

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

PEDRO EMANUEL CABRERA BOCARDE MOTTA

**ANÁLISE DA REAÇÃO TECIDUAL APÓS IMPLANTE DE
DOIS CIMENTOS ENDODÔNTICOS EM TECIDO
SUBCUTÂNEO DE RATOS.**

BAURU
2015

PEDRO EMANUEL CABRERA BOCARDE MOTTA

**ANÁLISE DA REAÇÃO TECIDUAL APÓS IMPLANTE DE
DOIS CIMENTOS ENDODÔNTICOS EM TECIDO
SUBCUTÂNEO DE RATOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de bacharel em
Odontologia sob a orientação do Prof. Dr.
Fernando Accorsi Orosco

BAURU
2015



ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ata de Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de Pedro Emanuel Bocarde Cabrera Motta.

Ao dia dezessete de novembro de dois mil e quinze, reuniu-se a banca examinadora do trabalho apresentado como Trabalho de Conclusão de Curso em Odontologia de PEDRO EMANUEL BOCARDE CABRERA MOTTA, intitulado: **“Análise da reação tecidual após implante de dois cimentos endodônticos em tecido subcutâneo de ratos.”** Compuseram a banca examinadora os professores Dr. Fernando Accorsi Orosco (orientador), Dra. Andréia Aparecida da Silva e Dr. Guilherme Ferreira da Silva. Após a exposição oral, o candidato foi arguido pelos componentes da banca que se reuniram, e decidiram, APROVAR, com a nota 10,0 a monografia. Para constar, fica redigida a presente Ata, que aprovada por todos os presentes, segue assinada pelo Orientador e pelos demais membros da banca.

F. Orosco

Dr. Fernando Accorsi Orosco (Orientador)

Andréia Silva

Dra. Andréia Aparecida da Silva (Avaliador 1)

Guilherme F. Silva

Dr. Guilherme Ferreira da Silva (Avaliador 2)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	06
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	08
3 OBJETIVO.....	14
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
5 RESULTADOS.....	23
6 DISCUSSÃO.....	25
7 CONCLUSÕES.....	28
REFERENCIAS.....	29

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a reação em tecido subcutâneo de ratos causado pela implantação de tubos de polietileno contendo os cimentos Sealer 26 e um cimento experimental, à base de hidróxido de cálcio. Assim, 24 ratos da linhagem Wistar, divididos em três grupos de 8 animais cada, de acordo com o período experimental (15, 30 e 60 dias), tiveram 4 tubos de polietileno implantados no tecido subcutâneo do dorso, sendo 2 contendo o cimento Sealer 26 e 2 o cimento experimental. A guta-percha foi colocada na outra extremidade dos tubos e serviu como controle. Os animais foram sacrificados de acordo com cada período experimental e todo o processamento histológico foi realizado, até a obtenção das lâminas. Cinco imagens de cada caso foram capturadas utilizando o Software Image Pro-plus versão 4.5 (Media Cybernetics, Inc.) e um microscópio no aumento de 20x previamente calibrado. Todas as imagens foram capturadas aleatoriamente na periferia do espaço onde estava o tubo de polietileno. Foram avaliadas a quantidade de células inflamatórias e o número de fibroblastos presentes. Os resultados indicaram que o cimento experimental apresentou reação inflamatória menor quando comparado ao cimento Sealer 26 em todos os períodos, especialmente no período de 60 dias e, também, uma quantidade maior de fibroblastos presentes, com significância estatística (Teste T) para o período de 30 dias.

Palavras-chave: Células inflamatórias. Fibroblastos. Cimentos endodônticos. Reação tecidual.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the reaction in subcutaneous tissue of rats caused by implantation of polyethylene tubes containing Sealer 26 and an experimental sealer with calcium hydroxide. Thus, 24 Wistar rats were divided into three groups of 8 animals each, according to the experimental period (15, 30 and 60 days) and had 4 polyethylene tubes implanted in the subcutaneous tissue of the back, with 2 containing Sealer 26 and 2 experimental cement. The gutta-percha was placed on the other end of the tubes and served as control. The animals were sacrificed under each experimental period and the whole histological process was performed, to obtain the samples. Five images of each case were captured using Image Pro-Plus software version 4.5 (Media Cybernetics, Inc.) and a microscope at 20x increase calibrated. All images were captured randomly on the outskirts of the area where was the polyethylene pipe. They evaluated the number of inflammatory cells and the number of fibroblasts present. The results indicated that the experimental sealer showed lower inflammatory reaction when compared to Sealer 26 in all periods, especially in the period of 60 days and also a greater amount of present fibroblasts, with statistical significance (t-test) for the 30 days period.

Keywords: Inflammatory cells. Fibroblasts. Endodontic sealers. Tissue reaction.

1 INTRODUÇÃO

A grande maioria das obturações ainda é realizada pela associação entre cones de guta-percha e cimento (LEONARDO, LEAL, 1998). O cimento endodôntico apresenta como funções principais, na obturação, o preenchimento dos espaços anatômicos que o material sólido (guta-percha) não foi capaz de atingir, a lubrificação e o auxílio no assentamento dos cones, além de atuar como agente de união entre os cones e as paredes do canal radicular. Mesmo sendo considerado como coadjuvante no processo de obturação do sistema de canais radiculares, este pode influenciar tanto positiva quanto negativamente no resultado final do tratamento endodôntico (ÖRSTAVIK, 1982, ÖRSTAVIK, 1988, ERIKSEN, ÖRSTAVIK, KERKES, 1988.)

Vários são os tipos de cimentos endodônticos existentes e utilizados para a obturação do sistema de canais radiculares. Pode-se citar: cimentos à base de óxido de zinco e eugenol, à base de resinas plásticas, à base de ionômero de vidro, à base de MTA, à base de polímero de mamona, à base de silicón e os cimentos com hidróxido de cálcio (LEONARDO, LEAL, 1998).

Por muitos anos os cimentos obturadores mais utilizados foram os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol. Tais cimentos apresentam boas propriedades físico-químicas, tais como impermeabilidade, constância de volume, solubilidade e tempo de presa, entre outras (BENATTI, STOLF, RUHNKE, 1978); no entanto, as suas propriedades biológicas não se mostraram satisfatórias. O lançamento dos cimentos com hidróxido de cálcio, segundo LEONARDO, LEAL, (1998), veio de encontro aos anseios de todos aqueles que desejavam um material que apresentasse as boas propriedades biológicas do hidróxido de cálcio e, paralelamente, possuísse requisitos físico-químicos que oferecessem um bom selamento do canal radicular, juntamente com os cones de guta-percha. Os principais representantes desses cimentos são o Sealapex e o Sealer 26.

O Sealer 26 é um cimento à base de resina epóxica que contém hidróxido de cálcio. Suas principais características são: boa capacidade de selamento (SIQUEIRA JR.; GARCIA, 1994, SIQUEIRA JR. Et al., 1995A, SIQUEIRA JR; FRAGA, GARCIA, 1995B, SIQUEIRA JR., ROÇAS,

VALOIS, 2001) baixa solubilidade quando em contato com os tecidos periapicais (Fidel et al., 1994, Leonardo; Leal, 1998, Lopes; Siqueira Jr., 2011) e boa resposta tecidual (Leonardo; Leal, 1998).

Em 1984, baseando-se no cimento AH26, MORAES, após a realização de 30 experimentos, onde testou vários radiopacificadores e vários tipos de resina epóxica chegou a uma formulação, cujo elemento radiopacificador escolhido foi o carbonato de bismuto. A mesma foi submetida a testes de infiltração marginal, radiopacidade, alteração dimensional, tempo de presa e alteração de cor. A partir dessa formulação, uma nova formulação experimental, denominada de Formulação 1, foi desenvolvida, utilizando tungstato de cálcio, hidróxido de cálcio e hexametilenotetramina. Essa formulação também passou por testes físico-químicos, apresentando bons resultados. Sendo assim, torna-se válida a realização de testes biológicos desta nova formulação, bem como sua comparação com o cimento Sealer 26, que é reconhecidamente um cimento com boa resposta tecidual e tem seu uso bastante difundido no Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

BERGAMINI, em 1988, avaliou a biocompatibilidade dos cimentos Endométhasone, Fill canal, Sealer 26 e Sealapex implantando tubos de polietileno, contendo esses cimentos, em tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos. A análise foi feita após os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias. Todos os cimentos mostraram-se irritantes e as reações inflamatórias variaram conforme o cimento e o período analisado. O Sealer 26 e o Sealapex foram os cimentos menos irritantes, o Endométhasone provocou uma reação inflamatória intermediária e o Fill canal foi o cimento mais irritante.

SOARES et al, em 1990, avaliaram a resposta dos tecidos periapicais de dentes de cães após obturação com cimentos Sealapex, CRCS e óxido de zinco e eugenol. Para esse estudo foram instrumentados 120 canais, os quais tiveram o forame apical arrombado e o batente apical realizado com uma lima do tipo K número 45. Após a instrumentação os canais foram obturados pela técnica da condensação lateral utilizando cones de guta-percha e os cimentos em teste. Os animais foram mortos após 30 e 180 dias de pós-operatório. Na análise microscópica os resultados não mostraram diferenças entre as respostas teciduais provocadas pelos cimentos, quando os mesmos atingiam o limite do batente apical, observando-se a presença de um tecido conjuntivo com células inflamatórias crônicas. Houve deposição de tecido mineralizado nas paredes laterais dos canais radiculares, levando ao fechamento do forame apical, independentemente do cimento utilizado.

PASCON et al, em 1991, testaram a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos AH26, Kerr Pulp Canal Sealer e Kloropercha. Foram utilizados 21 babuínos, dos quais, 121 dentes tiveram os canais instrumentados e obturados com cones de guta-percha e com os cimentos em teste. Os períodos de avaliação foram 1, 7, 30, 365, 730 e 1095 dias. Os resultados revelaram que, nos períodos iniciais, 1 e 7 dias, o AH 26 causou uma inflamação severa, o Kerr Pulp Canal Sealer uma reação moderada e a Kloropercha uma reação suave. Nos períodos mais tardios, 2 e 3 anos, o AH 26 apresentou reação suave, o Kerr Pulp Canal Sealer reação, ainda, moderada e a Kloropercha uma reação severa.

ORSTAVIK; MJÖR, em 1992, avaliaram os efeitos dos cimentos AH 26, Endométhasone, Kloropercha e Procosol considerando as análises radiográfica e microscópica. Os canais radiculares com polpa viva de dentes de macacos foram instrumentados e obturados pela técnica da condensação lateral com guta-percha e com os cimentos em experimentação. Radiograficamente, após 6 meses, foi possível observar patologia periapical em 6 raízes de um total de 60. Microscopicamente, também, após 6 meses, foram observadas algumas inflamações periapicais. Das 9 raízes obturadas com AH 26, 2 apresentaram inflamações moderadas e 1, inflamação suave; no grupo obturado com Endométhasone, de 7 raízes, 1 apresentou inflamação moderada; no grupo obturado com Kloropercha, das 7 raízes, 1 apresentou inflamação suave e no grupo do Procosol, das 7 raízes, 1 apresentou inflamação suave também.

Em 1993, BARBOSA; ARAKI; SPANGBERG avaliaram a citotoxicidade dos cimentos Fill canal, N-Rickert, pasta F. S. e Sealer 26 em culturas de células de tecido conjuntivo, utilizando o contato direto e indireto, pelo método da liberação de cromo. Todos os cimentos mostraram-se muito tóxicos, tanto em relação ao contato direto como ao indireto. O Sealer 26 mostrou-se um pouco menos tóxico, principalmente, no método do contato indireto.

Em 1995, ECONOMIDES et al. estudaram a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos Sealapex, CRCS, AH 26 e Roth 811, e, também, a influência desses materiais sobre a concentração de cálcio e zinco nos tecidos de ratos. Para esse estudo foram utilizados 75 ratos (machos e fêmeas), nos quais foram implantados tubos de teflon contendo os cimentos a serem testados. Os animais foram mortos nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Para a análise da concentração de cálcio e zinco nos tecidos, 25 ratas, do período de 7 dias tiveram o cérebro, fígado, rim e útero removidos. Após análise microscópica, os resultados evidenciaram que o AH 26, no período de 7 dias, foi o cimento que apresentou maior irritabilidade ao tecido, mas a reação inflamatória foi diminuindo com o passar do tempo. Já os cimentos Roth 811 e o Sealapex induziram reações inflamatórias moderadas e severas e o CRCS uma reação suave para moderada. Em relação à concentração de zinco e cálcio encontrada nos tecidos, foi possível verificar que os cimentos CRCS e o Roth 811 causaram uma redistribuição de zinco e o AH 26 alterou o conteúdo de cálcio em alguns órgãos.

Também, em 1995, GEROSA et al. avaliaram a citotoxicidade dos cimentos endodônticos AH 26, Kerr Pulp Canal Sealer, Rocanal – R2, Rocanal – R3, Bioseal e Endométhasone em culturas de células de fibroblastos humanos, usando a medição espectrofotométrica após o período de 24, 48 e 72 horas. O AH 26 apresentou citotoxicidade severa, os cimentos Kerr Pulp Canal Sealer e Endométhasone uma baixa toxicidade e os demais provocaram reações de moderada a severa, dependendo do período observado.

VALERA, em 1995, avaliou a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos Sealapex, Apexit, Sealer 26 e Ketac Endo, bem como a capacidade de selamento apical e, ainda, realizou a análise ultra-estrutural dos cimentos utilizando a técnica de microscopia de força atômica (AFM). Para o estudo da biocompatibilidade foram implantados tubos de polietileno em tecido subcutâneo de ratos e os animais foram mortos após 14 e 90 dias. A avaliação microscópica mostrou que todos os cimentos apresentaram uma diminuição na reação inflamatória após 90 dias, exceto o Sealapex; o Sealer 26 foi o cimento que apresentou menor resposta inflamatória nos dois períodos de avaliação. Aos 90 dias houve uma diminuição fibroblástica em todos os grupos experimentais e a proliferação angioblástica só diminuiu nos grupos do Sealer 26 e Ketac Endo.

BEZERRA et al, em 1997, injetaram os cimentos Sealapex, CRCS, Apexit e Sealer 26 no tecido conjuntivo subcutâneo e na cavidade peritoneal de camundongos para avaliar a resposta inflamatória provocada por esses materiais. No teste do tecido subcutâneo os cimentos foram manipulados e, após a presa, foram triturados, peneirados e 1mg foi diluído em 1mL de PBS e 0,1mL da suspensão e, então, injetados. Após o período de 2, 4, 8 e 16 dias os animais foram mortos e os fragmentos onde foram injetadas as substâncias foram removidos para análise microscópica. No outro teste, a suspensão foi injetada na cavidade peritoneal e, após os períodos de 6 e 24 horas e 5 e 15 dias, os animais foram mortos, a cavidade peritoneal foi lavada com 2mL de PBS, que após a colheita, sofreu processamento para análise no microscópio óptico. No teste do tecido conjuntivo subcutâneo foi possível observar, na fase inicial, uma grande quantidade de leucócitos polimorfonucleados para todos os cimentos e com uma expressão maior no CRCS e Apexit. Em alguns casos havia um tecido necrótico circundando o infiltrado. Na fase intermediária houve

uma redução do número de polimorfonucleados, principalmente, em relação ao cimento Sealapex, seguido pelo CRCS, Apexit e Sealer 26. Na fase tardia havia poucos neutrófilos, mas, uma intensa reação granulomatosa, ainda, era observada e os espécimes, referentes aos cimentos Sealer 26, CRCS e Apexit, apresentavam áreas com necrose. O teste da cavidade peritoneal mostrou que todos os cimentos testados provocaram um aumento significativo na quantidade de neutrófilos. No período de 6 horas o Apexit induziu o aparecimento do maior número de neutrófilos, seguido pelo Sealer 26, Sealapex e CRCS. Após 24 horas o Sealapex, CRCS e Apexit induziram uma neutrofilia menor. Nos demais períodos houve uma redução no número de neutrófilos, sem diferença entre os grupos.

Também, em 1997, LEONARDO et al avaliaram a reação tecidual na região periapical provocada pelos cimentos Sealapex, CRCS, Apexit e Sealer 26 após biopulpectomia e obturação de canais de dentes de cães. Oitenta raízes de dentes de 4 cães tiveram seus canais instrumentados e, então, obturados com cones de guta-percha e com os cimentos em teste. Decorridos 180 dias os animais foram mortos, as raízes removidas para análise microscópica. O Sealapex foi o cimento que melhor se comportou, permitindo deposição de tecido mineralizado, promovendo selamento completo do forame apical. Com o CRCS o selamento do forame foi parcial, identificou-se a presença e infiltrado inflamatório moderado. Os cimentos Apexit e Sealer 26 não promoveram selamento apical, na maioria dos casos. O infiltrado inflamatório observado foi considerado severo nos espécimes do Apexit e leve ou ausente nos casos tratados com o Sealer 26.

AZAR et al, em 2000, avaliaram a citotoxicidade dos cimentos AH Plus, AH 26 e óxido de zinco e eugenol utilizando o método de análise de citotoxicidade do vermelho neutro em culturas de células nos períodos de 1, 4, 8, 24, 48 horas, 5 dias, 1, 2, 4 e 5 semanas. O óxido de zinco e eugenol provocou um efeito citotóxico detectado logo na 1ª hora, que permaneceu alto até o final do experimento. O efeito citotóxico apresentado pelo AH 26 durou 1 semana, reduzindo com o passar do tempo. O AH Plus mostrou efeito citotóxico nos períodos iniciais, não sendo mais detectado, após 4 horas.

FIGUEIREDO et al, em 2001, avaliaram a resposta tecidual dos cimentos N-Rickert, Fill Canal, AH 26 e Sealer 26 após a injeção dos mesmos

na submucosa oral de coelhos e em implantes de tubos de polietileno, em tecido subcutâneo dos mesmos animais. A análise microscópica foi feita após os períodos de 30, 60 e 90 dias. O Fill Canal foi o cimento mais irritante, provocando uma reação inflamatória de alta intensidade, seguido pelo N-Rickert e AH 26 e por último o Sealer 26, que provocou uma reação de baixa intensidade.

Ainda em 2001, SACOMANI et al avaliaram as reações provocadas pelos cimentos Sealer 26 e Sealer 26 modificado, após instrumentação e obturação de canais de dentes de cães. Após o período de 180 dias os animais foram mortos e os tecidos envolvidos analisados microscopicamente. Os resultados evidenciaram que não houve diferença entre os cimentos, sendo ambos bem tolerados pelos tecidos periapicais de cães.

HUANG et al, também em 2002, avaliaram a citotoxicidade dos cimentos endodônticos N2, Endométhasone, Canals, AH 26, AH Plus, Sealapex. Realizaram o teste em culturas de células do ligamento periodontal humano e células V79 de Hamster Chineses, nos períodos de 1, 2, 3 e 7 dias. Todos os cimentos foram tóxicos, sendo o N2 o mais agressivo seguido pelo, Endométhasone, AH 26, AH Plus, Canals e, por último, o Sealapex.

BERNÁTH; SZABÓ, em 2003, avaliaram a reação tecidual provocada pelos cimentos: Apexit, Endométhasone, AH26 e cimento de Grossman após instrumentação e obturação de canais em dentes de macacos, considerando o período de 60 dias. Os autores concluíram que os cimentos Apexit e o cimento de Grossman possuem uma boa compatibilidade tecidual, já o Endométhasone e o AH26 apresentaram uma reação inflamatória mediana, porém, quando os cimentos eram extravasados, mesmo os que apresentaram bons resultados, promoveram uma reação inflamatória mais significativa.

TANOMARU FILHO et al, em 2005, avaliaram o comportamento biológico após o implante intra-ósseo em tíbia de ratos dos materiais: Sealer 26 com consistência pesada, Sealapex com óxido de zinco, MTA. Foram utilizados 20 ratos, nos quais foram feitas cavidades, com broca, da região anterior de cada tíbia de cada pata posterior, e essas cavidades foram preenchidas com os materiais em teste. Após os períodos de 7, 15, 30 e 60 dias, os animais foram mortos e as tíbias analisadas microscopicamente. Foram avaliados os seguintes parâmetros: extensão de neo-formação óssea, infiltração inflamatória

e deposição de fibras colágenas na região adjacente ao material. Os autores concluíram que todos os materiais testados apresentaram uma boa biocompatibilidade, promovendo uma deposição óssea após 30 e 60 dias, sem diferença estatisticamente significantes entre eles.

TANOMARU FILHO et al, em 2006, avaliaram a evolução do reparo periapical, em dentes de cães, com lesões induzidas, após retrobturação com os cimentos: Sealer 26 com consistência pesada, Sealapex com óxido de zinco, MTA. Para isso foram utilizadas 48 raízes de cães que tiveram lesões periapicais induzidas e, posteriormente, para serem retrobturados com os materiais em teste, os canais foram obturados. Após 180 dias, os animais foram mortos e a análise microscópica da região periapical foi realizada. Não houve diferença estatisticamente significativa, no reparo das lesões, quando comparados os diferentes materiais.

3 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a reação causada por implantes contendo os cimentos endônticos Sealer 26 e um cimento experimental em tecido subcutâneo de ratos nos períodos de 15, 30 e 60 dias. Foram avaliadas a quantidade de células inflamatórias presentes em cada período e, também, a quantidade de fibroblastos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 MATERIAL

Serão utilizados os seguintes materiais:

1.1 Cimento Endodôntico Sealer 26

1.2 Cimento experimental, com os seguintes componentes:

Pó:

1.2.1 Tungstato de cálcio;

1.2.2 Hidróxido de cálcio;

1.2.3 Hexametilenotetramina.

Líquido: Resina éter de Bisfenol A diglicidil

4.2 MÉTODO

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, sob o número 017/2011.

4.2.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos da linhagem Wistar (*rattus norvegicus*) adultos jovens, com peso entre 200 e 300 gramas, oriundos do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, mantidos em gaiolas plásticas coletivas, identificadas conforme os períodos experimentais, higienizadas, colocadas em ambiente iluminado naturalmente, recebendo água *ad libitum* e alimentação constituída de ração comercial balanceada.

4.2.2 Tubos de polietileno

Foram utilizados 96 tubos de polietileno (Embramed Ind. Com. Ltda., São Paulo-SP-Brasil) com 1,5mm de diâmetro interno, 2,0mm de diâmetro

externo 10,0mm de comprimento, que foram fechados em uma das extremidades por guta-percha (Figura 1), que serviu como controle. Previamente ao procedimento cirúrgico, os tubos foram desinfetados numa solução de glutaraldeído 2,2%, onde foram mantidos por um período de 12 horas, sendo, posteriormente, lavados em água corrente e secos.



Figura 1: Tubos de polietileno com uma das extremidades preenchida com guta-percha.

4.2.3 Processo de anestesia dos animais

Os animais foram pré-anestesiados com cloridrato de ketamina, Dopalen[®] (Sespo Indústria e Comércio Ltda, Div. Vetbrands Saúde Animal, Paulínia-SP-Brasil) solução anestésica, na dose de 0,025ml/100g, intramuscular (IM), na face posterior da coxa (Figura 2). Após um período de latência de 2 a 5 minutos, a anestesia foi complementada com a associação cloridrato de ketamina, Dopalen[®] e cloridrato de xilazina, Anasedan[®] (Sespo Indústria e Comércio Ltda, Div. Vetbrands Saúde Animal, Paulínia-SP-Brasil), relaxante muscular, analgésico e sedativo, na dosagem de 0,05ml/100g, também intramuscular (IM). O tempo de trabalho para cada animal foi de aproximadamente 40 minutos. A conduta anestésica seguiu a tabela peso/dosagem estabelecida pelo Biotério da FOB-USP.



Figura 2: Anestesia do animal

4.2.4 Grupos experimentais

Os 24 ratos foram divididos em três grupos com oito animais cada de acordo com os períodos experimentais, que foram de 15, 30 e 60 dias. Cada animal recebeu 4 implantes, sendo dois com o cimento experimental e dois com o cimento Sealer 26. Como dito anteriormente, a guta-percha utilizada para o selamento de uma das extremidades dos tubos de polietileno serviu como controle.

4.2.5 Procedimentos cirúrgicos

Após a pesagem e a anestesia dos animais, foi realizada a tricotomia da região dorsal dos mesmos (Figura 3), que foi enxaguada com uma gaze embebida em água para eliminar possíveis resíduos de pelos. Em seguida, foi realizada a antissepsia da região com solução de iodopovidona (Rioquímica Indústria Farmacêutica Ltda, São José do Rio Preto-SP-Brasil).



Figura 3: Tricotomia da região dorsal do animal.

Foram realizadas duas incisões longitudinais na região mediana do dorso de cada animal, uma anterior e outra posterior, utilizando-se lâmina de bisturi nº 15. Os tubos, contendo o cimento e a guta-percha, foram introduzidos com um trocarte (Figura 4A e B). Os implantes foram depositados a uma profundidade de, aproximadamente, 20mm da borda da incisão, com o intuito de prevenir uma possível expulsão ou mobilidade dos mesmos.



Figura 4A e B: A: Incisões longitudinais no dorso do animal; B: colocação do tubo de polietileno com cimento e guta-percha.

Cada animal recebeu quatro implantes, sendo, de um lado, dois implantes contendo o cimento experimental e, do outro, dois implantes contendo o cimento Sealer 26. As bordas das incisões foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon – Johnson&Johnson, Produtos Profissionais Ltda, São José dos Campos-SP-Brasil), montados em agulhas atraumáticas.

Os animais foram colocados em gaiolas identificadas, de acordo com o período experimental, e acompanhados até a total recuperação pós-anestesia.

Foi realizada a observação diária do comportamento dos animais, até completarem os períodos experimentais determinados (15, 30 e 60 dias), com a finalidade de se evitar ocorrências que possam comprometer o experimento.

4.2.6 Morte dos animais e remoção dos tecidos

Decorridos os períodos experimentais, os animais foram mortos com uma dose excessiva de anestésico injetada diretamente no coração. Em seguida, os implantes foram localizados por meio da palpação e uma nova tricotomia da região dorsal foi feita. A área contendo cada implante foi dissecada, abrangendo suficiente tecido normal circunjacente. Essas peças foram distendidas em papel cartão e, em seguida, foram fixadas em solução de formol a 10% por um período de sete dias, em frascos individuais, com sua respectiva identificação.

4.2.7 Processamento laboratorial

Após o período de fixação das peças (7 dias), as mesmas foram lavadas em água corrente por 24 horas; em seguida, foi eliminado o tecido adjacente em excesso, deixando a amostra com um formato retangular e tecido suficiente para a realização da avaliação microscópica. Na extremidade que serviu como controle foi realizado um corte, com o objetivo de identificar ambos os materiais. Para a remoção dos tubos de polietileno, foi feita uma incisão longitudinal em um dos lados do tubo com uma lâmina de bisturi número 15, sem que as extremidades sejam atingidas, criando um espaço por onde se introduziu uma sonda interproximal número 1 para desprender a cápsula fibrosa e remover o tubo de polietileno sem dilacerar a cápsula. Isto feito, as peças foram colocadas em álcool 70% por período de 24 horas.

Decorridas as 24 horas em álcool 70%, as peças foram desidratadas, sendo imersas em três banhos de álcool etílico absoluto. Posteriormente, realizou-se a diafanização com três banhos de xilol, e as peças foram incluídas em parafina. Após a obtenção dos blocos de parafina as peças foram cortadas em micrótomo (Leica – Jung RM2045 – Leica Instruments GmbH D 6907-Alemanha) de modo semi-seriado com 5µm de espessura. Os cortes foram

realizados numa orientação longitudinal do tubo com o objetivo de poder coletar em uma mesma lâmina a guta-percha (controle) e o cimento a ser analisado. A técnica da coloração utilizada foi a da Hematoxilina e Eosina (H.E.).

4.2.8 Obtenção das imagens

Cinco imagens de cada caso foram capturadas utilizando o Software Image Pro-plus versão 4.5 (Media Cybernetics, Inc.) e um microscópio no aumento de 20x previamente calibrado (Figuras 5 a 10). Todas as imagens foram capturadas aleatoriamente na periferia do espaço onde estava o tubo de polietileno.

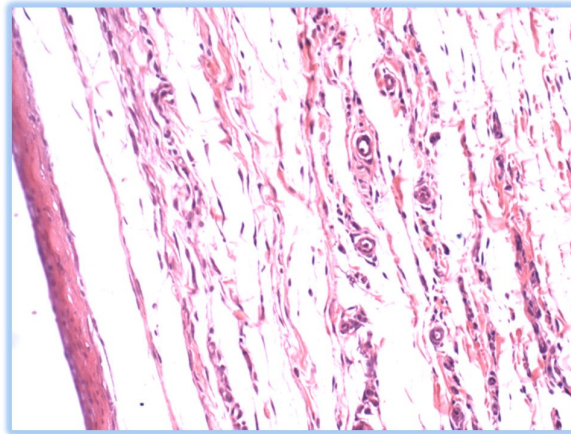


Figura 5: Reação tecidual ao cimento Sealer 26 – 15 dias.

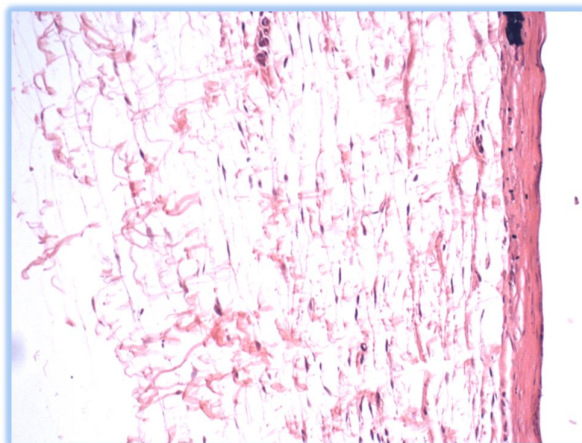


Figura 6: Reação tecidual ao cimento Sealer 26 – 30 dias.

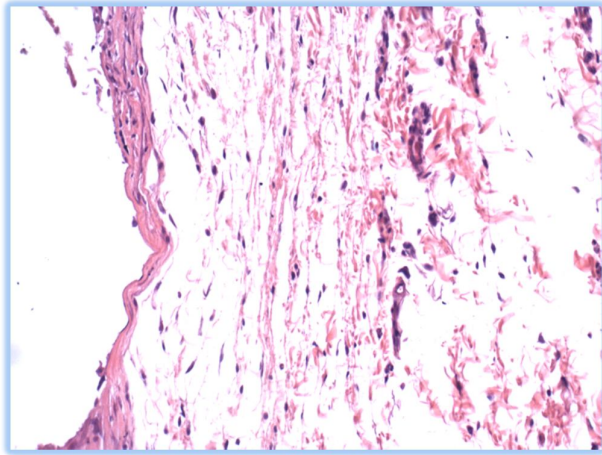


Figura 7: Reação tecidual ao cimento Sealer 26 – 60 dias.

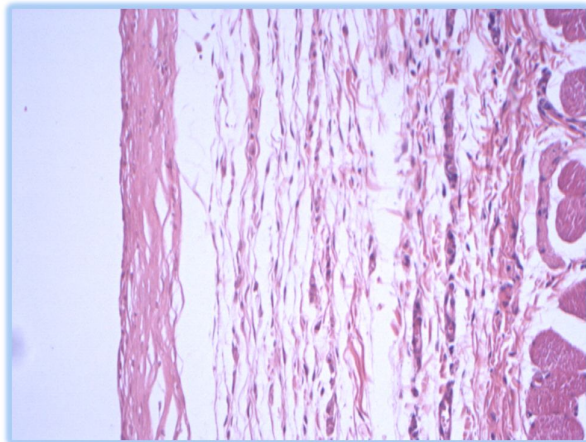


Figura 8: Reação tecidual ao cimento experimental – 15 dias.

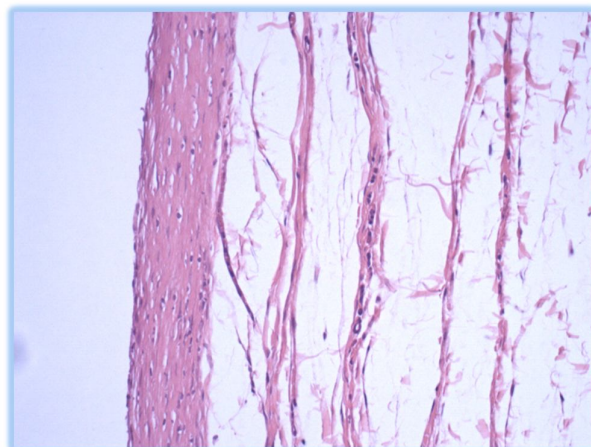


Figura 9: Reação tecidual ao cimento experimental – 30 dias

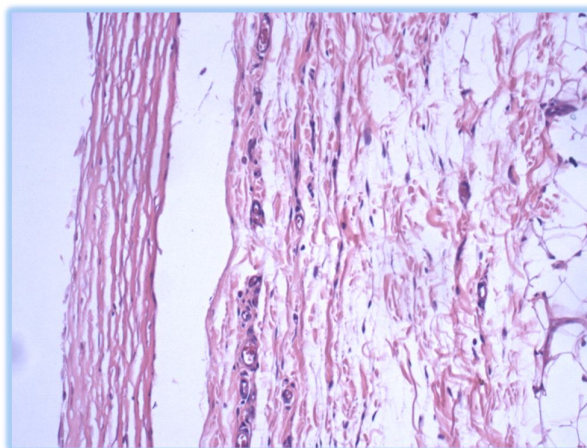


Figura 10: Reação tecidual ao cimento experimental – 60 dias

Foram selecionados 5 campos de cada lâmina. A área avaliada media $1024,768\mu\text{m}^2$. Foi realizado a histomorfometria das seguintes estruturas: Células inflamatórias e fibroblastos (Figura 11). Todas as contagens foram anotadas em planilha de Excel.

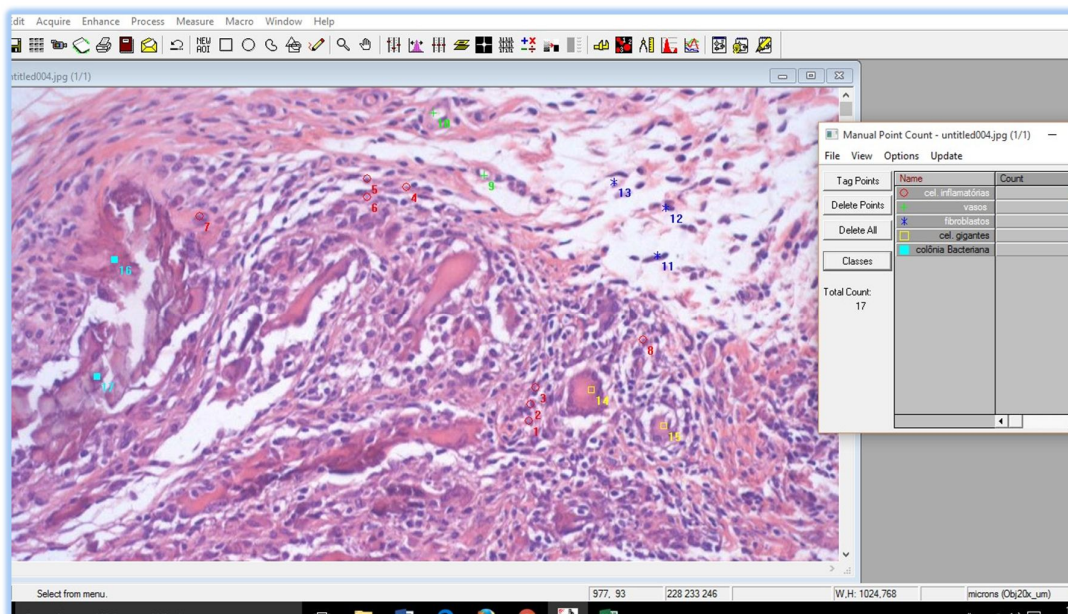


Figura 11: Análise histomorfométrica das estruturas selecionadas de cada caso. Com o software foi possível contar todas as estruturas em um mesmo momento.

5 RESULTADOS

Quando comparamos a quantidade de células inflamatórias presente nos dois tipos de cimento estudados não observamos significância estatística para os 3 períodos avaliados, porém observamos uma menor quantidade de células inflamatórias para o período de 60 dias (Figuras 12).

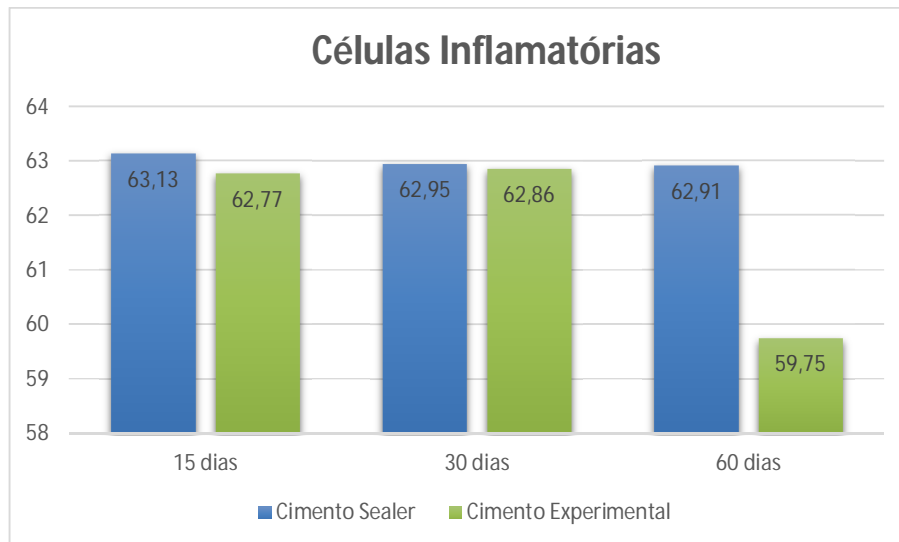


Figura 12: Células Inflamatórias por período e nos 2 diferentes cimentos estudados.

Em relação à presença de fibroblastos, observamos que no grupo de 30 dias do cimento Sealer 26 uma menor quantidade de fibroblastos, que foi significativa quando comparado ao cimento experimental ($p= 0,0004$). As Figuras 13 e 14 mostram essas diferenças entre a presença de fibroblastos.

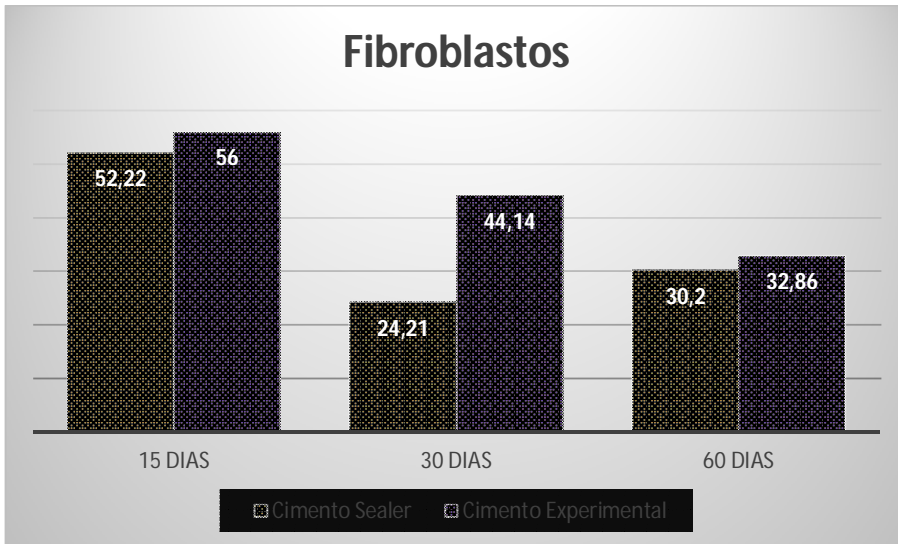


Figura 13: Contagem dos fibroblastos nos cimentos estudados

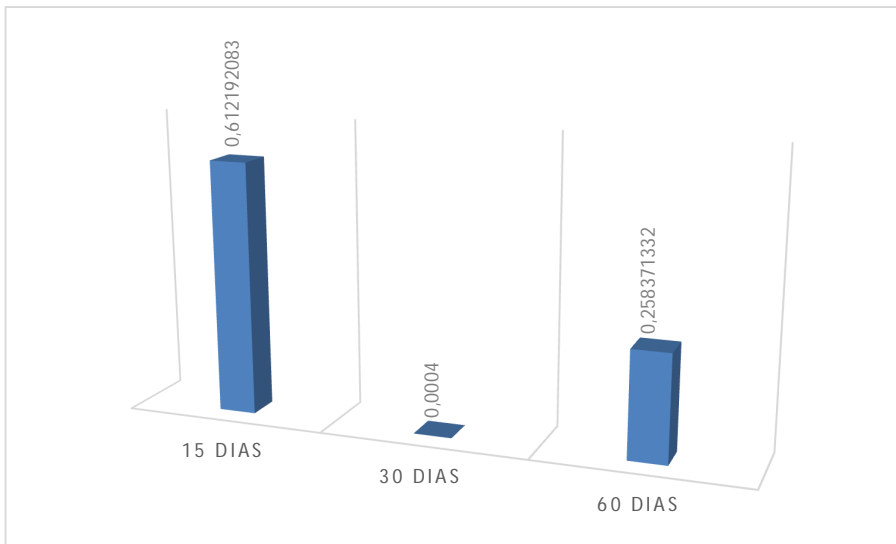


Figura 14: Teste T mostrando resultado estatisticamente significativo em relação ao cimento sealer no período 30 dias.

6 DISCUSSÃO

A busca por materiais obturadores, em especial os cimentos endodônticos, que apresentem boas propriedades mecânicas, físico-químicas e biológicas, é algo constante ainda na Endodontia.

Com a intenção de encontrar substâncias que atendessem a todas essas propriedades, aproximadamente 250 materiais já foram usados, não só em sua forma pura, como também em associações (KUTTLER, 1961). Contudo, atualmente a grande maioria das obturações, ainda, é realizada pela associação entre cones de guta-percha e cimento, embora os cones Resilon sejam considerados como uma alternativa à guta-percha. Com relação ao cimento, o mesmo apresenta como funções principais, na obturação, o preenchimento dos espaços anatômicos que o material sólido (guta-percha ou resilon) não foi capaz de atingir, a lubrificação e o auxílio no assentamento dos cones, além de atuar como agente de união entre os cones e as paredes do canal radicular. Mesmo sendo considerado como coadjuvante no processo de obturação do sistema de canais radiculares, tem sido mostrado que os cimentos podem influenciar tanto positiva quanto negativamente no resultado final do tratamento endodôntico (ÖRSTAVIK, 1982, ÖRSTAVIK, 1983, ERIKSEN; ÖRSTAVIK; KERKES, 1988).

Assim, na busca por substâncias menos irritantes aos tecidos vivos periapicais, diversas metodologias tem sido empregadas, destacando-se a colocação de implantes destes materiais em tecido ósseo (BHAMBANI; BOLANOS, 1993,) ou no tecido subcutâneo dos animais (KAPLAN et al., 2003, BATISTA et al., 2006) A metodologia utilizada neste estudo fez uso da colocação de tubos de polietileno em tecido subcutâneo de ratos, contendo a guta-percha em uma das extremidades, que serviu como controle, e na outra extremidade o cimento a ser analisado, no caso o Sealer 26 e a formulação experimental 1. Essa metodologia, segundo alguns autores (BATISTA et al., 2006, CUNHA et al., 2011, ZMENER et al., 2012, SIMSEK et al., 2015) é bastante utilizada e permite a avaliação da reação inflamatória, por meio da contagem de células, de forma eficaz e confiável.

O Sealer 26, fabricado pela Dentsply Indústria e Comércio Ltda (Petrópolis, RJ) é um cimento à base de resina epóxica que contém hidróxido de cálcio. Suas principais características são: boa capacidade de selamento (SIQUEIRA JR.; GARCIA, 1994, SIQUEIRA JR. et al, 1995a, SIQUEIRA JR.; FRAGA; GARCIA, 1995b, SIQUEIRA JR.; ROÇAS; VALOIS, 2001) baixa solubilidade quando em contato com os tecidos periapicais (FIDEL et al., 1994, LEONARDO; LEAL, 1998, LOPES; SIQUEIRA JR., 2004) e boa resposta tecidual (LEONARDO; LEAL, 1998). O principal problema apresentado por esse cimento é o escurecimento que ele sofre após a presa. (DAYAN et al, 1983, VAN DER BURGT; PLASSCHAERT, 1985, PARSONS; WALTON; WILLIANSO, 2001).

O cimento experimental utilizado neste trabalho, desenvolvido por MORAES, em 1984, e modificado por OROSCO; MORAES, 2013, foi idealizado, previamente, buscando solucionar o problema que o Sealer 26 tem, isto é, não sofrer escurecimento após a presa. Em estudos avaliando esta e outras propriedades físico-químicas, verificou-se que esta formulação não sofre escurecimento após a presa, sendo avaliada até 6 meses após, sem alteração de cor. Assim, decidiu-se realizar a avaliação de suas propriedades biológicas.

De acordo com os resultados, ao se comparar a presença de células inflamatórias em tecido subcutâneo de ratos, verificou-se que o Sealer 26 apresentou uma presença maior destas células em todos os períodos avaliados (15, 30 e 60 dias), sendo que no período de 60 essa diferença foi maior. Isto indica que o processo inflamatório provocado pelo cimento experimental é menor e menos intenso do que o provocado pelo cimento Sealer 26. Estudos como os de VALERA et al., 1995 e TANOMARU et al., 2005, indicam que o Sealer 26 é um cimento considerado pouco irritante, que causa pouca resposta inflamatória; já no trabalho de CUNHA et al., 2011, o Sealer 26 foi o cimento que apresentou maior reação inflamatória em tecido subcutâneo de ratos após o período de 21 dias. Assim, considerando que o cimento experimental teve um resultado semelhante ao Sealer 26 nos períodos de 15 e 30 dias e melhor quando comparado ao período de 60 dias, pode-se dizer que tal cimento também pode ser considerado pouco irritante aos tecidos, causando baixa intensidade de resposta inflamatória.

Com relação ao número de fibroblastos presentes, verificou-se que em todos os períodos o número destas células foi maior para o cimento experimental, em especial no período de 30 dias, em que houve diferença estatisticamente significativa. Em um estudo realizado por BARBOSA, ARAKI e SPANGBERG, em 1993, os autores avaliaram a citotoxicidade de diversos cimentos endodônticos, dentre eles o Sealer 26, utilizando como células-alvo para comparação os fibroblastos do ligamento periodontal. Verificaram que o Sealer 26 foi o cimento que apresentou o melhor resultado, ou seja, o que permitiu a maior presença destas células. Em outro estudo, de VALOIS, AZEVEDO, já em 2008, foi analisado o efeito de três cimentos endodônticos (AH Plus, Endofill e Sealer 26) em fibroblastos de ratos. Verificaram que todos os cimentos atuaram inibindo a proliferação celular de uma maneira dose-dependente, ou seja, quanto mais cimento em contato com as células, maior a inibição da sua proliferação. Comparando os resultados obtidos neste estudo, pode-se dizer que o cimento experimental apresenta um grau de citotoxicidade inferior ao Sealer 26, já que a proliferação de fibroblastos foi maior para este cimento em todos os períodos, em especial no período de 30 dias.

CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos na pesquisa, pode-se concluir que o cimento experimental apresentou reação inflamatória menor quando comparado ao cimento Sealer 26, especialmente no período de 60 dias e, também, uma quantidade maior de fibroblastos presentes, com significância estatística para o período de 30 dias. Desta forma, mais estudos podem e devem ser realizados, em comparação com outros tipos de cimentos endodônticos, para se avaliar o quão biocompatível é o cimento experimental testado neste trabalho, pensando numa futura aplicação clínica do mesmo.

REFERÊNCIAS

AZAR, N.G.; HEIDARI, M.; BAHRAMI, Z.S.; SHOKRI, F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. **J Endod.**, v.26, n.8, p.462-5, Aug 2000.

BARBOSA, S.V.; ARAKI, K.; SPÅNGBERG, L.S. Cytotoxicity of some modified root canal sealers and their leachable components. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.75, n.3, p.357-61, Mar 1993.

BERGAMINI, C. B. J. **Estudo da biocompatibilidade dos cimentos obturadores Sealer 26, Endométhasone e Fill Canal em subcutâneo de camundongos.** Bauru, 1988. 72p. Monografia (Especialização em Endodontia), Universidade de São Paulo.

BHAMBHANI, S.M.; BOLANOS, O.R. Tissue reactions to endodontic materials implanted in the mandibles of guinea pigs. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.76, p.493-501, 1993.

BATISTA, R.F.C.; HIDALGO, M.M.; HERNANDES, L.; CONSOLARO, A.; VELLOSO, T.R.G.; CUMAN, R.K.N. et al. Microscopic analysis of subcutaneous reactions to endodontic sealer implants in rats. **J Biomed Mater Res A.**, v.81, n.1, p.171-7, Apr 2007.

BENATTI, O.; STOLF, W.L.; RUHNKE, L.A. Verification of the consistency, setting time, and dimensional changes of root canal filling materials. **Oral Surg**, v.46, n.1, p.107-13, Jul 1978.

BERNÁTH, M.; SZABÓ, J. Tissue reaction initiated by different sealers. **Int Endod J.**, v.36, n.4, p. 256-61, Apr 2003.

BEZERRA, L. A. et al. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealer. **J Endod.**, v.23, n.2, p.86 - 90, Feb 1997.

CUNHA, S.A.; RACHED JR, F.J.A.; ALFREDO, E.; LEÓN, J.E.; PEREZ, D.E.C. Biocompatibility of sealers used in apical surgery: a histological study in rat subcutaneous tissue. **Braz Dent.**, v.22, n.4, p.299-305, 2011.

DAYAN, D. et al. Tooth discoloration – extrinsic and intrinsic factors. **Quintessence Int**, v.14, n.2, p.195-9, Feb 1983.

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. **J Endod.**, v.21, n.3, p.122-7, Mar 1995.

ERIKSSEN, H.M., ÖRSTAVIK, D., KEREKES, K. Healing of apical periodontitis after endodontic treatment using three different root canal sealers. **Endod Dent Traumatol**, v.4, n.3, p.114-7, Jun 1988.

FIDEL, R.A.S et al. Adhesion of calcium hydroxide-containing root canal sealers. **Braz Dent J**, v.5, n.1, p.53-7, 1994.

FIGUEIREDO, J.A.; PESCE, H.F.; GIOSO, M.A.; FIGUEIREDO, M.A.S. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. **Int Endod J.**, v.34, p.377-85, 2001.

GEROSA, R.; MENEGAZZI, G.; BORIN, M.; CAVALLERI, G. Citotoxicity evaluation of six root canal sealers. **J Endod.**, v.21, n.9, p.446-8, Sep 1995.

HUANG, F. M. et al. Cytotoxicity of resin, zinc oxide eugenol, and calcium hydroxide based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. **Int Endod J.**, v.35, n.2, p.153-8, Feb. 2002.

KAPLAN, A.E.; ORMAECHEA, M.F.; PICCA, M.; CANZOBRE, M.C.; UBIOS, A.M. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. **Int Endod J.**, v.36, p.527-32, 2003.

KUTTLER, Y. **Endodoncia prática.** México, Alpha, 1961.

LEONARDO, M.R., LEAL, J.M. **Endodontia – tratamento de canais radiculares.** 3ª ed., São Paulo: Panamericana, 1998.

LEONARDO, M.R.; SILVA, L.A.; UTRILLA, L.S.; ASSED, S.; ETHER, S.S. Calcium hydroxide root canal sealers-histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. **J Endod.**, v.23, n.7, p.428-32, Jul 1997.

LOPES, H.P., SIQUEIRA JR., J.F. **Endodontia – biologia e técnica.** 2ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004.

MORAES, I.G. **Propriedades físicas de cimentos epóxicos experimentais para obturação de canais radiculares, baseados no AH26.** 1984. 149p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

OROSCO, F.A.; MORAES, I.G. **Avaliação de algumas propriedades, físico-químicas e biológica de um novo cimento obturador de canal radicular, baseado no cimento AH26.** 2013. 29p. Relatório final de Pós-doutorado – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

ÖRSTAVIK, D. Physical properties of root canal sealers: measurement of flow, working time and compressive strength. **Int Endod J.**, v.16, n.3, p.99-107, Mar 1983.

ÖRSTAVIK, D. Seating of gutta-percha points: effect of sealers with varying film thickness. **J Endod.**, v.8, n.5, p.213-8, May 1988.

ORSTAVIK, D.; MJÖR, I.A. Usage test of four endodontic sealers in Macaca fascicularis monkeys. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.73, n.3, p.337-44, Mar 1992.

PARSONS, J.R.; WALTON, R.E.; WILLIANSO, L.R. In vitro longitudinal assessment of coronal discoloration from endodontic sealers. **J Endod**, v.27, n.11, p.976-8, Nov 2001.

PASCON, E.A.; LEONARDO, M.R.; SAFAVI, K.; LANGELAND, K. Tissue reaction to endodontic materials; methods, criteria, assessment, and observations. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.72, n.2, p.222-32, Aug 1991.

SACOMANI, G. R. R. et al. Comportamento dos tecidos periapicais de dentes de case após a obturação de canal com os cimentos Sealer 26 e Sealer 26 modificado. **J Bras Endo.**, v.2, n.5, p.145-52, Abr./Jun. 2001.

SIMSEK, N.; AKINCI, L.; GECOR, O.; ALAN, H.; AHMETOGLU, F.; TASLIDERE, E. Biocompatibility of a new epoxy resin-based root canal sealer in subcutaneous tissue of rat. **Eur J Dent.**, v.9, n.1, p.31-5, Jan-Mar 2015.

SIQUEIRA JR., J.F., GARCIA, P.F. Avaliação in vitro das propriedades seladoras de três cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio. **Rev Bras Odontol**, v.51, p.37-40, 1994.

SIQUEIRA JR., J.F. et al. Análise comparativa in vitro do selamento apical produzido por cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio e de óxido de zinco e eugenol. **Rev Clin Odontol**, v.1, p.14-7, 1995a.

SIQUEIRA JR., J.F.; FRAGA, R.C.; GARCIA, P.F. Evaluation of sealing ability, pH and flow rate of three calcium hydroxide-based sealers. **Endod Dent Traumatol**, v.11, n.5, p.225-8, Oct 1995b.

SIQUEIRA JR., J.F.; ROÇAS I.N.; VALOIS, C.R. Apical sealing ability of five endodontic sealers. **Aust Endod J**, v.27, n.1, p.33-5, Jan 2001.

SOARES, I.; GOLDBERG, F.; MASSONE, E.J.; SOARES, I.M. Periapical tissue response to two calcium hydroxide-containing endodontic sealers. **J Endod.**, v.16, n.4, p.166-9, Apr 1990.

TANOMARU FILHO, M. et al. Biocompatibilidade de materiais utilizados em obturações retrógradas após implantes intra-ósseo em rato. **Braz Oral Res.**, v.19, p.15, Sep. 2005. Supplement. Abstract n. Ic 040.

TANOMARU FILHO, M. et al. Evaluation of periapical repair following retrograde filling with different root-end filling materials in dog teeth with 120 periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v.122, n.1, p.127-132, Jul 2006.

VALERA, M.C. Estudo da compatibilidade biológica de alguns cimentos endodônticos à base de hidróxido de cálcio e um cimento de ionômero de vidro. **Avaliação do selamento marginal apical e análise morfológica por microscopia de força atômica.** 1995 Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

VALOIS, C.R.; AZEVEDO, R.B. Cell-cycle deregulation induced by three different root canal sealers in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.106, n.5, p.763-7, Nov 2008.

VAN DER BURGT, T.P.; PLASSCHAERT, J.M. Tooth discoloration induced by dental materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.60, n.6, p.666-9, Dec 1985.

ZMENER, O.; MARTINEZ LALIS, R.; PAMEIJER, C.H.; CHAVES, C.; KOKUBU, G.; GRANA, D. Reaction of rat subcutaneous connective tissue to a mineral trioxide aggregate-based and a zinc oxide and eugenol sealer. **J Endod.**, v.38, n.9, p.1233-8, Sep 2012.