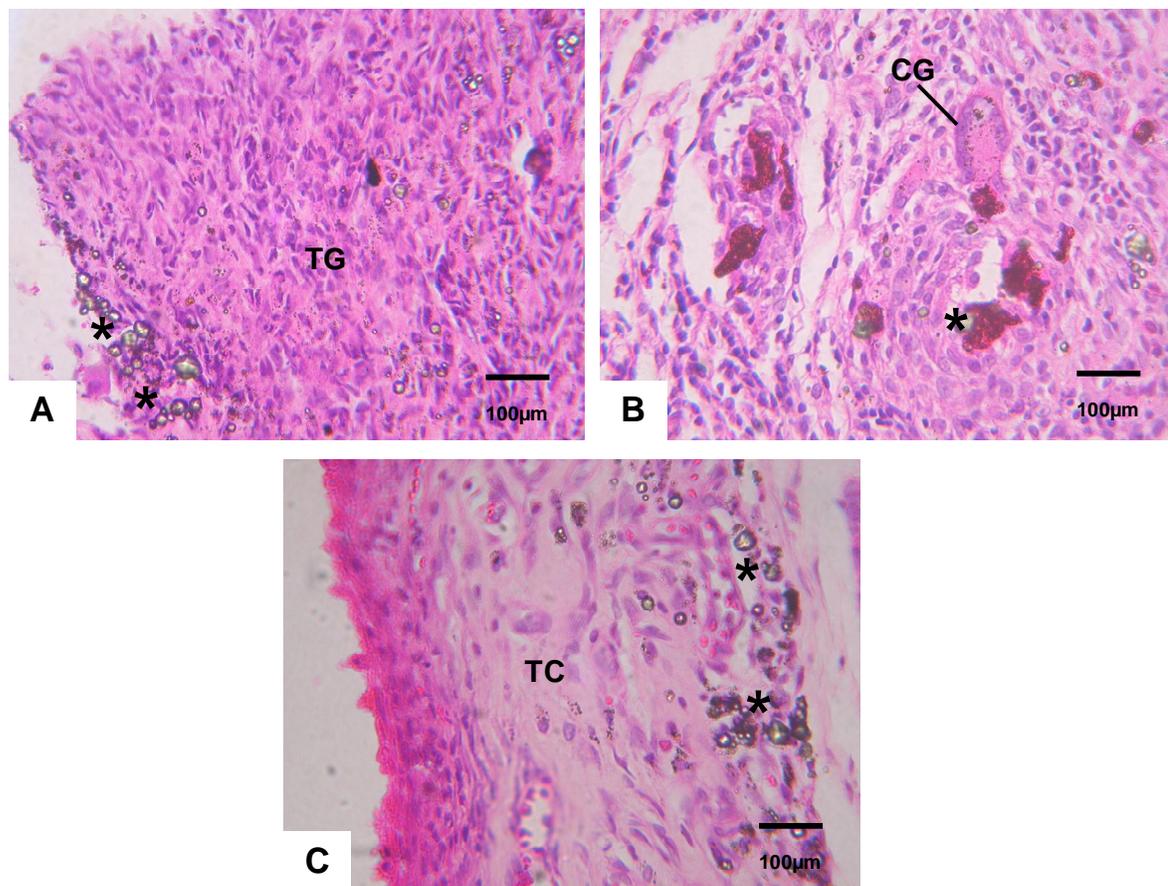


Figura 12 (80/20) – A) 7 dias – Tecido de granulação (TG) próximo ao material (*); B) 14 dias – Presença de eventuais células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho (CG); C) 30 dias - Tecido conjuntivo (TC) em organização em meio ao material (*)

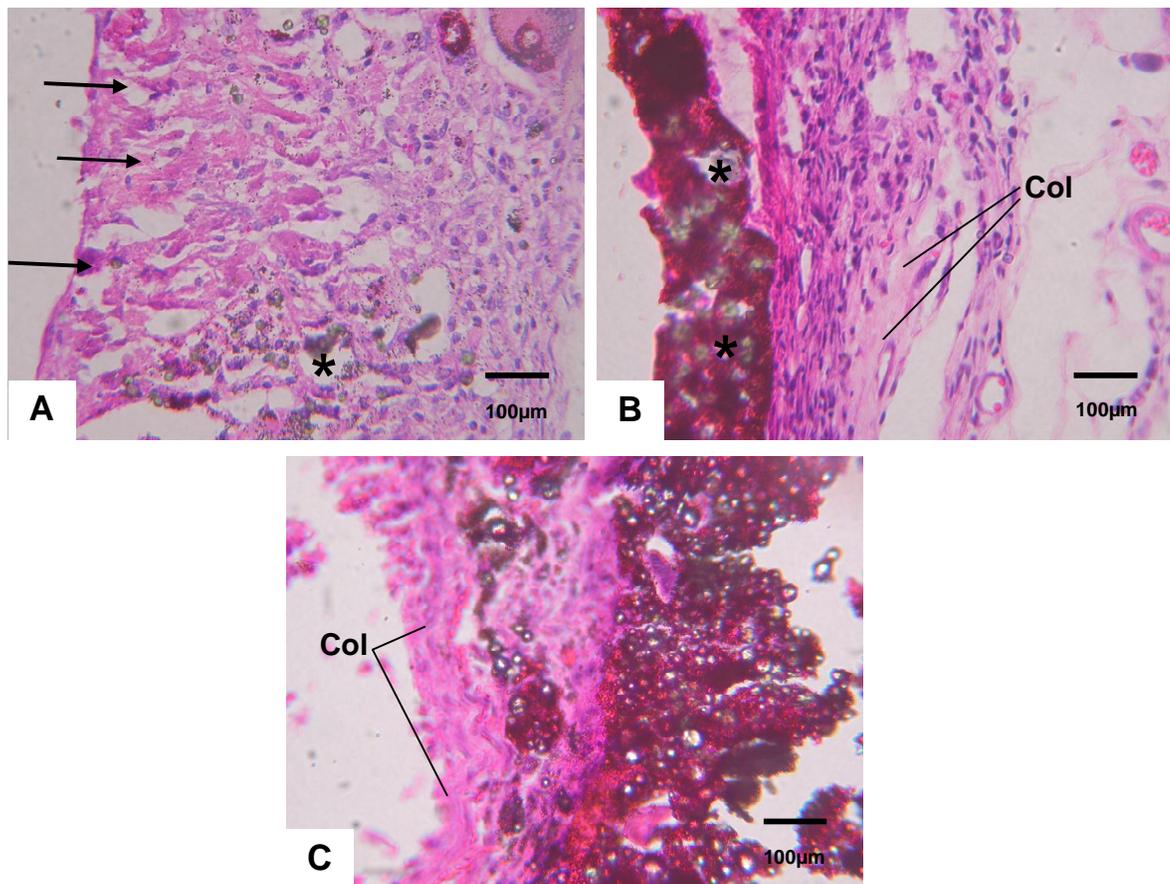


Figura 13 (90/10) – A) 7 dias – Áreas de degeneração celular (setas) próximo à superfície do material (*); B) 14 dias – Deposição de fibras colágenas (Col) em meio ao infiltrado mononuclear (setas); C) 30 dias – Organização das fibras colágenas (Col) em meio ao material (*)

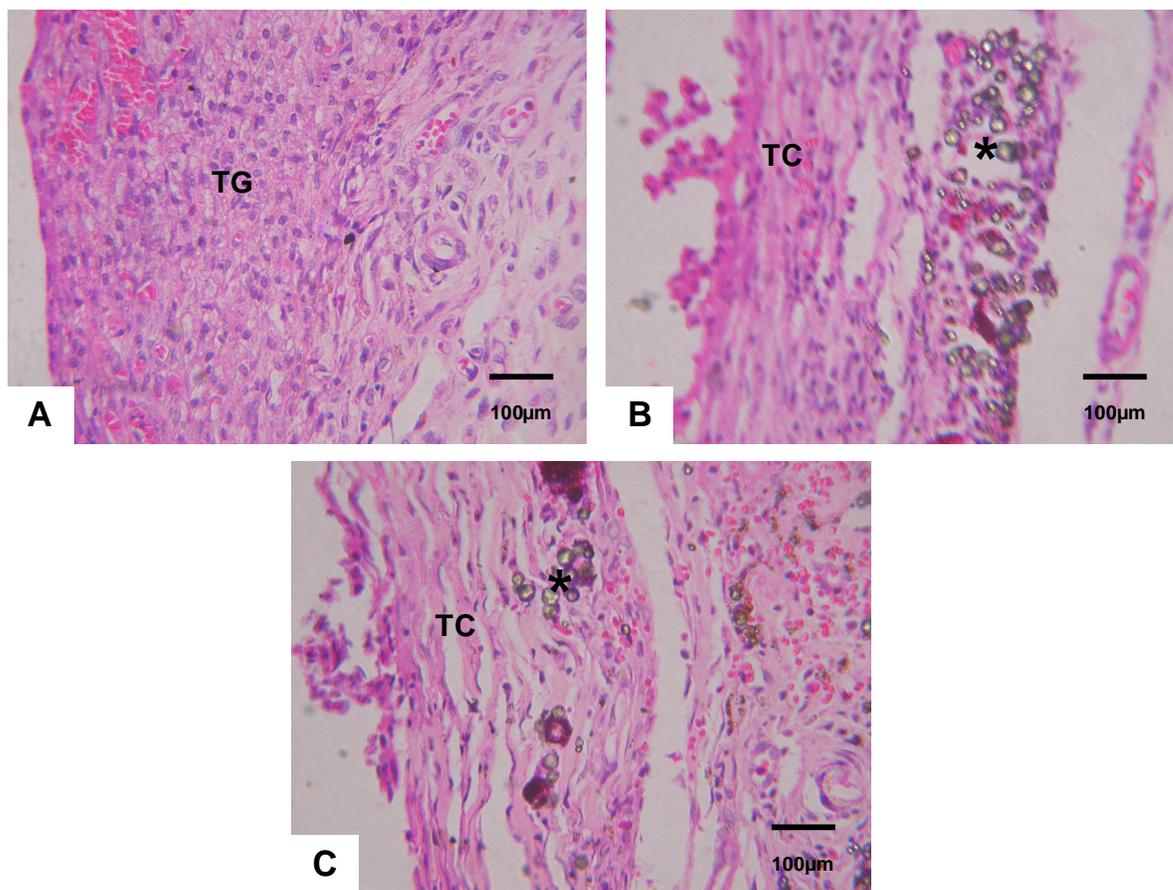


Figura 14 (100) – A) 7 dias - Tecido de granulação moderadamente infiltrado por leucócitos mononucleares (TG); B) 14 dias - Tecido conjuntivo em organização (TC) próximo ao material (*); C) 30 dias – Tecido conjuntivo fibroso (TC) em meio ao material (*).

A tabela 4 representa a atividade antimicrobiana dos cimentos estudados no período de 24 horas.

Cepas	50/50	60/40	70/30	80/20	90/10	100-AH plus	100-Portland
1	0	0	0	5 mm	7mm	0	0
2	0	0	0	7mm	8mm	0	0
3	0	0	0	7mm	7mm	9mm	0
4	0	0	0	7mm	7mm	10mm	0
5	0	0	0	0	6mm	9mm	0
6	0	0	0	7mm	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	6mm	10mm	0
9	0	0	0	7mm	6mm	10mm	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	6mm	6mm	7mm	0
12	0	0	0	7mm	7mm	10mm	0
13	0	0	0	7mm	7mm	11mm	0
14	0	0	0	7mm	8mm	0	
15	0	0	0	0	6mm	8mm	0
16	0	0	0	7mm	7mm	10mm	0
17	0	0	0	0	7mm	9mm	0
18	0	0	0	7mm	7mm	0	0
19	0	0	0	7mm	7mm	8mm	0
20	0	0	0	0	7mm	10mm	0
21	0	0	0	7mm	7mm	11mm	0
22	0	0	0	6mm	8mm	11mm	0
23	0	0	0	6mm	6mm	9mm	0
24	0	0	0	7mm	7mm	10mm	0
25	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	7mm	7mm	10mm	0
27	0	0	0	0	0	7mm	0
28	0	0	0	6mm	6mm	10mm	0
29	0	0	0	7mm	8mm	11mm	0
30	0	0	0	7mm	7mm	0	0
ATCC	0	0	6mm	7mm	8mm	11mm	0

Tabela 4: Halos (em mm) da atividade antimicrobiana dos cimentos estudados no período de 24 horas.

A tabela 5 representa a atividade antimicrobiana dos cimentos estudados no período de 48 horas.

Cepas	50/50	60/40	70/30	80/20	90/10	100- AH plus	100- Portland
1	0	0	0	0	6mm	0	0
2	0	0	0	6mm	7mm	0	0
3	0	0	0	6mm	7mm	8mm	0
4	0	0	0	6mm	6mm	9,5mm	0
5	0	0	0	6mm	7mm	9mm	0
6	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	7mm	6mm	9mm	0
9	0	0	0	0	6mm	9mm	0
10	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	6mm	7mm	0
12	0	0	0	0	6mm	10mm	0
13	0	0	0	7mm	7mm	10,5mm	0
14	0	0	0	7mm	7,5mm	0	0
15	0	0	0	0	6mm	8mm	0
16	0	0	0	6mm	6mm	9mm	0
17	0	0	0	0	6mm	9mm	0
18	0	0	0	6mm	7mm	0	0
19	0	0	0	6mm	6mm	8mm	0
20	0	0	0	0	6mm	9mm	0
21	0	0	0	7mm	7mm	11mm	0
22	0	0	0	0	7,5mm	11mm	0
23	0	0	0	0	6mm	8mm	0
24	0	0	0	6mm	7mm	10mm	0
25	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	7mm	7mm	10mm	0
27	0	0	0	0	0	6mm	0
28	0	0	0	7mm	6mm	10mm	0
29	0	0	0	7mm	8mm	10mm	0
30	0	0	0	7mm	7mm	0	0
ATCC	0	0	0	6mm	7mm	11mm	0

Tabela 5: Halos (em mm) da atividade antimicrobiana dos cimentos estudados no período de 48 horas.

A tabela 6 é a aplicação do teste de Dunn para comparações individuais entre os grupos estudados.

Dunn's Multiple Comparison Test	Difference in rank sum	Significant? P < 0.05?	Summary
50/50 vs 60/40	0,0000	No	ns
50/50 vs 70/30	-2,468	No	ns
50/50 vs 80/20	-66,42	Yes	***
50/50 vs 90/10	-81,18	Yes	***
50/50 vs AHP	-112,1	Yes	***
50/50 vs CP	0,0000	No	ns
60/40 vs 70/30	-2,468	No	ns
60/40 vs 80/20	-66,42	Yes	***
60/40 vs 90/10	-81,18	Yes	***
60/40 vs AHP	-112,1	Yes	***
60/40 vs CP	0,0000	No	ns
70/30 vs 80/20	-63,95	Yes	***
70/30 vs 90/10	-78,71	Yes	***
70/30 vs AHP	-109,7	Yes	***
70/30 vs CP	2,468	No	ns
80/20 vs 90/10	-14,76	No	ns
80/20 vs AHP	-45,70	Yes	*
80/20 vs CP	66,42	Yes	***
90/10 vs AHP	-30,94	No	ns
90/10 vs CP	81,18	Yes	***
AHP vs CP	112,1	Yes	***

Tabela 6: Teste de Dunn para comparações individuais.

A figura 15 representa o gráfico da atividade antimicrobiana no período de 24 horas.

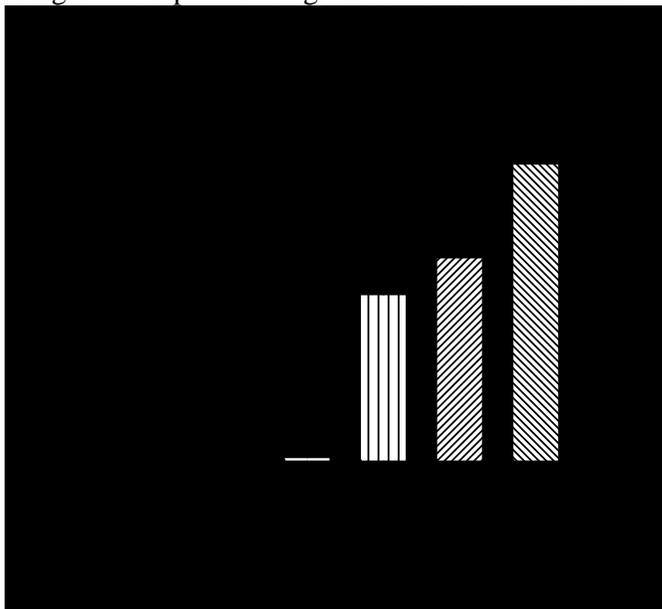


Figura 15: Gráfico da atividade antimicrobiana no período de 24 horas.

A figura 16 representa o gráfico da atividade antimicrobiana no período de 48 horas.

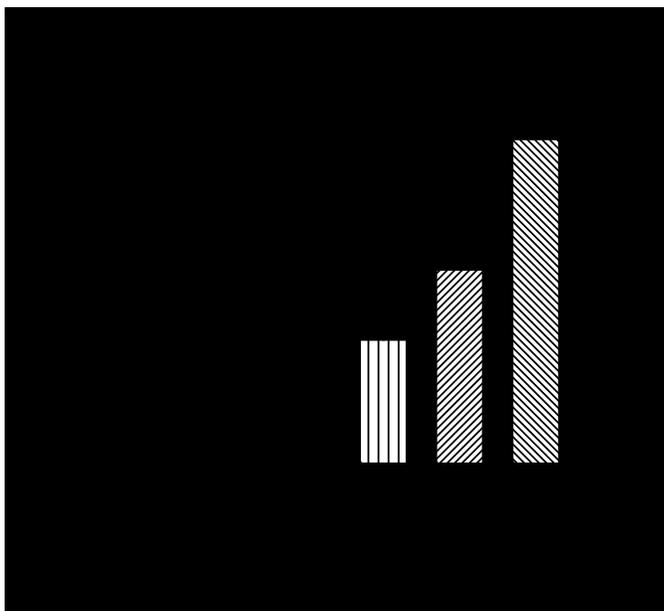


Figura 16: Gráfico da atividade antimicrobiana no período de 48 horas.

5 DISCUSSÃO

O método de avaliação da atividade antimicrobiana foi o de difusão radial em ágar. Este recurso é utilizado na literatura, como um dos testes iniciais para verificar a atividade antimicrobiana dos materiais sobre determinados microorganismos (Miyagak et al., 2006; Ribeiro et al., 2006; Estrela et al., 2000). Os micro-organismos *E. Faecalis* são frequentemente relacionados a fracassos endodônticos e utilizados como parâmetro para comparação de materiais (Miyagak et al., 2006; Ribeiro et al., 2006; Estrela et al., 2000; Estrela et al., 2011).

Estrela et al. (2000) não observaram zonas de inibição de crescimento microbiano quando utilizado o cimento Portland cinza. Desta forma, apesar de outros estudos terem sido realizados sobre a atividade antifúngica do Portland cement (MIYAGAK et al., 2006; ESTRELA et al., 2000; ESTRELA et al., 2011), o presente trabalho avaliará o Portland associado ao cimento AH Plus, o que poderá potencializar a atividade antimicrobiana.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a associação do AH Plus em diferentes proporções na ação antimicrobiana do cimento Portland.

Quanto à análise antimicrobiana no presente trabalho, utilizou-se o método de difusão radial, que é um método amplamente utilizado, embora tenha a limitação de oferecer apenas se a substância testada inibe ou não o crescimento microbiano, sem determinar atividade bactericida ou bacteriostática. No entanto é uma metodologia que favorece informações para verificar se deve-se realizar estudos de concentração inibitória ou bactericida mínimas para se verificar este feito. Outra limitação desta metodologia é o fato das substâncias testadas apresentarem diferentes graus de solubilização, influenciando na atividade antimicrobiana. No entanto, uma forma de diminuir este problema é realizar a pré-incubação das placas, ou seja, deixar 1 (uma) hora em temperatura ambiente com o ágar para baixo para solubilização do material.

No presente trabalho, por utilizar microorganismos anaeróbios facultativos, optou-se por essa metodologia. Outro fator que se optou por essa metodologia é sua facilidade de realização e ser uma metodologia amplamente citada na literatura (CANALDA C. et al., 1989; PUMAROLA M. et al., 1991; PUMAROLA M. et al., 1992).

Os resultados da presente pesquisa apresentaram atividade antimicrobiana para as associações de 80/20, 90/10 e AH Plus puro (controle). Isso se deve provavelmente pela maior proporção de AH Plus na associação, já que o mesmo apresenta atividade

antimicrobiana. Outro fator que pode interferir e a associação com o cimento Portland, que pode não liberar substancias que tem atividade antimicrobiana.

Com relação a atividade antimicrobiana, o cimento Portland, não apresentou ação frente às bactérias testadas pelo método de difusão radial. Estes achados do cimento Portland puro corroboram com os achados de outros autores (AL-NAZHAN e AL-JUDAI, 2003) que observaram ação antifúngica por parte do MTA, que consiste em um material em que o principal componente é o cimento Portland. Já Estrela et al., discordando do presente trabalho, não observaram inibição do cimento Portland e MTA frente a *Cândida-albicans*, deve ser ressaltado que no trabalho citado foi empregado o cimento Portland cinza e no presente trabalho foi empregado o branco, que apresenta diferença de alguns componentes, como a quantidade de oxido de ferro e aluminato, que pode interferir na ação. Resultados semelhantes frente ao *Staphylococcus aureus* e *Enterococcusfaecalis* foram observados em outro estudo analisando o MTA (TORABINEJAD et al., 1995) e MTA e cimento Portland (ESTRELA et al., 2000).

Outras propriedades físico-químicas-mecânicas devem ser realizadas com a presente associação, para que se possa indicar o material clinicamente.

Os testes de biocompatibilidade são executados em diversos animais, como cães (POLLICK, et al., 1995; CANOVA, 2003; SCHWARTZ, et al., 2007), carneiros (GOSAIN, et al., 2002; 2004), coelhos (MAEDA, 2005), camundongos (SCHWARTZ, et al., 2000), cobaias (RUMPEL, et al., 2006), hamsters (LASCHKE, et al., 2007) e os ratos de laboratório, que segundo Hedrich (2000), são os animais experimentais mais comumente utilizados, pois é o modelo que melhor representa o funcionamento do sistema mamífero. Serve como modelo para o teste de um grande número de materiais para aplicação em Endodontia e Cirurgia (TORNECK, 1966; PHILLIPS, 1967; TORNECK, 1967; HORSTED; FEJERSKOV; JOHANNESSEN, 1980; GORDUYSUS; ETIKAN; GOKOZ, 1998; HOLLAND, et al., 1999; 2001; 2002a; 2002b; MORAIS, et al., 2006; ZAMBUZZI, et al., 2006; GARCIA, 2008; GOMES, et al., 2008; MORI, et al., 2009).

A reprodução do rato em biotérios permite a eliminação de fatores individuais, como deficiência imune, ou estarem afetados por alguma doença, além de facilitar a obtenção do número de amostras necessárias. Esse animal tem um metabolismo mais acelerado, permitindo a obtenção de resultados num curto período de tempo (RODRIGUEZ SOSA,

2004).

Para o presente estudo foram selecionados ratos machos devido às variações no ciclo hormonal das fêmeas, o que poderia interferir nos resultados. Os animais tiveram a mesma origem, Biotério da Universidade Sagrado Coração, USC, e foram padronizados quanto à saúde, idade e peso corporal.

Para a implantação de pastas ou cimentos em tecido subcutâneo de ratos, é necessário a utilização de condicionadores, veículos especiais que permitam um controle de sua forma e tamanho, conforme sugeriu Torneck (1966). Essa metodologia simula uma condição clínica de extravasamento de material endodôntico para o periodonto apical. Segundo a literatura, os implantes dos materiais endodônticos em tecidos podem ser realizados em tubos de polietileno (MAGRO, et al., 1987; GORDUYSUS; ETIKAN; GOKOZ, 1998; YALTIRIK, et al., 2004; CINTRA, et al., 2006; MORAIS, et al., 2006; SUMER, et al., 2006; MORI, et al., 2009), de teflon (OLSSON; SLIWKOWSKI; LANGELAND, 1981; ECONOMIDES, et al., 1995; KOLOKOURIS, et al., 1996; 1998), em tubos de silicone rígidos (ZMENER; GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1990), em tubos de dentina (SOUZA, et al., 1977; ZANONI, et al., 1988; HOLLAND, et al., 1999; 2001; 2002a; 2002b), e recentemente, tem sido utilizada cápsulas de colágeno para determinados materiais (OLIVEIRA, et al., 1999; SICCA, et al., 2000; ZAMBUZZI, et al., 2005; 2006; GARCIA, 2008). No presente estudo foi realizada a implantação em tubos de polietileno.

As normas da FDI (STANFORD, 1980; STANLEY, 1992; ISO, 1997) recomendam período curto, 48 horas, para avaliação dos efeitos da incisão e do procedimento operatório. Para avaliar a reação do tecido conjuntivo, em contato com os materiais experimentais, recomendam períodos de 14 a 84 dias. A ADA (1972; 1982) sugere períodos experimentais que podem variar entre 7-10, 21-35 e 60-80 dias. Observamos que na literatura não existe um consenso entre os autores quanto aos tempos de avaliação. Torneck (1966; 1967) e Phillips (1967) utilizaram um período de 60 dias, Holland et al. (1999; 2001; 2002a; 2002b) optaram por períodos de 7 e 30 dias, enquanto outros empregaram períodos que variam de 7 a 180 dias (OLSSON; SLIWKOWSKI; LANGELAND, 1981; ORSTAVICK, 1988; ZMENER; GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1990; ECONOMIDES, et al., 1995; KOLOKOURIS, et al., 1996; KOLOKOURIS, et al., 1998). No presente estudo, foram utilizados os períodos de 7, 15 e 30 dias, pois são os mais próximos sugeridos pela ADA (1972; 1982).

Com relação aos resultados, todos os grupos apresentaram resultados aceitáveis. Observou-se nos períodos iniciais e presença de moderado infiltrado inflamatório mononuclear. Nos períodos intermediários e finais, observou-se tecido de tecido conjuntivo fibroso em organização.

Na proporção de 50% de cimento Portland e 50% AH Plus, aos 7 dias observou-se material granular birrefringente em meio a tecido de granulação infiltrado por leucócitos mononucleares, com discreta deposição de matriz colágena. Eventualmente, visualizou-se material degenerado em contato com o material. Aos 14 dias, discretas fibras colágenas estavam organizadamente depositadas, permeadas por discreto a moderado infiltrado inflamatório mononuclear. Aos 30 dias, observou-se persistência do infiltrado inflamatório mononuclear, com padrão microscópico semelhante ao período de 14 dias.

Na proporção de 40% de cimento Portland e 60% AH Plus – No período de 7 dias visualizou-se material granular birrefringente circular, em meio a tecido de granulação ricamente celularizado e infiltrado por moderado infiltrado inflamatório mononuclear. Após 14 dias já se notou deposição organizada das fibras colágenas em meio a discreto infiltrado mononuclear. No período de 30 dias, já se observou a presença de tecido conjuntivo fibroso permeado por eventuais leucócitos mononucleares.

Na proporção de 30% de cimento Portland e 70% AH Plus- Aos 7 dias notou-se tecido de granulação ricamente celularizado permeado por moderado infiltrado mononuclear. Após 14 dias, o tecido apresentou-se em organização, com deposição organizada das fibras colágenas. Aos 30 dias, notou-se presença de tecido conjuntivo fibroso e eventuais células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho.

Na proporção de 20% de cimento Portland e 80% AH Plus – Após 7 dias observou-se a presença de tecido de granulação ricamente vascularizado. Assim como os demais grupos, aos 14 dias a deposição organizada de fibras colágenas foi visualizada, em meio a discreto infiltrado mononuclear e discretas células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho. No período de 30 dias, células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho foram visualizadas em meio a tecido conjuntivo fibroso em organização.

Na proporção de 10% de cimento Portland e 90% AH Plus – No período de 7 dias, focos de degeneração tecidual foram observados em meio aos grânulos do material e tecido de granulação moderadamente infiltrado por leucócitos mononucleares. Aos 14 dias, houve deposição organizada de fibras colágenas em meio a moderado infiltrado inflamatório mononuclear, com persistência de eventuais áreas de degeneração tecidual próximo ao material. Após 30 dias, organização do tecido conjuntivo fibroso foi observada, permeado por discreto infiltrado mononuclear.

Na proporção de 100% – Aos 7 dias notou-se presença de tecido de granulação permeado por moderado infiltrado leucocitário mononuclear. No período de 14 dias também se observou organização do tecido de granulação, bem como eventuais células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho. Aos 30 dias, mesmo em meio à presença do material, houve a organização do tecido conjuntivo fibroso.

Holland et al. (1999) verificaram similaridade entre o hidróxido de cálcio e MTA. Ambos os materiais determinaram a formação de granulações de calcita e uma ponte de tecido mineralizado subjacente. Portanto, sugeriram que o mecanismo de ação de ambos os materiais são semelhantes. O óxido de cálcio do pó do MTA, ao se misturar com a água no processo de manipulação, é convertido em hidróxido de cálcio. Esse último, em contato com os fluídos tissulares, se dissocia em íons cálcio e hidroxila. Os íons cálcio reagindo com o gás carbônico dos tecidos, dará origem as granulações de calcita. Junto a essas granulações, há acúmulo de fibronectina (SEUX et al., 1991), a qual permite adesão e diferenciação celular. Na sequencia, tem-se a formação do tecido mineralizado.

Holland et al. (2001a) avaliaram em tecido subcutâneo de ratos a implantação de tubos de dentina com MTA, cimento Portland e hidróxido de cálcio. Os animais foram sacrificados em 7 e 30 dias e realizados as análises histológicas pela coloração de Von Kossa. Concluíram que o mecanismo de ação das substâncias estudadas é similar. Na presente pesquisa, foi realizado a análise morfológica dos cimentos testados, os quais apresentaram resultados similares.

O cimento AH Plus apresenta boas propriedades biológicas. Oliveira et al. (2010) avaliaram a resposta biológica do cimento AH Plus associado a 5% de hidróxido de cálcio em subcutâneo de ratos. O período de análise foi de 14 dias. Concluíram que a adição de 5% de hidróxido de cálcio ao cimento AH Plus, melhorou o seu comportamento, produzindo reação inflamatória menos severa, quando implantados em subcutâneo de ratos. O cimento associado

ao AH Plus no presente estudo foi o AH Plus, o qual apresenta boa resposta tecidual, o que pode justificar os resultados da presente pesquisa. Outros trabalhos relatam a boa resposta tecidual do cimento AH Plus.

Sousa et al. (2006) avaliaram a biocompatibilidade de 3 cimentos endodônticos, dentre eles, o AH Plus. Realizaram implantes em porcos e avaliaram em 4 e 12 semanas. Concluíram que o cimento Epiphany apresentou melhores resultados de biocompatibilidade, enquanto que o AH Plus, foi moderado. Gomes-Filho et al. (2007) avaliaram a biocompatibilidade de alguns cimentos endodônticos (Endomethasone, Pulp Canal Sealer EWT e AH Plus). Utilizaram tubos de polietileno em subcutâneo de ratos e avaliaram em 3, 7 e 30 dias. O cimento Pulp Canal Sealer EWT apresentou os melhores resultados, enquanto que o Endomethasone e AH Plus resultados semelhantes, mas os três cimentos com padrões semelhantes entre si. Esses resultados corroboram com os resultados da presente pesquisa.

Há necessidade de outras pesquisas para determinar a proporção ideal da associação do AH Plus ao cimento Portland. No presente estudo, verificou-se que as proporções de 80/20 e 70/30 apresentaram-se satisfatórias.

6 CONCLUSÃO

Baseado na metodologia empregada e nos resultados do presente estudo, conclui-se que:

- Quanto a atividade antimicrobiana, a associação do cimento Portland ao AH Plus é uma alternativa para ser utilizado como material retrobturador, nas proporções de 80/20 e 90/10;
- Quanto a reação do tecido subcutâneo de ratos, todos os grupos apresentaram bons resultados;
- Com relação a consistência, as proporções de 80/20 e 70/30 apresentaram-se satisfatórios.

REFERÊNCIAS

- ACCORINTE, M. L. et al. Evaluation of two mineral trioxide aggregate compounds as pulp-capping agents in human teeth. **IntEndod J**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 122-128, Feb. 2009.
- ALFREDO E, et al. Bond strength of AH Plus and Epiphany sealers on root dentine irradiated with 980 nm diode laser. **IntEndod J**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 733-40, Sep. 2008.
- BERNABÉ, P. F. E.; HOLLAND, R. Cirurgia paraendodôntica: como praticá-la com embasamento científico. In: ESTRELA, C. **Ciência endodôntica**. São Paulo: Artes Médicas, 2004. cap.16, p. 657-797.
- BORTOLUZZI, E. A. et al. Sealing ability of MTA and radiopaque Portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. **J Endod**, Chicago, v. 32, n. 9, p. 897-900, Jun 2006.
- BRAMANTE, C.; BERBERT, A. **Cirurgia paraendodôntica**. 2. ed. Ed. Santos: São Paulo, 2003.
- CAMILLERI, J. et al. The constitution of mineral trioxide aggregate. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 21, n. 4, p. 297-303, Apr. 2005.
- CAMILLERI, J. Hydration characteristics of calcium silicate cement with alternatives radiopacifiers used as root-end filling materials. **J Endod**, Chicago, v. 36, n. 3, p. 502-508, Mar 2010.
- CANALDA, C.; PUMAROLA, J. Bacterial grower inhibition produced by root canal sealer cements with a calcium hydroxide base. **OralSurg Oral Med Oral Path**, v. 68, n.1, p. 99-102, 1989.
- CINTRA LT, et al. Evaluation of subcutaneous and alveolar implantation surgical sites in the study of the biological properties of root-end filling endodontic materials. **JAppl Oral Sci**, Bauru, v. 18, n. 1, p. 75-82, Jan-Fev 2010.
- DAMMASCHKE, T. et al. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. **Dent Mater**, Copenhagen, v. 21, n. 8, p. 731-738, Aug. 2005.
- DEAL, B. F. et al. Chemical and physical properties of MTA, Portland cement, and a new experimental material, Fast-Set MTA. **J Endod**, Chicago, v. 28, n. 3, p. 252, Mar 2002./Abstract n.70/
- DUARTE, M. A.; DEMARCHI, A. C. C. O.; MORAES, I. G. Determination of pH and calcium ion release provided by pure and calcium hydroxide-containing AH Plus. **IntEndod J**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 42-45, Jan. 2004.
- DUARTE, M.A.H. et al. pH and calcium release of 2 root-end-filling materials. **OralSurg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod**, Saint Louis, v. 95, n. 3, p. 345-347, Mar. 2003.

ECONOMIDES, N. et al. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. **JEndod**, v.21, n.3, p.122-7, Mar. 1995.

ESTRELA, C.; PESCE, H.F. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions from calcium hydroxide pastes in connective tissue in the dog--Part I. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 1, p. 41-46, 1994.

FERREIRA, M. B. et al. Análise de espectrometria de fluorescência de raios-x e difratometria de raios-x dos cimentos MTA, CPM e CPM Sealer. **Braz Oral Res**, São Paulo, v. 19, p. 165, Supplement (Proceedings of the 22^a Annual SBPqO Meeting) 2005. Resumo Pb 065. Apresentado na 22^a Reunião Anual da SBPqO, Águas de Lindóia, set. 2005.

FUNTEAS, U. R.; WALLACE, J. A.; FOCHTMAN, F. W. A comparative analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. **JEndod**, Chicago, v. 28; n. 3; p. 259; Mar. 2002./Abstract n. 21/

GARTNER, A. H.; DORN, S.O. Advances in endodontic surgery. **Dent Clin North Am**, Philadelphia, v. 36, n. 2, p. 357-378, Apr. 1992.

GOMES-FILHO JE, et al. Evaluation of the biocompatibility of root canal sealers using subcutaneous implants. **J Appl Oral Sci**, Bauru, v. 15, n. 3, p. 186-94, Jun. 2007.

GOMES-FILHO, J. E. et al. Mineral trioxide aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. **JEndod**, Chicago, v. 34, n. 1, p. 62-65, Jan 2008.

GORDUYSUS, M.O.; ETIKAN, I.; GOKOZ, A. Histopathological evaluation of the tissue reactions to Endo-Fill canal sealant and filling materials material in rats. **JEndod**, v.24, n.3, p.194-6, Mar. 1998.

HEDRICH, H.J. History, strains and models. In: KRINKE, G.L. **The Laboratory rat**. London, Academic Press, 2000. Cap. 1, p.3-16.

HOLLAND, R. et al. Agregado de trióxido mineral y cement Portland en la obturación de conductos radiculares de perro. **Endodoncia**, México, v. 19, n. 4, p. 275-280, oct./dic. 2001c.

HOLLAND, R. et al. Calcium salts in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. **J Endod**, Chicago, v. 28, n. 3, p. 173-176, Mar. 2002.

HOLLAND, R. et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 2, p. 109-113, 2001b.

HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **J Endod**, Chicago, v. 25, n. 3, p. 161-166, Mar. 1999.

HOLLAND, R. et al. Reaction of rat tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 1, p. 3-8, 2001a.

ISLAM, I.; CHNG, H. K.; YAP, A. U. X-ray difracion analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. **IntEndod J**, Oxford, v. 39, n. 3, p. 220-225, Mar. 2006.

JACOBOVITZ, M.; DE LIMA, R. K. Treatment of inflamatory internal resorption with mineral trioxide aggregate: a case report. **IntEndod J**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 905-912, Oct. 2008.

KOLOKOURIS, I. Et al. Experimental study of the biocompatibility of a new glass-ionomer root canal sealer (Ketac-Endo). **JEndod**, v.22, n.8, p.395-8, Aug. 1996.

KOLOKOURIS, I. Et al. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. **J Endod**, v.24, n.2, p.82-5, Feb. 1998.

LEE, S. J.; MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. sealing ability of a mineral trioxide aggregate of repair of lateral root perforations. **J Endod**, Chicago, v. 19, n. 11, p. 541-544, Nov. 1993.

LEONARDO MR, et al. Scanning electron microscopy of the apical structure of human teeth. **UltrastructPathol**. v.31, n.4. p. 321-5, Jul-Aug 2007.

LEONARDO, M.R. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. 4 ed. São Paulo. Artes Médicas, 2005.

LUIZ, M. **Avaliação do reparo apical e periapical em dentes de cães com lesão periapical após obturações retrógrada com diferentes materiais retrobturadores**. 2002. 193p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, 2002.

MARCOTTE, L. R.; DOWSON, J.; ROWE, N. H. Apical healing with retrofilling materials amalgam and gutta-percha. **JEndod**, Chicago, v. 2, n. 1, p. 63-65, Feb. 1975.

MENEZES, R. S. et al. Histologic evaluation of pulpotomias in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and with Portland cement as would dressings. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod**, Saint Louis, v. 98, n. 3, p. 376-379, Sept. 2004.

MESSING, J. J. The use of amalgam in endodontic surgery. **J Br EndodSoc**, London, v. 2, n. 1, p. 34-36, Autumm 1967.

MCNAMARA RP, et al. Biocompatibility of accelerated mineral trioxide aggregate in a rat model. **JEndod**, Chicago, v. 36, n. 11, p. 1851-5, Nov. 2010.

NUNES VH, et al. Adhesion of Epiphany and AH Plus sealers to human root dentin treated with different solutions. **Braz Dent J**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 1, p. 46-50,..... 2008.

OLIVEIRA, T. M. et al. Mineral trioxide aggregate as an alternative treatment for intruded permanent teeth, with root resorption and incomplete apex formation. **DentTraumatol**, Copenhagen, v. 24, n. 5, p. 565-568, Oct. 2008.

- OLIVEIRA RL, et al. Influence of calcium hydroxide addition to AH Plus sealer on its biocompatibility. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod**, Saint Louis, v. 109, n. 1, p. 50-4, Jan.2010.
- OLSSON, B.; SLIWKOWSKI, A.; LANGELAND, K. Subcutaneous implantation for the biological evolution of endodontic materials.**JEndod**, v.7, n.8, p.355-69, Aug. 1981.
- ORSTAVICK, D.; MJOR, I.A. Histopathology and X-ray microanalysis of the subcutaneous tissue response to endodontic sealers.**JEndod**, v.14, n.1, p.13-23, Jan. 1988.
- PACE, R; GIULIANI, v; PAGAVINO, G. Mineral trioxide aggregate as repair material for furcal perforation: case series. **J Endod**, Chicago, c. 34, n. 9, p. 1130-1133; Sept. 1975.
- PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review—Part I: Chemical, Physical, and Antibacterial Properties. **J Endod**, Chicago, v. 36, n.1, p. 16-27, Jan 2010.
- PETRUCCI, E. G. R. **Concreto de cimento Portland**. 13. ed. São Paulo: Globo, São Paulo, 1998.
- PUMAROLA, M. et al. Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. **J Comp Path**, v. 105, n.3, p. 279-86, 1991.
- PUMAROLA, J. et al. Antimicrobial activity of seven root canal sealers. Results of agar diffusion and agar dilution tests. **OralSurg Oral Med Oral Path**, v. 74, p.216-20, 1992.
- PHILLIPS, J.M. Rat connective tissue response to hollow polyethylene tube implants. **J CanadDentAss**, v.33, n.2, p.59-64, 1967.
- RODRIGUEZ SOSA, S. A. **Reação histopatológica do tecido conjuntivo do dorso de ratos irradiado com laser de CO2 ou de Er:YAG**. Araraquara, 2004. 98p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- RUD, J.; ANDREASSEN, J. O.; JENSEN, J. E.A follow-up study of 1000 cases treated by endodontic surgery. **Int J Oral Surg**, Copenhagen, v. 4, n. 1, p. 215-228, Feb. 1972.
- SAIDON, J. et al. Tissue reaction to implanted mineral trioxide aggregate or Portland cement. **J Endod**, Chicago, v. 28, n. 3, p. 247, Mar 2002. /Abstract n.52/
- SEUX, D. et al. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. **Arch Oral Biol**. v. 36, n. 2, p. 117-128, Jan./June 1991.
- SOUSA CJ, et al. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH Plus, EndoREZ, and Epiphany root canal sealers.**JEndod**, Chicago, v. 32, n. 7, p. 656-62, Jul. 2006.
- SONG, J. S. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod**, Saint Louis, v. 12, n. 6, p. 809-815, Dec. 2006.

SRINIVASAN, V.; WATERHOUSE, P.; WHITWORTH, J. Mineral trioxide aggregate in paediatric dentistry. **Int Paediatr Dent**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 34-47, Jan. 2009.

STANFORD, J.w. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. **Int Endod J**, v.30, n.2, p.140-88, June 1980.

STANLEY, H.R. Biological evaluation of dental material. **Int Dent J**, v.42, n.1, Feb. 1992.

TANOMARU-FILHO, M. Capacidade seladora de diferentes cimentos endodônticos em obturações retrógradas. **Rev Fac Odontol Lins**, Lins, v. 2, p. 58-61, 1998.

TORABINEJAD, M. et al. Physical and chemical properties of a new root-end-filling material. **J Endod**, Chicago, v. 21, n. 7, p. 349-353, July 1995.

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**, Chicago, v. 19, n. 12, p. 591-595, Dec. 1993.

TORNECK, C.D. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. **Oral Surg**, v.21, n.3, p.379-87, Mar. 1966.

TORNECK, C.D. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. **Oral Surg**, v.24, n.5, p.674-83, Nov. 1967.

VASCONCELOS, B. C. **Avaliação de algumas propriedades físico-químicas de cimentos retorturadores à base de agregado trióxido mineral e de um cimento epóxico experimental**. 2006. 162p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2006.

VIVAN, R.R. et al. Evaluation of radiopacity of some commercial and experimental root-end filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, Saint Louis, v. 108, n. 12, p. 35-38e, Mar. 2009.

VIVAN, R.R. et al. Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, Saint Louis, v. xx, n. x, p. xx, 2010

YALTIRIK, M. et al. Reaction of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. **J Endod**, v.30, n.2, p.95-9, Fer. 2004.

ZANONI, E.M.S. et al. Espaços vazios nas obturações endodônticas. **RGO**, v.36, n.3, p.232-9, maio/jun. 1988.

ZMENER, O.; GUGLIELMOTTI, M.B.; CABRINI, R.L. Tissue response to an experimental calcium hydroxide-based endodontic sealer: a quantitative study in subcutaneous connective tissue of the rat. **Endod Dent Traumatol**, v.6, n.2, p.66-72, Apr. 1990.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

USC UNIVERSIDADE
SAGRADO
CORAÇÃO
Líderes com coração

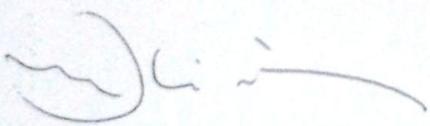
PRPPG
Pró-reitoria
de Pesquisa e
Pós-graduação

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIFICADO

Baseado em parecer competente este Comitê de Ética em Pesquisa analisou o Projeto "AVALIAÇÃO DA REAÇÃO DO TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS À IMPLANTAÇÃO DO CIMENTO PORTLAND ASSOCIADO AH PLUS EM DIFERENTES PROPORÇÕES", Protocolo nº 147/11, tendo como responsável o Pesquisador **RODRIGO RICCI VIVAN** e o considerou **APROVADO**.

Bauru, 24 de junho de 2011.



Prof. Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond
Presidente Comitê de Ética em Pesquisa – USC