

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

Claudia Caroline Bósio

**ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE DOS CIMENTOS
IROOT SP, MTA FILLAPEX, DIAROOT E MTA BRANCO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Endodontia.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Elena Riet Correa Rivero

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Antunes Bortoluzzi

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Bósio, Claudia Caroline

Análise da biocompatibilidade dos cimentos iROOT SP, MTA FILLAPEX, DIAROOT E MTA BRANCO [dissertação] / Claudia Caroline Bósio ; orientadora, Elena Riet Correa Rivero ; co-orientador, Eduardo Antunes Bortoluzzi. - Florianópolis, SC, 2012.

92 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Implantação subcutânea. 3. Materiais endodônticos. 4. Biocompatibilidade . I. Rivero, Elena Riet Correa. II. Bortoluzzi, Eduardo Antunes . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Claudia Caroline Bósio

**ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE DOS CIMENTOS
iROOT SP, MTA FILLAPEX, DIAROOT E MTA BRANCO**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 18 junho de 2012.

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Elena Riet Correa Rivero
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Wilson Tadeu Felipe
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho
Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho

A Deus

A quem devo a vida, obrigada por me fortalecer a cada dia e me guiar em todos os passos! Obrigada por não me deixar desistir nos momentos de desânimo e por me provar que nem a morte nem as adversidades poderão separar-me de ti.

Aos meus pais

Marlene e Cláudio, pela educação, dedicação, carinho e amor incondicional. Obrigada por me ensinarem o valor do estudo, da dedicação, da honestidade e perseverança! Obrigada por muitas vezes abrirem mão de seus próprios sonhos em prol dos meus. Amo-os incondicionalmente!

À minha mãe, meu exemplo de vida e coragem, a quem eu jamais conseguirei retribuir tamanho amor e dedicação! Obrigada por não medir esforços na realização dos meus sonhos e na busca da minha felicidade! Sei que quando estou feliz, estás feliz também! Agradeço a Deus diariamente por esta dádiva que é ter você como minha mãe! Perto ou longe, estaremos sempre conectadas pelo coração!

Ao meu pai, pelo apoio e torcida incansáveis, pela eterna preocupação em me proporcionar sempre o melhor! Obrigada pela dedicação e por estar sempre torcendo pela minha felicidade, contribuindo para a realização dos meus sonhos e para a minha satisfação profissional e pessoal!

Ao meu irmão

Matheus, pelo apoio e incentivo a cada decisão, pelas brigas e gargalhadas, críticas e elogios, e pela ajuda prontamente prestada sempre que necessitei! Conte sempre comigo, em todos os momentos!

A minha avó Santina (in memoriam)

Minha “nona” querida, que certamente estaria muito orgulhosa neste momento tão especial da minha vida, se estivesse aqui presente! Sei que estás me protegendo e rogando por mim lá do céu! Sinto imensamente a sua falta!

Ao meu amor

Pedro, pessoa fantástica com quem experimento a cada dia o valor imensurável do amor! Obrigada por transformar cada minuto juntos em momentos inesquecíveis! Obrigada por dividir sonhos e angústias comigo, pelas palavras de incentivo, por me “aturar” reclamando das incontáveis lâminas deste trabalho e por respeitar o meu “tempo” de solidão e concentração para elaboração desta dissertação. Obrigada por me aconselhar, apoiar, dar sermões, paparicar e me amar! Enfim, obrigada por estar decididamente ao meu lado, sempre! Te amo!

Com muito amor, admiração, carinho e gratidão, dedico este trabalho a vocês, pessoas mais importantes da minha vida!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Elena Rjet-Correa Rjvero**, pelos ensinamentos, pela paciência, simplicidade, disponibilidade, amizade e confiança em mim depositadas durante a realização desta pesquisa! Obrigada por desenhar cada célula para que eu pudesse identificá-las quando as encontrasse nas lâminas! Obrigada pelos momentos em que perdeu a paciência comigo, mas ficou em silêncio; saiba que sem a sua dedicação talvez eu teria desistido no meio do caminho... Obrigada pelos conselhos, sugestões, e por ter contribuído para o meu crescimento intelectual neste período. Você será sempre uma referência para mim!

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Eduardo Antunes Bortoluzzi** pelas dicas, disponibilidade, comprometimento, dedicação, simplicidade e amizade! Você é um exemplo de garra, competência, perfeição e amor pela Endodontia!

Às minhas colegas de mestrado **Gabriela, Josiane, Maybell e Luciane**. Obrigada pela amizade, pelos momentos divertidos e pelo carinho. Jamais esquecerei este período juntas!

À minha companheira de pesquisa e colega de mestrado **Gabriela Santos Felipe**, obrigada pelos momentos divertidos, pela amizade, bom humor e pelo trabalho dividido durante toda a nossa pesquisa!

Aos professores **Wilson Tadeu Felipe e Mara Cristina Santos Felipe** obrigada pelos ensinamentos preciosos, pelo incentivo constante, pela coragem e determinação, independentemente das adversidades! Agradeço especialmente ao prof. Felipe, pelo exemplo de sabedoria, didática e clareza inconfundíveis. Obrigada pelas exigências, pelas cobranças, questionamentos, e por exigir sempre o melhor de todas nós, mestrandas, incentivando-nos a buscar sempre a perfeição em tudo o que nos dispusemos a fazer!

Às queridas professoras da disciplina de Endodontia:

Ana Maria Hecke, sempre pronta a nos auxiliar e aconselhar no que for preciso! Obrigada pela sua amizade, pela confiança, conselhos e pelo exemplo de sucesso e simplicidade!

Cleonice da Silveira Teixeira, pela amizade, momentos divertidos, longas conversas e pelo exemplo de dedicação, competência e paciência!

Maria Helena Pozzobon, pela simplicidade, doçura e carinho, pelos quitutes deliciosos e inconfundíveis! Obrigada pelo privilégio de ter convivido e aprendido muito com cada uma de vocês durante esses dois anos!

Aos meus tios **Evanita (in memorian) e Rogério Marcon**, pelo apoio e incentivo à realização deste Mestrado; vocês serão sempre meus exemplos de força, luta e fé! À minha tia Evanita, especialmente, pela vontade de viver e

coragem invejável! Obrigada pelos sorrisos contagiantes mesmo quando a sua vontade era de chorar... Obrigada por dividir comigo um pouquinho do imenso amor de seu coração!

Ao meu eterno mestre e querido amigo **Satio Inagaki**, obrigada por me apoiar e torcer pela minha felicidade, sempre! Obrigada pelos conselhos, pelas oportunidades, confiança e pela amizade sincera e leal!

Aos amigos **Olímpio, Diva e família**, pelo carinho, preocupação, pelos deliciosos almoços de domingo e pelas conversas! Obrigada por terem sido a minha família aqui em Florianópolis! Sei que poderei contar com todos vocês, sempre!

À minha prima e amiga **Alessandra Marcon**, por estar sempre presente em minha vida, mesmo longe dos olhos! Obrigada pelo carinho, pelas orações, pela preocupação e por me ouvir nos momentos de dúvida, tristeza e felicidade!

Às minhas queridas amigas de Cascavel, **Anne Caroline, Athena, Daniela, Giolana, Lucila, Márcia, Saula e Tatiana**, que sempre me confortaram, incentivaram, torceram, se orgulharam e me ajudaram durante esses dois anos longe de casa! Obrigada pela amizade de todas!

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal **Filipe Modolo, Filipe Daniel, Liliâne Janete Grando e Maria José Meurer**, por me receberem diariamente em sua sala e no laboratório de Patologia Bucal com muito carinho, simplicidade e bom humor! Obrigada pelos momentos agradáveis, pelas dúvidas esclarecidas, pela amizade, auxílio e confiança! Vocês são pessoas muito especiais que guardarei sempre com muito carinho no coração!

Ao funcionário da disciplina de Endodontia **Sérgio**, pela amizade e valioso auxílio durante a realização deste trabalho, principalmente em relação aos cuidados com os animais desta pesquisa, preocupação com as mestrandas e pelos inúmeros momentos agradáveis que compartilhamos!

Às funcionárias da disciplina de Endodontia **Jackeline e Marly**, pelo convívio praticamente diário, pela disponibilidade e auxílio sempre que necessitamos!

Aos bolsistas da disciplina de Patologia Bucal **Elis Angela Batistella, Bianca Bianco, Caroline Alboleda, Fabio Cardoso e Suzely Dias** pelo auxílio no processamento histológico e montagem das diversas lâminas deste trabalho! Obrigada pela simplicidade, disponibilidade, dedicação e carinho de todos!

Ao prof. **Adair Roberto Soares Santos e sua equipe de Pós-Graduandos em Neurociências**, pelo espaço físico gentilmente cedido para o condicionamento dos animais utilizados nesta pesquisa. Obrigada pela disponibilidade, respeito e paciência comigo e minha colega Gabriela!

Ao prof. **João Eduardo Gomes-Filho**, pela generosidade ao esclarecer dúvidas relacionadas a esta pesquisa e por ter prontamente aceito o convite para participar desta banca, contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

Ao prof. João Luiz Dornelles Bastos, responsável pela análise estatística desta pesquisa, obrigada pela paciência e disponibilidade, pelo seu precioso tempo gentilmente cedido, tornando possível a interpretação estatística dos resultados deste trabalho!

À Capes, pela concessão de bolsa de estudo durante o período desta pesquisa.

À UFSC e a todos que contribuíram - direta ou indiretamente - para a realização deste trabalho e para o meu crescimento pessoal e intelectual, neste período.

“Nossas dúvidas são traidoras, e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, por medo de tentar.”

(William Shakespeare, 1604)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade dos cimentos iRoot SP, MTA FILLAPEX, DiaRoot e MTA BRANCO através da análise da reação tecidual estimulada após a implantação de tubos de dentina preenchidos com os cimentos, em tecido subcutâneo de ratos. Foram utilizados 32 ratos, divididos em 4 grupos, de acordo com os materiais e períodos experimentais de 7, 15, 30 e 90 dias. Quatro tubos de dentina preenchidos com os cimentos e um quinto tubo, deixado vazio (controle), foram implantados no tecido subcutâneo de cada um dos ratos em 5 sítios, na região dorsal. Passados os períodos experimentais, foi realizada a eutanásia dos animais e os tubos e tecidos circundantes foram excisados em bloco. Após a fixação do tecido, os tubos de dentina foram cuidadosamente removidos e o tecido foi processado para inclusão em parafina. Foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina para observação da morfologia tecidual, e os seguintes critérios foram avaliados: organização, composição e espessura da cápsula conjuntiva, intensidade da inflamação, presença de células gigantes multinucleadas (CGMNs), macrófagos, necrose tecidual e neovascularização. Também foi realizada a técnica de Von Kossa para avaliação de estruturas calcificadas, bem como análise em microscópio de luz polarizada, para observação de cristais de calcita. Os dados foram submetidos ao teste exato de Fischer e/ou Kruskal-Wallis a um nível de significância de 5%. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação à intensidade da reação inflamatória, espessura e organização da cápsula conjuntiva nos diferentes períodos experimentais. Foram observadas diferenças significativas em relação à presença de CGMNs, macrófagos e necrose tecidual, sendo estas variáveis mais frequentes nos espécimes do MTA FILLAPEX e no iRoot SP. Em todos os grupos foi observada positividade ao Von Kossa, relacionada às áreas de necrose, porém, não foram detectados cristais de calcita. Todos os cimentos demonstraram biocompatibilidade, visto que as reações teciduais foram atenuando-se ao longo do tempo, exceto o MTA FILLAPEX que, aos 90 dias, ainda estimulou uma reação inflamatória moderada no tecido adjacente, necrose tecidual, presença de células gigantes multinucleadas e macrófagos fagocitando partículas do cimento.

Palavras-chave: MTA. Cimentos endodônticos. Biocompatibilidade. Tecido subcutâneo. Inflamação. Calcificação.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the biocompatibility of the sealers iRoot SP, MTA FILLAPEX, DiaRoot BioAggregate and MTA BRANCO through the analysis of the tissue reaction stimulated by the implantation of dentin tubes filled with the sealers in the subcutaneous tissue of rats. We used 32 rats, divided into 4 groups of 8 animals, according to the materials and experimental periods of 7, 15, 30 and 90 days. Four dentin tubes, each filled with one of the experimental sealers and a fifth tube, left empty (control), were implanted in the subcutaneous tissue of each rat at 5 locations equidistant, in the dorsal area. After the experimental periods, the animals were submitted to euthanasia and the tubes with surrounding tissue were excised. After fixation, the dentin tubes were carefully removed and the surrounding tissue was processed for paraffin inclusion. Staining was performed with Hematoxylin and Eosin to evaluate tissue morphology using the following criteria: organization, composition and thickness of the connective capsule, intensity of inflammation, presence of multinucleated giant cells, macrophages, tissue necrosis and neovascularization. Von Kossa staining was also performed as well as microscope evaluation under polarized light to observe calcite crystals. Data were analysed using Fisher's exact test and the Kruskal-Wallis test at a significance level of 5%. There was no statistically significant difference among the scores of different groups regarding the intensity of the inflammatory reaction, thickness or organization of the connective capsule in the different experimental periods. Statistically significant differences were observed between the groups regarding the presence of multinucleated giant cells, macrophages and necrosis, more visible in MTA FILLAPEX and iRoot SP. In all groups were observed Von Kossa positivity related to areas of necrosis but calcite crystals were not detected. All sealers were found to be biocompatible since the tissue reactions decreased during the experimental periods, except in the case of MTA FILLAPEX that, at 90 days, still stimulated a moderate inflammatory reaction in the adjacent tissue, tissue necrosis, presence of multinucleated giant cells and macrophages phagocytosing particles of the sealer.

Keywords: MTA. Endodontic sealers. Biocompatibility. Subcutaneous tissue. Inflammation. Calcification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise da reação inflamatória e fenômenos correlatos para os grupos Controle, MTA e DiaRoot _____	59
Figura 2: Análise da reação inflamatória e fenômenos correlatos para os grupos Fillapex e iRoot SP _____	61
Figura 3: Tubos de dentina após preparo e esterilização _____	77
Figura 4: Cimentos utilizados no experimento _____	78
Figura 5: Sequência de implantação cirúrgica nos ratos _____	80
Figura 6: Sequência de remoção dos tubos e tecidos circundantes _____	81
Figura 7: Programa Image J e escala para medição das cápsulas _____	85
Figura 8: Traçado para configuração do programa Image J _____	86
Figura 9: Seleção da área da cápsula a ser mensurada em micrômetros _____	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Porcentagem das amostras em cada grupo de acordo com as variáveis em estudo, no período de 7 dias _____	49
Quadro 2: Porcentagem das amostras em cada grupo de acordo com as variáveis em estudo, no período de 15 dias _____	51
Quadro 3: Porcentagem das amostras em cada grupo de acordo com as variáveis em estudo, no período de 30 dias _____	53
Quadro 4: Porcentagem das amostras em cada grupo de acordo com as variáveis em estudo, no período de 90 dias _____	55
Quadro 5: Correlação entre as variáveis (Teste de Spearman) _____	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de classificação dos níveis de concordância do coeficiente Kappa _____	83
Tabela 2: Índices Kappa Intra e Inter examinadores _____	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CGMNs – células gigantes multinucleadas
MTA – Agregado de Trióxido Mineral
min – minuto
PBS – tampão fosfato salino
HA- hidroxiapatita
h – hora
BA – Bioaggregate
g - grama
mL - mililitro
MTT – methyl thiasolyl tetrazolium
RT-PCR – real time polymerase chain reaction
mm – milímetro
EDTA – ácido etileno diamino tetracético
mg – miligrama
kg – kilograma
CO₂- dióxido de carbono
H&E – hematoxilina e eosina
µm - micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO _____	25
OBJETIVOS _____	36
ARTIGO _____	37
REFERÊNCIAS _____	69
<i>Apêndice – Metodologia Expandida</i> _____	77
<i>Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina</i> _____	89
<i>Anexo B - Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais</i> _____	90
<i>Anexo C -Tabela de Relação Peso/Dosagem para anestesia dos animais</i> _____	91

INTRODUÇÃO

Desde 1993, quando foi citado pela primeira vez, o Agregado de Trióxido Mineral (MTA) vem recebendo destaque e hoje é um dos materiais mais estudados na Endodontia (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993). Inicialmente, foi indicado para selar comunicações entre a cavidade pulpar e o periodonto, especialmente em casos de perfuração radicular (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993; HOLLAND et al., 2001) ou furca (PITT FORD et al., 1995; MAIN et al., 2004). Posteriormente, passou a ser indicado em outras situações clínicas, como: tratamentos conservadores da polpa (PITT FORD et al., 1996; MENEZES et al., 2004; BARRIESHI-NUSAIR & QUDEIMAT, 2006), preenchimento de áreas de reabsorção interna e externa (SCHWARTZ et al., 1999), reparo de fraturas radiculares (TORABINEJAD; CHIVIAN, 1999), retro-obturação (TORABINEJAD et al., 1995), obturação do canal radicular (TORABINEJAD; CHIVIAN; 1999; HOLLAND et al., 1999b), tampão cervical previamente ao clareamento interno (CUMMINGS; TORABINEJAD, 1995; MAH et al., 2003) e tampão apical em dentes com rizogênese incompleta (TORABINEJAD; CHIVIAN, 1999; FELIPPE; FELIPPE; ROCHA, 2006).

O MTA apresenta-se como um pó hidrofílico, composto principalmente por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico e óxido silicato (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993; ASGARY et al., 2009; SARKAR et al., 2005). Há pequenas quantidades de outros óxidos em sua composição, como o óxido de bismuto, adicionado para conferir radiopacidade ao agregado (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993).

Em 1999, a Dentsply (Tulsa Dental, Oklahoma, USA) lançou o MTA no mercado americano, com a coloração cinza e denominado ProRoot. Após 3 anos, a mesma empresa lançou o MTA de coloração branca, comercialmente chamado de ProRoot MTA. A redução da quantidade de alumínio, magnésio e ferro foi responsável pela mudança de cor de cinza para a branca (SARKAR et al., 2005; ASGARY et al., 2005).

No Brasil, o MTA-Angelus cinza foi lançado em 2003 pela empresa Angelus Soluções Odontológicas (Londrina, PR, Brasil) e no ano seguinte, a mesma empresa lançou o MTA branco. A mudança da cor ampliou as indicações clínicas do material para áreas de maior necessidade estética, por exemplo, perfurações em dentes anteriores

(BORTOLUZZI et al., 2006). Outra diferença entre os MTAs cinza e branco é o tamanho de suas partículas, cerca de 8 vezes menores e mais homogêneas no MTA branco (CAMILLERI et al., 2005), conferindo-lhe maior superfície de contato com o líquido utilizado na hidratação e consistência final mais apropriada para inserção no sítio desejado (KOMABAYASHI & SPANGBERG, 2008).

Recomenda-se que a manipulação do pó do MTA, independentemente da marca comercial, seja realizada com água destilada estéril na proporção de 3:1 (TORABINEJAD; WATSON; PITT FORD, 1993). O tempo de presa do material é de 165 min, em média, e é considerado longo (TORABINEJAD et al., 1995), o que representa uma das desvantagens do MTA (KOGAN et al., 2006; BER; HATTON; STEWART, 2007). Segundo a Angelus Soluções Odontológicas, uma nova formulação foi desenvolvida para o MTA Branco, cujo tempo de presa é de 15 min (Angelus bula).

As características físico-químicas do agregado podem ser influenciadas pela proporção pó/líquido utilizada, método de manipulação, tamanho das partículas, meio de armazenamento, pH do meio, tempo decorrido entre a manipulação e emprego, pressão aplicada durante a compactação, umidade e temperatura (TORABINEJAD; WATSON; PITT FORD, 1993; PARIROKH & TORABINEJAD, 2010).

Devido à natureza hidrofílica do MTA, a umidade existente no meio auxilia na sua reação de presa. Isto é interessante porque se pode utilizá-lo na presença de sangue ou outro tipo de fluido (TORABINEJAD et al., 1994; TORABINEJAD et al., 1995; ROY; JEANSONNE; GERRETS, 2001).

Durante a hidratação do MTA há a formação de hidróxido de cálcio e consequente liberação de íons cálcio e hidroxila para o meio, justificando o importante comportamento biológico e sucesso clínico do material (CAMILLERI et al., 2005; HOLLAND et al., 2002). Imediatamente após a manipulação, o MTA apresenta um pH de 10.2 elevando-se para 12.5 após 3 horas (TORABINEJAD et al., 1995; KOGAN et al., 2006; BER; HATTON; STEWART, 2007). Duarte et al. (2003) observaram que mesmo após 168 horas o MTA continua a liberar íons cálcio.

Segundo Tronstad et al. (1981), a partir da difusão dos íons hidroxila ocorre uma elevação do pH do meio, com consequente alcalinização dos tecidos adjacentes, o que favorece o reparo tecidual. Já os íons cálcio liberados pelo material reagem com o tecido

circundante originando cristais, cuja composição e função têm gerado inúmeras discussões em trabalhos publicados.

Após a implantação de tubos de dentina preenchidos com MTA e hidróxido de cálcio em tecido subcutâneo de ratos, Holland et al. (1999a) relataram a formação de cristais resultantes da interação dos íons cálcio liberados pelos materiais, com o gás carbônico do tecido, denominados pelos autores de cristais de carbonato de cálcio (cristais de calcita). Esses cristais foram detectados no interior dos túbulos dentinários e na interface tubo/tecido conjuntivo, apresentando-se birrefringentes à luz polarizada e Von Kossa positivos. Os autores também observaram a presença de um tecido duro basofílico e irregular próximo à entrada dos tubos e adjacente aos cristais de calcita. Este se mostrou altamente positivo à coloração Von Kossa e estava circundado por tecido conjuntivo fibroso e inflamação crônica, considerada leve. Concluíram que o MTA e o hidróxido de cálcio apresentam comportamento biológico semelhante.

Em trabalho *in vitro*, Seux et al. (1991) relataram o acúmulo de fibronectina¹ junto aos cristais de calcita, estimulando a adesão e a diferenciação celular, favorecendo a deposição de tecido mineralizado no local.

Trabalhos recentes mostraram que quando o MTA fica em contato com o tampão fosfato salino (PBS) – solução simuladora do fluido tecidual - ocorre a interação entre os íons cálcio do material e os íons fosfato do fluido, dando origem a cristais ou precipitados. Estes se depositam na superfície do cimento já nas primeiras horas (SARKAR et al., 2005; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009; PARIROKH et al., 2010) e apresentam composição química semelhante à da hidroxiapatita (SARKAR et al., 2005; BOZEMANN; LEMON; ELEAZER, 2006), ou à da apatita carbonatada (TAY et al., 2007; TAY & PASHLEY, 2008; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009).

Sarkar et al. (2005) justificam que o fluido tecidual é rico em íons fosfato e relativamente pobre em carbonato; por isso, há maior probabilidade de que o resultado da interação entre MTA e fluido seja a formação de cristais de hidroxiapatita (HA), e não de calcita, contrariando os achados de Holland et al. (1999a).

Esses cristais depositam-se sobre as fibras colágenas da dentina, funcionando como iniciadores da deposição mineral na interface cimento/dentina, estendendo-se para o interior dos túbulos dentinários,

¹ Pertence a um grupo de moléculas de adesão do substrato, produzida por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais.

formando *tags*. Dessa forma, preenchem os espaços microscópicos entre o MTA e a dentina, (SARKAR et al., 2005; BOZEMANN; LEMON; ELEAZER, 2006; REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009) favorecendo algumas propriedades do material, como: selamento, biocompatibilidade (SARKAR et al., 2005) e resistência à tração (REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009).

Diante destas informações, observou-se que o MTA tem a habilidade de estimular o reparo tecidual e a deposição de tecido mineralizado na interface MTA/dentina (REYES-CARMONA; FELIPPE; FELIPPE, 2009); esse processo foi denominado biomineralização (REYES-CARMONA et al., 2010).

Um material que estimula a deposição de cristais de apatita ou de HA sobre sua superfície é definido como bioativo; ou seja, bioatividade é o termo empregado para definir a capacidade que um material tem de interagir com o tecido vivo, permitindo a sua integração ao ambiente receptor e trazendo efeitos benéficos ao tecido onde é implantado. Na interface biomaterial/tecido ocorrem diversas reações bioquímicas e biofísicas que resultam na formação de uma camada de cristais de apatita ou HA (HENCH, 1991).

Com o objetivo de avaliar a relação entre reação inflamatória e biomineralização *in vivo*, Reyes-Carmona et al. (2010) implantaram tubos de dentina preenchidos com MTA ou vazios em tecido subcutâneo de camundongos durante os períodos de 12 h, 1, 3 e 7 dias. A análise dos tubos em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelou a presença de precipitados semelhantes à apatita, depositados sobre as fibras colágenas já nas primeiras 12 h. Com o passar do tempo, uma camada mineralizada mais extensa foi observada, ocorrendo a transformação dos precipitados em aglomerados. Após 7 dias, foi observada uma camada mais compacta de apatita, recobrando a superfície dentinária. Concomitantemente a esse processo, os autores relataram uma resposta inflamatória no tecido conjuntivo, inicialmente aguda, e subsequentemente crônica, e concluíram que os dois processos – inflamatório e de biomineralização - ocorrem simultaneamente, contribuindo para a integração do biomaterial ao meio.

Moretton et al. (2000) investigaram a biocompatibilidade do MTA por meio de sua implantação no tecido subcutâneo e ósseo em ratos, pelos períodos de 15, 30 e 60 dias. Observaram nas áreas adjacentes aos implantes subcutâneos uma resposta inflamatória inicialmente severa, incluindo áreas de necrose, presença de células gigantes associadas ao material e calcificação distrófica, a qual foi atenuada com o passar do tempo. Já nos implantes intraósseos observou-

se resposta inflamatória menos intensa associada a áreas de osteogênese. Os autores comprovaram a biocompatibilidade do material, baseados nos achados histológicos, e classificaram-no como um material de nível 3 na escala de biocompatibilidade².

Ao implantar tubos de dentina contendo MTA, cimento Portland e hidróxido de cálcio em tecido subcutâneo de ratos, Holland et al. (2001) observaram que, após 7 dias, os materiais provocaram uma reação inflamatória de leve a moderada; após 30 dias, a reação foi considerada discreta, com a presença de algumas células gigantes multinucleadas. Os autores relataram a presença de estruturas Von Kossa positivas e birrefringentes à luz polarizada nos espécimes dos três cimentos, o que os levou à conclusão de que o mecanismo de ação desses materiais é muito semelhante.

Shahi et al. (2006) avaliaram as reações teciduais estimuladas pelo MTA branco, MTA cinza e amálgama, após implante subcutâneo em ratos. Observaram uma reação inflamatória mais severa estimulada pelo amálgama no período de 3 e 7 dias, quando comparada aos demais grupos. Após 3 dias, foi detectada uma reação mais severa provocada pelo MTA cinza, quando comparada ao MTA branco; entretanto, após 7 dias a situação inverteu-se. Os autores discutiram a hipótese de que o MTA branco promoveu uma liberação mais lenta do hidróxido de cálcio após contato com a umidade do meio, estimulando uma reação inflamatória severa somente após 7 dias. A reação inflamatória desencadeada pelo MTA cinza ocorreu mais intensamente no período de 3 dias, diminuindo gradualmente. Segundo os autores, diferenças na composição dos dois materiais – como a presença de óxido férrico em maiores quantidades no MTA cinza – pode ser uma das explicações para a variação nas respostas estimuladas pelos mesmos, refletindo a velocidade das reações entre os cimentos e o meio. Após 21 dias, não houve diferença estatística significativa na reação inflamatória desencadeada pelos materiais utilizados na pesquisa.

Em estudo semelhante, Yaltirik et al. (2004) após a implantação de tubos de polietileno contendo ProRoot MTA e amálgama no tecido subcutâneo de ratos, observaram que o MTA promoveu uma reação inflamatória moderada após 7 e 15 dias, com presença de macrófagos e

² Materiais que estimulam uma resposta inflamatória moderada à severa inicialmente – incluindo a formação de células gigantes do tipo corpo estranho, necrose por coagulação e calcificação distrófica – cuja tendência é ser atenuada com o passar do tempo. O hidróxido de cálcio é um exemplo de material que se enquadra neste nível de biocompatibilidade (nível 3).

células gigantes multinucleadas, além de necrose e calcificação distrófica. Após 30 dias, houve redução da reação inflamatória, presença de uma fina cápsula fibrosa ao redor dos tubos e calcificação distrófica. Aos 60 dias, o infiltrado moderado permaneceu, com presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas. Após 90 dias o infiltrado inflamatório não estava presente, porém, a calcificação distrófica foi observada neste período e no anterior. Os autores concluíram que as respostas estimuladas pelo MTA e pelo amálgama foram mais satisfatórias após 90 dias. Foi observada calcificação distrófica em área adjacente ao MTA, porém, o mesmo não foi observado em relação ao amálgama.

Sumer et al. (2006) utilizaram tubos de polietileno preenchidos com MTA, MTA + Clorexidina, amálgama e IRM, e implantaram-nos em tecido subcutâneo de ratos. Observaram reação inicialmente severa estimulada pelo MTA após 7 dias, diminuindo após 30 e 60 dias. Os demais materiais estimularam uma reação inflamatória leve em todos os períodos experimentais, com formação de cápsula fibrosa ao redor dos tubos. Os autores atribuem a reação, inicialmente severa, provocada pelo MTA a fatores como: elevação no pH, na temperatura superficial do cimento e produção de citocinas inflamatórias durante a presa do material.

Ao comparar a reação inflamatória desencadeada pelo MTA branco e cinza após implantação em tecido subcutâneo de ratos, Vosoughhosseini et al. (2008) observaram resultados semelhantes no período de 7 dias, com reação severa. Após 15, 30, 60 e 90 dias a reação inflamatória foi atenuada, sendo classificada como leve. A reação, inicialmente severa, deve-se à produção de hidróxido de cálcio, produto da reação do MTA com a água, de acordo com os autores. Ao entrar em contato com o fluido tecidual, o hidróxido de cálcio dá origem a cristais de hidroxiapatita, os quais recobrem a superfície do MTA, atenuando a inflamação. Este estudo comprovou que tanto o MTA branco quanto o MTA cinza produzem uma resposta inflamatória semelhante a curto e longo prazo.

Apesar de possuir boas propriedades biológicas, o MTA apresenta alguns inconvenientes (SCARPARO et al. 2010), como: custo relativamente elevado (SAIDON et al., 2003; MENEZES et al., 2004); longo tempo de presa; consistência arenosa após a manipulação, dificultando sua inserção no sitio desejado (LEE et al., 2004; KOGAN; HE; GLICKMAN, 2006; SCARPARO et al., 2010), e curto tempo de trabalho (aproximadamente 4 minutos) (GANDOLFI et al., 2008).

Por este motivo, diversos materiais vêm sendo pesquisados e desenvolvidos, com o intuito de manter as características biológicas do MTA e aprimorar suas propriedades físicas.

BIOCERÂMICAS

Biocerâmicas são cerâmicas especialmente destinadas ao uso da medicina ou odontologia, criadas como alternativa aos metais, com o objetivo de aumentar a biocompatibilidade de implantes. Para tal, são utilizadas para revestir superfícies metálicas de implantes dentários, reunindo as características de biocompatibilidade das biocerâmicas, com a resistência e ductibilidade dos metais (DUBOK, 2000).

Dentre os exemplos de biocerâmicas, estão: alumina, zircônia, fosfato tricálcico, silicato tricálcico, silicato dicálcico e hidroxiapatita (DUBOK, 2000).

Recentemente, alguns materiais contendo biocerâmicas, denominados bioagregados, foram desenvolvidos para serem utilizados como cimentos reparadores ou como obturadores de canais radiculares (DE-DEUS et al., 2009; ZHANG; LI; PENG, 2010a; YUAN et al., 2010). São exemplos de bioagregados: o DiaRoot[®] Bioaggregate (DiaDent Group International, BC, Canada); o iRoot[®] SP (Innovative Bioceramix, Vancouver, Canada), o MTA FILLAPEX[®] (Angelus Soluções Odontológicas, PR, Brasil) e o MTA BRANCO (Angelus Soluções Odontológicas, PR, Brasil), ambos utilizados nesta pesquisa.

Diaroot Bioaggregate

O DiaRoot[®] Bioaggregate (BA) foi o primeiro cimento reparador nano-particulado lançado no mercado odontológico. Ele é composto por um pó branco constituído principalmente por silicato de cálcio, hidróxido de cálcio, hidroxiapatita e pentóxido de tântalo (radiopacificador) e um líquido, o “BioA Liquid” (ZHANG; PAPPEN; HAAPASALO, 2009). A mistura de 1g do pó com 0,38 mL do líquido confere ao cimento uma consistência pastosa. O tempo de trabalho é de aproximadamente 5 min e a presa ocorre após 4 a 72 h (Manual de instruções do cimento).

O BA possui as mesmas indicações clínicas do MTA, sendo descrito como uma versão modificada do mesmo (PARK et al., 2010), com a vantagem de não apresentar alumínio em sua formulação

(ZHANG; PAPPEN; HAAPASALO, 2009); fato que, segundo o fabricante, aumenta sua biocompatibilidade com os tecidos perirradiculares.

Estudos demonstram que o BA apresenta biocompatibilidade semelhante à do MTA branco em cultura de células mesenquimais (DE-DEUS et al., 2009) e de fibroblastos do ligamento periodontal humano (YAN et al., 2010).

Yuan et al. (2010) investigaram a citotoxicidade do BA e MTA em cultura de osteoblastos (linhagem MC3T3-E1) através de ensaio MTT, e seus efeitos na expressão de genes associados à mineralização através do método RT-PCR. Observaram que o BA não foi citotóxico e aumentou a expressão de genes associados à mineralização (colágeno tipo I, osteocalcina e osteopontina), de maneira mais significativa do que o MTA.

O BA foi efetivo na eliminação do *Enterococcus faecalis*, promovendo uma redução significativa na viabilidade bacteriana após 6 min de contato (ZHANG PAPPEN; HAAPASALO, 2009). Quando colocado em contato com a *Candida albicans*, a eficácia do cimento contra o fungo foi observada somente após 24 h (AL-ANEZI et al., 2010).

O BA também aumentou a resistência à fratura de dentes com rizogênese incompleta após 1 ano, com valores semelhantes aos proporcionados pelo MTA (TUNA et al., 2011).

iRoot SP

O iROOT SP, também conhecido como EndoSequence BC Sealer (BC Sealer), é um cimento obturador hidrofílico, pré-misturado, de coloração branca, disponível em seringas e pronto para utilização no interior do canal radicular com ou sem cones de guta-percha. Seus principais componentes são: óxido de zircônio, silicato de cálcio, fosfato de cálcio, hidróxido de cálcio e outros agentes não especificados pelo fabricante. O tempo de trabalho é de cerca de 30 min e o de presa é de aproximadamente 4 h; a umidade presente nos túbulos dentinários é necessária para ativar a reação de presa do cimento. Segundo o fabricante, o pH do iRoot SP durante a reação de presa é superior a 12.

Loushine et al. (2011) avaliaram a influência da umidade no tempo de presa inicial, final e dureza do BC Sealer. Demonstraram que ao adicionar diferentes quantidades de água - para simular a umidade presente no canal radicular - há um aumento no tempo de presa inicial e redução no tempo de presa final, à medida que maiores quantidades de

água são adicionadas ao cimento. Sem a presença de umidade, o tempo de presa inicial foi de 72 h e o final de 240 h. É válido salientar que todas as amostras foram armazenadas em câmara com 100% de umidade relativa, proporcionando condições para a presa completa do material mesmo sem a adição de água ao cimento. Após a presa, os autores avaliaram a citotoxicidade do cimento através do ensaio MTT, utilizando cultura de osteoblastos (linhagem MC3T3-E1): após 24 horas, o cimento apresentou severa citotoxicidade e depois de 5 semanas, apresentou nível moderado de citotoxicidade, a qual só foi classificada como leve a partir da sexta semana. Diferentemente, Zhang; Li; Peng (2010b) não observaram citotoxicidade do iROOT SP quando em contato com osteoblastos da linhagem MG63, e relataram ainda, uma maior expressão de genes relacionados à mineralização, pelas células, na presença do cimento. Ao ser comparado ao AH-Plus e ProRoot MTA utilizando metodologia semelhante, os mesmos autores observaram que o iRoot SP foi significativamente menos citotóxico do que o AH-PLUS e mais citotóxico do que o ProRoot MTA (ZHANG, LI & PENG 2010a).

Zoufan et al. (2011) observaram viabilidade celular de 90 a 100% em fibroblastos expostos ao iROOT SP/BC Sealer no período de 24 e 72 h, independentemente da presa do cimento no momento da avaliação. Fayyad (2011) também relatou biocompatibilidade do iROOT SP e do BA em relação a fibroblastos humanos (linhagem MRC-5), após ensaio MTT. O autor credita os bons resultados à presença de fosfato de cálcio - principal componente dos tecidos mineralizados - na composição dos cimentos, e aos íons cálcio e fosfato liberados pelos mesmos.

Em teste de contato direto, o iROOT SP apresentou-se eficaz na destruição do *E. faecalis* após 2 min e manteve-se eficaz após os períodos de 3 e 7 dias (ZHANG et al., 2009).

MTA FILLAPEX

O MTA FILLAPEX é um cimento à base de MTA, de fácil manipulação, tempo de trabalho favorável e excelente radiopacidade, sendo indicado para a obturação de canais radiculares, segundo o fabricante. Contudo, ao analisar sua composição química, Bin et al. (2012) enfatizaram que trata-se de um cimento resinoso que apresenta MTA em sua composição.

Em pesquisa que avaliou a citotoxicidade do MTA FILLAPEX, AH Plus e MTA BRANCO utilizando fibroblastos (linhagem V79) observou-se que o MTA BRANCO apresentou taxa de viabilidade

celular acima de 70%, não sendo considerado um material citotóxico; o AH Plus mostrou citotoxicidade em nível intermediário e o MTA Fillapex foi severamente citotóxico, atingindo o nível de 77,14% de morte celular. Os autores deduzem que o comportamento citotóxico do MTA FILLAPEX seja decorrente do seu componente resinoso, o salicilato (BIN et al., 2012). Reforçando essa hipótese, estudos demonstraram 25% de apoptose celular após 24 h de exposição à resina salicilato, em linhagem celular de fibrossarcoma humano (MAHDI et al., 2006).

O MTA FILLAPEX apresenta efeito antibacteriano contra o *E. faecalis* antes da presa; entretanto, não manteve a mesma atividade após a presa, apesar do elevado pH apresentado pelo cimento (MORGENTAL et al., 2011).

Em pesquisa realizada para avaliação e comparação da reação inflamatória desencadeada pelo MTA FILLAPEX, Sealapex e MTA Angelus, tubos de polietileno preenchidos com os cimentos ou deixados vazios foram implantados em 30 ratos. Após os períodos experimentais de 7, 15, 30, 60 e 90 dias, os ratos foram submetidos à eutanásia, os tubos e tecidos circundantes foram removidos e encaminhados para processamento histológico e posterior análise em microscopia óptica. Após 7 dias, não houve diferença estatística significativa entre os grupos, exceto para o Sealapex, que estimulou maior área de necrose e calcificações. Após 15 dias não houve diferença estatística significativa entre o MTA FILLAPEX e o MTA Angelus, e entre o Sealapex e o grupo controle; entretanto, os dois últimos provocaram uma reposta inflamatória tecidual mais elevada do que os primeiros. Após 30, 60 e 90 dias não houve diferenças na reação inflamatória estimulada pelo MTA FILLAPEX, MTA Angelus e Sealapex. Os autores observaram a presença de mineralizações estimuladas pelos cimentos, confirmadas pelas granulações birrefringentes à luz polarizada e Von Kossa positivas, próximas à abertura dos tubos de polietileno em todos os espécimes, exceto no grupo controle (GOMES-FILHO et al., 2011).

MTA BRANCO

É um cimento reparador endodôntico composto por óxidos minerais na forma de finas partículas hidrofílicas, segundo o fabricante, sendo considerado um bioagregado, por apresentar biocerâmicas em sua composição. Possui as mesmas indicações do MTA cinza, dentre elas: selamento de comunicações entre a cavidade pulpar e o periodonto (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993; PITT FORD et al., 1995; HOLLAND et al., 2001; MAIN et al., 2004), tratamentos conservadores

da polpa dental (PITT FORD et al., 1996; MENEZES et al., 2004; BARRIESHI-NUSAIR & QUDEIMAT, 2006), retro-obturação (TORABINEJAD et al., 1995) e tampão apical em dentes com rizogênese incompleta (TORABINEJAD; CHIVIAN, 1999; FELIPPE; FELIPPE; ROCHA, 2006).

Sua formulação original foi alterada pelo fabricante, com o objetivo de proporcionar menores tempos de presa - inicial e final - através da redução nas quantidades de sulfato de cálcio de sua composição. De acordo com a Angelus Soluções Odontológicas, o tempo de presa foi reduzido de 2 h e 30 min para cerca de 15 min, nesta nova formulação.

Em Endodontia, independentemente do tipo de tratamento a ser executado, preconiza-se o emprego de materiais biocompatíveis, capazes de exercer funções específicas quando em contato com tecidos vivos, sem causar-lhes danos ou prejuízos (COSTA, 2001). Devido à possibilidade de contato entre os materiais endodônticos e o tecido pulpar (BIN et al., 2012) e/ou tecidos periapicais, (DESAI; CHANDLER, 2009; PARIROKH & TORABINEJAD 2010), o conhecimento da biocompatibilidade é fundamental antes de seu emprego clínico (GOMES-FILHO et al., 2008) e um dos fatores que influenciam na eleição do material a ser utilizado no tratamento endodôntico.

Diversas metodologias têm sido utilizadas para determinação da resposta tecidual estimulada pelos materiais utilizados em Endodontia. Dentre elas, pode-se destacar a implantação de tubos preenchidos com os cimentos em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, considerada adequada para avaliação da biocompatibilidade dos cimentos, num mesmo animal (OLSSON; SLIWKOWSKI; LANGELAND, 1981; COSTA, 2001).

Considerando-se a escassez de estudos *in vivo* para avaliação das reações teciduais estimuladas pelos novos materiais endodônticos disponíveis comercialmente, parece oportuno realizar pesquisas que relatem essas propriedades biológicas e reações teciduais provocadas após a implantação subcutânea destes materiais.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a biocompatibilidade dos cimentos iRoot SP, MTA FILLAPEX, DiaRoot BioAggregate e MTA BRANCO através da análise microscópica da reação tecidual estimulada pelos materiais após a implantação de tubos de dentina contendo os cimentos no tecido subcutâneo de ratos.

Objetivos específicos

- 1) Detectar e classificar a intensidade da inflamação na área de interface material/tecido conjuntivo.
- 2) Relatar eventos teciduais correlacionados à inflamação.
- 3) Detectar a presença de calcificação tecidual induzida pelos materiais.
- 4) Comparar os resultados provenientes dos cimentos em estudo com os resultados do grupo controle.

ARTIGO

Versão em Português

Análise da reação tecidual estimulada pelos cimentos iRoot SP, MTA FILLAPEX, DiaRoot BioAggregate e MTA BRANCO.

Claudia Caroline Bósio

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

Artigo formatado conforme normas do **Journal of Endodontics** (acessadas em: 31 de janeiro de 2012), exceto em relação à quantidade de palavras, figuras e tabelas.

Resumo

Introdução O agregado de trióxido mineral (MTA) é um dos materiais mais estudados na Endodontia, sendo considerado biocompatível e bioativo. Apesar de suas características favoráveis, este material apresenta algumas limitações à sua utilização. O propósito deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade de novos cimentos endodônticos, desenvolvidos com o intuito de aprimorar as características do MTA, através da análise da reação tecidual estimulada após a implantação subcutânea destes materiais.

Metodologia Tubos de dentina foram preenchidos com os cimentos iRoot SP, MTA FILLAPEX, Diaroot Bioaggregate e MTA BRANCO, ou deixados vazios (controle), e implantados no tecido subcutâneo de ratos da linhagem Wistar. Após os períodos de 7, 15, 30 e 90 dias, os tubos e tecidos circundantes foram excisados em bloco e fixados em formol. O tubo de dentina foi então removido, e o tecido circundante foi processado e incluído em parafina. Após a realização de cortes semi-seriados e colorações pelo método H&E, para avaliação da morfologia tecidual, e Von Kossa, para avaliação de áreas calcificadas, foi realizada uma análise semi-quantitativa da reação tecidual.

Resultados Todos os grupos apresentaram redução da reação inflamatória tecidual no decorrer dos períodos experimentais, exceto o grupo do MTA FILLAPEX. Partículas de cimento foram frequentemente observadas nas cápsulas conjuntivas associadas aos cimentos MTA FILLAPEX e iRoot SP, os quais apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação à presença de células gigantes multinucleadas (CGMNs), macrófagos e necrose tecidual, em comparação com os demais grupos. Positividade ao Von Kossa foi observada apenas relacionada às áreas de necrose.

Conclusão Todos os cimentos apresentaram-se biocompatíveis, exceto o MTA FILLAPEX que, no período de 90 dias, ainda estimulou uma reação inflamatória moderada, presença de necrose tecidual, CGMNs e macrófagos fagocitando partículas do cimento.

Palavras-chave: MTA. Cimentos endodônticos. Biocompatibilidade. Implantação. Tecido subcutâneo. Inflamação. Calcificação.

Introdução

O agregado de trióxido mineral (MTA) é um dos materiais mais estudados na Endodontia, indicado principalmente para o selamento de comunicações entre a cavidade pulpar e o periodonto (1-4), utilizado também em casos de retro-obturação (5), tratamentos conservadores da polpa (6), tampão apical em dentes com rizogênese incompleta (7) e obturação do canal radicular (8).

O MTA é considerado um material biocompatível, pois estimula reações teciduais favoráveis quando em contato com tecidos periapicais, caracterizadas pela neoformação óssea e cementária (7,9), ausência de inflamação severa (10) e promoção de reparo tecidual. Ele é considerado um material bioativo devido à sua capacidade de formar cristais de hidroxiapatita (11) ou apatita carbonatada (12-14) sobre a superfície do cimento após interação com o fluido tecidual.

Apesar das características biológicas satisfatórias, o MTA apresenta algumas limitações quanto ao seu emprego, como a dificuldade de manipulação (15), o reduzido tempo de trabalho (16), o tempo de presa longo (17) e o alto custo (18). Por esses motivos, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de desenvolver novos materiais que conservem as propriedades biológicas do MTA, aprimorando suas características físico-químicas.

Dentre estes materiais destacam-se alguns cimentos que contêm biocerâmicas, chamados bioagregados (19). Estes são utilizados como cimentos reparadores ou como cimentos obturadores de canais radiculares (20-22).

Um exemplo de bioagregado reparador é o DiaRoot Bioaggregate (BA) (DiaDent Group International, BC, Canada), considerado uma versão modificada do MTA (23), com a vantagem de não apresentar alumínio em sua formulação (24), fato que, segundo o fabricante, aumenta sua biocompatibilidade com os tecidos perirradiculares. Este cimento não tem demonstrado citotoxicidade a osteoblastos (22) e a fibroblastos do ligamento periodontal humano (25).

O iRoot SP (Innovative Bioceramix, Vancouver, Canada) e o MTA FILLAPEX (Angelus Soluções Odontológicas, PR, Brasil) são exemplos de bioagregados obturadores de canais radiculares, recentemente lançados no comércio. O primeiro é um cimento obturador hidrofílico, pré-misturado, de cor branca, composto por biocerâmicas, com atividade antibacteriana (24), não apresentando citotoxicidade a fibroblastos humanos (21,26).

O MTA FILLAPEX é um cimento resinoso que apresenta MTA em sua composição (27), com pH elevado e efeito antibacteriano (28). Em estudo recente foi demonstrado que o mesmo apresenta efeitos citotóxico e genotóxico maiores que o MTA branco, em cultura de células (27).

Para que sejam utilizados rotineiramente na clínica odontológica, é imprescindível a realização de pesquisas que avaliem a biocompatibilidade desses novos materiais. Como a literatura é escassa, consideramos oportuna a realização deste trabalho para analisar as reações teciduais provocadas pelo iRoot SP, MTA FILLAPEX, DiaRoot e MTA BRANCO, após implantação em tecido subcutâneo de ratos.

Material e Métodos

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (procolo n^o 2166) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo PP00555) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Trinta e dois ratos machos adultos jovens (4-6 meses) (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com peso entre 250 e 300g foram utilizados na pesquisa.

Tubos de dentina com 7 mm de comprimento e 1,3 mm de diâmetro interno, confeccionados a partir de dentes humanos unirradiculados foram lavados com água destilada e esterilizados em autoclave. Instantes antes da implantação subcutânea, os tubos foram irrigados com EDTA 17% e com hipoclorito de sódio 1% por 3 min e secos com gaze e cones de papel estéreis (29). Os tubos foram preenchidos com os materiais experimentais manipulados no momento da inserção, de acordo com as instruções do fabricante, à exceção do grupo-controle, no qual os tubos de dentina permaneceram vazios. A amostra foi composta por 5 grupos. Grupo 1 (n=32): controle; Grupo 2 (n=32): MTA BRANCO (Angelus Soluções Odontológicas, PR, Brasil); Grupo 3 (n=32): DiaRoot[®] BioAggregate (DiaDent Group International, BC, Canada); Grupo 4 (n=32): MTA FILLAPEX (Angelus Soluções Odontológicas, PR, Brasil); Grupo 5 (n=32): iRoot[®] SP (Innovative Bioceramix, Vancouver, Canada).

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com cloridrato de ketamina (25 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg), na face posterior da coxa. Após assepsia e depilação manual da região dorsal, foram realizadas 2 incisões longitudinais, uma anterior e outra posterior, seguidas pela divulsão do tecido para 4 regiões equidistantes:

duas em direção escapular e duas em direção à região pélvica. Em cada um dos sítios, foi implantado 1 tubo de dentina preenchido com um dos cimentos, obedecendo à uma ordem de colocação previamente estabelecida, existindo rotatividade dos materiais em relação às regiões. Um quinto tubo de dentina vazio foi implantado em cada um dos ratos em uma loja cirúrgica criada entre os sítios escapular e caudal, no lado direito (grupo-controle). Ao término do procedimento cirúrgico, as bordas das incisões foram aproximadas e suturadas com fio de seda 4.0.

Para a análise da reação tecidual foram avaliados quatro períodos experimentais: 7, 15, 30 e 90 dias, sendo que para cada período foram utilizados 8 ratos.

Após a eutanásia, os tubos de dentina foram removidos em bloco, juntamente com os tecidos circundantes. Após fixação em formol 10% tamponado por 24h, os tubos foram cuidadosamente removidos do tecido conjuntivo e este foi encaminhado para processamento histológico. Cortes histológicos seriados de 4µm foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H&E), para avaliação da morfologia tecidual, e pela técnica de Von Kossa, para avaliação de estruturas calcificadas. Os cortes Von Kossa positivos foram submetidos à microscopia de luz polarizada, para observação de estruturas birrefringentes que, juntamente com sua análise morfológica, indicaram ou não a presença de calcificação tecidual. A análise morfológica das reações teciduais foi realizada por dois examinadores previamente calibrados, de forma semi-quantitativa, considerando três campos da região tecidual em contato com o material, em cada uma das extremidades dos tubos de dentina. Foi utilizado um microscópio óptico (Carl Zeiss, Oberkachen, Germany) em aumentos de 50x, 100x e 400x, e a reação tecidual foi classificada a partir da média das variáveis observadas nos três campos, seguindo os critérios: organização da cápsula conjuntiva (0- não definida, 1-definida); espessura da cápsula (expressa em µm); composição da cápsula (1 - tecido de granulação, 2 - tecido fibroso); intensidade da inflamação (0 – ausente ou discreta: até 10 células inflamatórias por campo; 1- leve: de 11 a 25 células inflamatórias por campo; 2 – moderada: de 26 a 65 células inflamatórias por campo; 3 – severa: mais de 65 células inflamatórias por campo). As variáveis presença de células gigantes multinucleadas, macrófagos, necrose tecidual e neovascularização foram classificadas em: 0 - ausente e 1 - presente. A variável neovascularização foi considerada presente somente quando havia 10 ou mais neovasos por campo avaliado.

Os resultados foram submetidos à análise estatística através do teste exato de Fischer para as variáveis expressas em escores. Para o item espessura da cápsula (expressa em μm) os resultados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. O teste de correlação de Spearman foi realizado entre as variáveis e os períodos experimentais. Foi ainda empregado o índice Kappa para analisar a confiabilidade das leituras realizadas pelos dois observadores.

A avaliação quanto à presença de calcificação, pela coloração de Von Kossa, bem como quanto à presença de estruturas birrefringentes à luz polarizada, foi realizada apenas de forma descritiva, não sendo submetida à análise estatística.

Resultados

CONTROLE

A cápsula conjuntiva se apresentou bem definida e composta por tecido de granulação na maioria dos espécimes, e em todos os períodos. Aos 7 dias, a reação inflamatória foi classificada como moderada. Aos 15, 30 e 90 dias, houve redução da intensidade inflamatória, que variou de discreta à leve. A presença de neovasos foi observada na maioria dos espécimes apenas no primeiro período experimental. Este grupo caracterizou-se por raras áreas de necrose tecidual nos períodos iniciais (7 e 15 dias) e sua completa ausência nos períodos de 30 e 90 dias. Quando presentes, as áreas de necrose estiveram associadas à invaginação de tecido conjuntivo para a região correspondente ao interior do tubo de dentina, que se encontrava vazio. Não foram observadas áreas positivas ao Von Kossa ou birrefringentes à luz polarizada em nenhum dos períodos experimentais (Figura 1, A1-A4).

MTA

A cápsula conjuntiva apresentou-se predominantemente bem definida em todos os tempos experimentais, sendo composta por tecido de granulação na maioria dos casos, com exceção do último período experimental, no qual 50% das cápsulas apresentaram-se compostas por tecido conjuntivo fibroso. Aos 7 dias, a reação inflamatória foi classificada como moderada. Após 15, 30 e 90 dias, houve redução da inflamação, sendo classificada como leve. Na maioria dos casos não foram observadas células gigantes multinucleadas e macrófagos, mas, quando presentes, estiveram associados a partículas enegrecidas do

cimento ou a regiões de necrose tecidual, as quais foram consideradas escassas, porém, observadas nos 3 períodos iniciais. A positividade ao Von Kossa foi observada apenas nas áreas de necrose, entretanto, não houve birrefringência à luz polarizada nestas regiões (Figura 1, B1-B4).

DIAROOT

A cápsula conjuntiva apresentou-se definida na maioria dos espécimes em todos os tempos experimentais, sendo geralmente constituída por tecido de granulação, com exceção do período de 90 dias, no qual houve predomínio de tecido conjuntivo fibroso. Aos 7 e 15 dias, a reação inflamatória variou de leve à moderada e após 30 e 90 dias a inflamação foi considerada leve.

Poucas amostras apresentaram necrose tecidual. Na maioria dos espécimes não foram observadas células gigantes multinucleadas e macrófagos, e, quando presentes, estiveram associados a partículas enegrecidas do próprio cimento ou a áreas de necrose tecidual. A positividade ao Von Kossa foi observada apenas em áreas de necrose, porém, com ausência de birrefringência à luz polarizada (Figura 1, C1-C4).

FILLAPEX

As cápsulas conjuntivas apresentaram-se definidas na maioria dos espécimes, e em todos os períodos experimentais, sendo constituídas por tecido de granulação, na maioria dos casos. Em todos os períodos observou-se um infiltrado inflamatório predominantemente moderado. Fragmentos do cimento, na forma de partículas enegrecidas, foram observados nas cápsulas conjuntivas em todos os períodos experimentais (Figura 2, A1-A4). A presença de células gigantes multinucleadas (Figura 2, C e D) e macrófagos (Figura 2-E) associados a esses fragmentos e a áreas de necrose tecidual, também foram observados em todos os períodos experimentais. Positividade ao Von Kossa foi observada apenas nas áreas em que ocorreu necrose tecidual (Figura 2, F e G). Os fragmentos de cimento, presentes na cápsula, apresentavam birrefringência à luz polarizada (Figura 2-H).

iRoot SP

A partir dos 15 dias a cápsula conjuntiva apresentou-se definida e constituída, na maioria dos espécimes, por tecido de granulação, com presença de partículas de cimento. No último período, a cápsula foi composta principalmente por tecido conjuntivo fibroso. Aos 7 e 15 dias, observou-se predomínio de infiltrado inflamatório moderado, cuja

intensidade foi reduzida após 30 e 90 dias, sendo classificada como leve à ausente/discreta. Extensas áreas de necrose foram observadas na maioria dos espécimes aos 7 e 15 dias e apenas em alguns espécimes aos 30 e 90 dias. Associados às partículas do cimento e áreas de necrose, foram observados macrófagos e células gigantes multinucleadas. Em todos os casos, as áreas de necrose apresentaram-se positivas ao Von Kossa e com ausência de birrefringência à luz polarizada (Figura 2, B1-B4).

Comparação entre os grupos

O índice Kappa, considerado satisfatório, mostrou haver concordância na avaliação dos examinadores.

As variáveis estudadas foram comparadas em cada período experimental entre os grupos em estudo (Quadros 1, 2, 3 e 4).

A correlação entre as variáveis está demonstrada no Quadro 5.

Discussão

Biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem, contudo, causar danos ou prejuízos ao mesmo (30). Ao avaliar a biocompatibilidade de um material endodôntico, seus efeitos prejudiciais em longo prazo são considerados mais importantes do que os efeitos iniciais (31).

A implantação subcutânea em pequenos animais é um dos métodos mais apropriados para determinar a biocompatibilidade e os efeitos locais de materiais experimentais (33,34). O nível aceitável de biocompatibilidade pode variar de um material que não promova reação inflamatória quando implantado, até um material que estimule uma reação inflamatória severa, mas que diminua com o tempo (32).

Neste trabalho, optamos pela implantação dos materiais utilizando tubos de dentina, o que facilita a sua estabilização e padronização da interface material-tecido (31,35), simulando as condições clínicas do canal radicular (35). Elegemos os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 90 dias, por permitirem a avaliação da reação inflamatória estimulada pelos materiais a curto e longo prazos, num mesmo estudo (36). Ainda, a implantação dos materiais no mesmo animal, em sistema de rodízio, possibilita um equilíbrio entre regiões e animais, evitando interferências

das condições anatômicas, sistêmicas e nutritivas, nas avaliações comparativas entre os cimentos.

É bem reconhecido na literatura que a presença de tecido conjuntivo fibroso, circundando o material, indica que ele é bem tolerado pelos tecidos (31). No nosso estudo, para todos os grupos houve predomínio de cápsula constituída por tecido de granulação nos períodos de 7, 15 e 30 dias. Já no período de 90 dias, os cimentos iRoot SP e DiaRoot mostraram prevalência de cápsulas constituídas por tecido conjuntivo fibroso; no MTA, esta prevalência foi de aproximadamente metade dos casos, e nos grupos controle e FILLAPEX houve predomínio de tecido de granulação na constituição da maioria das cápsulas, neste período experimental. A manutenção da cápsula conjuntiva composta por tecido de granulação, no grupo controle, provavelmente tenha ocorrido pela presença de invaginação tecidual para o interior do tubo de dentina vazio, preenchendo parte do espaço correspondente ao seu lúmen, fato este relatado por outros autores (10,37). Associado a este tecido de granulação, foram observadas células inflamatórias e, em alguns casos, necrose tecidual na extremidade da invaginação. Isto pode ter ocorrido devido ao fato de o aumento no volume tecidual não ter sido acompanhado por neovascularização suficiente para garantir o suprimento sanguíneo local. Isto poderia ter sido evitado selando-se as extremidades dos tubos com guta-percha, ou utilizando a parte lateral do tubo, para controle (36). Com relação à manutenção do tecido de granulação nos casos do MTA FILLAPEX, acreditamos que isso tenha ocorrido devido à toxicidade do material que, aos 90 dias, apresentou reação inflamatória moderada, presença de CGMNs e macrófagos. Esse cimento é o único que contém resina em sua composição, podendo ser este o fator responsável pela reação inflamatória mais intensa estimulada pelo material.

Observou-se uma correlação positiva (Teste de correlação de Spearman, valor de $p=0.000$) entre a presença de infiltrado inflamatório e a espessura da cápsula conjuntiva em todos os períodos experimentais.

A presença de neovascularização ocorreu na maioria dos espécimes de todos os grupos aos 7 dias. No período de 15 dias houve diminuição da neovascularização no grupo controle, com diferença estatisticamente significativa em relação aos demais grupos em estudo. Nos períodos experimentais seguintes, todos os grupos apresentaram diminuição da neovascularização, com exceção do MTA FILLAPEX.

Ao analisar a reação inflamatória, observou-se que todos os grupos estimularam reações teciduais mais intensas em 7 e 15 dias, com redução na severidade com o passar do tempo. A exceção foi para o

grupo do MTA FILLAPEX, o qual estimulou uma reação tecidual predominantemente moderada, em todos os períodos experimentais. Esses achados diferem dos de Gomes-Filho et al. (38), os quais observaram redução do infiltrado inflamatório no tecido adjacente a este material, a partir de 15 dias. No presente estudo, apesar de não existir diferença estatística significativa em relação à intensidade inflamatória, este cimento foi o único que exibiu a maior porcentagem dos seus espécimes com infiltrado moderado no tecido adjacente, ainda aos 90 dias.

Em relação ao MTA, a explicação para a reação inflamatória inicial mais intensa no tecido circundante, como observado em outros trabalhos (38-40), decorre do elevado pH atingido pelo cimento durante a presa, produção e liberação de citocinas proinflamatórias (41,42) e formação de hidróxido de cálcio (39). Segundo Vosoughhosseini et al. (39), o hidróxido de cálcio, ao entrar em contato com o fluido tecidual, dá origem a cristais de hidroxiapatita, os quais recobrem a superfície do MTA, atenuando a inflamação nos demais períodos experimentais. O MTA desencadeia, inicialmente, reações inflamatórias mais intensas, com a presença de necrose por coagulação e calcificação distrófica, e, com o passar do tempo, as reações tornam-se mais leves (10).

Na literatura não existem trabalhos avaliando a reação inflamatória após implantação subcutânea dos cimentos iRoot SP e DiaRoot BioAggregate. Estes materiais desencadearam, inicialmente, uma reação inflamatória mais intensa, a qual se reduziu no decorrer dos períodos experimentais.

Outro fator importante a ser avaliado para o estabelecimento da biocompatibilidade dos materiais é a presença ou não de necrose tecidual. No nosso estudo os cimentos iRoot SP e MTA FILLAPEX provocaram necrose tecidual em todos os períodos experimentais, com diferença estatística significativa em relação ao grupo controle e ao DiaRoot, no período de 30 dias, e em relação ao grupo controle e MTA, no período de 90 dias. Esse fato provavelmente reflete a maior capacidade de causar dano tecidual dos cimentos iRoot SP e MTA FILLAPEX. Outro fator importante é que as áreas de necrose estiveram frequentemente associadas a partículas desses cimentos. É importante salientar que todos os materiais analisados mostraram partículas de cimento extravasadas para o interior da cápsula conjuntiva.

Essas partículas apresentaram variação em relação à forma e quantidade. Em alguns espécimes, o tecido adjacente às partículas não apresentava reação inflamatória, como na maioria dos casos relacionados ao MTA BRANCO. No entanto, na maioria das amostras dos demais grupos

experimentais, as partículas de cimento estiveram comumente associadas à presença de macrófagos e CGMNs. A presença dessas células em todos os períodos experimentais, inclusive aos 90 dias, indica a presença de substâncias de difícil eliminação pelo organismo, como observado na maioria dos espécimes do cimento MTA FILLAPEX. Este cimento, juntamente com o iRoot SP, foi o material que apresentou a maior quantidade de partículas na cápsula conjuntiva, provavelmente devido à sua maior fluidez e, conseqüentemente, maior escoamento em relação aos demais materiais, já observada no momento da inserção do material nos tubos de dentina. Esse extravasamento poderia ter sido prevenido realizando-se o selamento de uma das extremidades do tubo, como recomendado por alguns autores (43) ou implantando-os após a presa; entretanto, este último fator eliminaria a avaliação dos efeitos dos materiais recém-manipulados, quando geralmente apresentam maior toxicidade (44).

As áreas positivas ao Von Kossa, que indicam deposição de cálcio, foram observadas em todos os grupos experimentais deste trabalho, com exceção dos espécimes do grupo controle, e estiveram sempre associadas às áreas de necrose tecidual, que se apresentaram basofílicas e amorfas na coloração H&E, como relatada por outros autores (8). Isso ocorre pelo fato de que nas regiões de necrose por coagulação pode ocorrer acúmulo de sais de cálcio, num processo denominado calcificação distrófica (45); por isto, essas regiões apresentam-se positivas ao Von Kossa.

Ao submetermos as áreas coradas pelo Von Kossa à microscopia de luz polarizada para observação de granulações birrefringentes correspondentes aos cristais de calcita (8), observamos birrefringência somente nas partículas do cimento MTA FILLAPEX. Entretanto, ao relacionar a morfologia tecidual das áreas positivas ao Von Kossa com as granulações birrefringentes, observamos que estas correspondiam aos fragmentos de cimento presentes na cápsula, já destacadas na coloração H&E como partículas enegrecidas. Para confirmar esta suposição, manipulamos o cimento e confeccionamos lâminas para observação em microscopia de luz polarizada, confirmando a presença de partículas birrefringentes e morfologicamente semelhantes às partículas observadas nas lâminas do grupo do MTA FILLAPEX - que podem ter escoado ou se solubilizado no tecido conjuntivo - não correspondendo aos cristais de calcita (dado não apresentado nos resultados).

O fato de termos removido os tubos de dentina pode ter provocado a remoção da região em que normalmente ocorre a deposição de granulações birrefringentes à luz polarizada: interface

tubo/material/tecido conjuntivo (10), impossibilitando-nos de observá-las. Em outros trabalhos que utilizaram a mesma metodologia de implantação subcutânea também não foram observadas essas estruturas calcificadas (40,41) próximas ao MTA, mesmo utilizando a coloração Von Kossa (46) sem a remoção dos tubos contendo o material.

Contudo, em alguns trabalhos nos quais não foi realizada a remoção do tubo de dentina, foram observadas áreas positivas ao Von Kossa e birrefringentes à luz polarizada, relacionadas aos espécimes do MTA (8,10) e ao MTA FILLAPEX (38), indicando que os cimentos estimularam a mineralização quando implantados em tecido subcutâneo de ratos (31). Diversos trabalhos atestam a biocompatibilidade do MTA (41), incluindo a formação de estruturas calcificadas próximas à interface material/tecido (8).

Conclusões

Todos os cimentos testados apresentaram-se biocompatíveis, visto que as reações teciduais foram atenuando-se ao longo dos períodos experimentais, incluindo o grupo controle. A exceção foi para o MTA FILLAPEX que, aos 90 dias ainda estimulou uma reação inflamatória moderada no tecido conjuntivo, associada à necrose tecidual e à presença de CGMNs e macrófagos fagocitando as partículas do cimento.

Quadro 1. Porcentagem das amostras em cada grupo, de acordo com as variáveis em estudo, no período de 7 dias.

VARIÁVEIS	CONTROLE	MTA	DIAROOT	FILLAPEX	IROOT	Valor de <i>p</i>
7 dias						
Definição Cápsula (0) não definida; (1) definida	(0) 25% (1) 75%	26.67% 73.33%	21.43% 78.57%	23.08% 76.92%	54.55% 45.45%	0.440
Espessura da Cápsula (µm)	108.8	159.1	92.4	130.4	117.4	0.2265
Natureza da Cápsula (1) tecido de granulação (2) tecido conjuntivo fibroso	(1) 91.97% (2) 8.33%	100% 0%	92.86% 7.14%	100% 0%	100% 0%	0.631
Intensidade da inflamação: (0) ausente/discreta; (1) leve; (2) moderada; (3) severa.	(0) 8.33% (1) 8.33% (2) 66.67% (3) 16.67%	0% 20% 60% 20%	7.14% 50% 42.86% 0%	0% 15.38% 76.92% 7.69%	0% 27.27% 45.45% 27.27%	0.208
Macrófagos (0) ausente; (1) presente	(0) 100% ^a (1) 0% ^a	86.67% ^a 13.33% ^a	78.57% ^a 21.43% ^a	30.77% ^b 69.23% ^b	9.09% ^b 90.91% ^b	0.000
CGMI (0) ausente; (1) presente	(0) 91.67% (1) 8.33%	86.67% 13.33%	71.43% 28.57%	76.92% 23.08%	40.0% 60.0%	0.068
Necrose (0) ausente; (1) presente	(0) 83.33% (1) 16.67%	53.85% 46.67%	71.43% 28.57%	53.85% 46.67%	45.45% 54.55%	0.298
Neovascularização (0) ausente; (1) presente	(0) 33.33% (1) 66.67%	40% 60%	50% 50%	23.08% 76.92%	30% 70%	0.676

*Valor de *p* em negrito indica significância estatística.

a,b letras diferentes indicam diferença estatística.

Quadro 2. Porcentagem das amostras em cada grupo, de acordo com as variáveis em estudo, no período de 15 dias.

VARIÁVEIS	CONTROLE	MTA	DIAROOT	FILLAPEX	IROOT	Valor de p
15 dias						
Definição Cápsula (0) não definida; (1) definida	(0) 45.45% (1) 54.55%	36.36% 64.41%	30% 70%	25% 75%	45.45% 54.55%	0.790
Espessura da Cápsula (µm)	120.6	173.5	199.5	227.7	167	0.2231
Natureza da Cápsula (1) tecido de granulação (2) tecido conjuntivo fibroso	(1) 90.91% (2) 9.09%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	100% 0%	0.729
Intensidade da inflamação: (0) ausente, discreta (1) leve; (2) moderada; (3) severa.	(0) 0% (1) 54.55% (2) 36.36% (3) 9.09%	9.09% 63.64% 18.18% 9.09%	10% 40% 40% 10%	0% 18.75% 68.75% 12.50%	0% 18.18% 72.73% 9.09%	0.137
Macrófagos (0) ausente; (1) presente	(0) 90.91% ^a (1) 9.09% ^a	90.91% ^a 9.09% ^a	70% ^a 30% ^a	18.75% ^b 81.25% ^b	9.09% ^b 90.91% ^b	0.000
CGMN (0) ausente; (1) presente	(0) 100% ^a (1) 0% ^a	90.91% ^a 9.09% ^a	90% ^a 10% ^a	50% ^b 50% ^b	50% ^b 50% ^b	0.004
Necrose (0) ausente; (1) presente	(0) 90.91% (1) 9.09%	63.64% 36.36%	80% 20%	75% 25%	45.45% 54.55%	0.195
Neovascularização (0) ausente; (1) presente	(0) 63.64% ^a (1) 36.36% ^a	9.09% ^b 90.91% ^b	10% ^b 90% ^b	6.25% ^b 93.75% ^b	18.18% ^b 81.82% ^b	0.005

*Valor de *p* em negrito indica significância estatística.

a,b letras diferentes indicam diferença estatística.

Quadro 3. Porcentagem das amostras em cada grupo de acordo com as variáveis em estudo, no período de 30 dias.

VARIÁVEIS	CONTROLE	MTA	DIAROOT	FILLAPEX	IROOT	Valor de p
30 dias						
Definição Cápsula (0) não definida; (1) definida	(0) 8.33% (1) 91.67%	12.50% 87.50%	0% 100%	6.25% 93.75%	7.69% 92.31%	0.806
Espessura da Cápsula (μm)	104.8	98.9	118.8	134.5	151.4	0.4268
Natureza da Cápsula (1) tecido de granulação (2) tecido conjuntivo fibroso	(1) 75% (2) 25%	75% 25%	53.33% 46.67%	81.25% 18.75%	92.31% 7.69%	0.215
Intensidade da inflamação: (0) ausente/discreta (1) leve; (2) moderada; (3) severa.	(0) 41.67% (1) 25% (2) 33.33% (3) 0%	31.25% 37.50% 25% 6.25%	26.67% 66.67% 6.67% 0%	25% 37.50% 37.50% 0%	46.15% 23.08% 30.77% 0%	0.360
Macrófagos (0) ausente; (1) presente	(0) 100% ^a (1) 0% ^a	87.50% ^a 12.50% ^a	80% ^a 20% ^a	12.50% ^b 87.50% ^b	38.46% ^b 61.54% ^b	0.000
CGMN (0) ausente; (1) presente	(0) 100% ^a (1) 0% ^a	68.75% ^b 31.25% ^b	93.33% ^a 6.67% ^a	56.25% ^b 43.75% ^b	84.62% ^a 15.38% ^a	0.020
Necrose (0) ausente; (1) presente	(0) 100% ^a (1) 0% ^a	75% ^b 25% ^b	100% ^a 0% ^a	56.25% ^b 43.75% ^b	69.23% ^b 30.77% ^b	0.004
Neovascularização (0) ausente; (1) presente	(0) 83.33% (1) 16.67%	81.25% 18.75%	80% 20%	50% 50%	61.54% 38.46%	0.215

*Valor de *p* em negrito indica significância estatística.

a,b letras diferentes indicam diferença estatística.

Quadro 4. Porcentagem das amostras em cada grupo, de acordo com as variáveis em estudo no período de 90 dias.

VARIÁVEIS	CONTROLE	MTA	DIAROOT	FILLAPEX	IROOT	Valor de p
90 dias						
Definição Cápsula (0) não definida; (1) definida	(0) 0% (1) 100%	0% 100%	0% 100%	0% 100%	0% 100%	#
Espessura da Cápsula (µm)	191.3	174.7	216.2	245.8	182.1	0.1855
Natureza da Cápsula (1) tecido de granulação (2) tecido conjuntivo fibroso	(1) 72.73% ^a (2) 27.27% ^a	50% ^b 50% ^b	14.29% ^b 85.71% ^b	93.33% ^a 6.67% ^a	27.27% ^b 72.73% ^b	0.000
Intensidade da inflamação: (0) ausente/discreta; (1) leve; (2) moderada; (3) severa.	(0) 54.55% (1) 45.45% (2) 0% (3) 0%	28.57% 57.14% 14.29% 0%	28.57% 57.14% 14.29% 0%	13.33% 33.33% 40% 13.33%	18.18% 72.73% 9.09% 0%	0.125
Macrófagos (0) ausente; (1) presente	(0) 90.91% ^a (1) 9.09% ^a	85.71% ^a 14.29% ^a	85.71% ^a 14.29% ^a	13.33% ^b 86.67% ^b	27.27% ^b 72.73% ^b	0.000
CGMN (0) ausente; (1) presente	(0) 100% ^a (1) 0% ^a	100% ^a 0% ^a	92.86% ^a 7.14% ^a	53.33% ^b 46.67% ^b	90.91% ^a 9.09% ^a	0.001
Necrose (0) ausente; (1) presente	(0) 100% ^a (1) 0% ^a	100% ^a 0% ^a	71.43% ^b 28.57% ^b	46.67% ^b 53.33% ^b	81.82% ^b 18.18% ^b	0.001
Neovascularização (0) ausente; (1) presente	(0) 72.73% (1) 27.27%	78.57% 21.43%	64.29% 35.71%	33.33% 66.67%	72.73% 27.27%	0.109

*Valor de p em negrito indica significância estatística. # teste não realizado, proporções iguais nesta situação.

a,b letras diferentes indicam diferença estatística

Quadro 5. Correlação entre as variáveis.

	Necrose	Espessura cápsula	Natureza cápsula	Intensidade Inflamação	CGMIs	Macrófagos	Neovasos
Necrose	r=1.000						
Espessura cápsula	r=0.2224 p=0.0010	r=1.000					
Natureza cápsula	r= -0.1718 p=0.0116	r= -0.0114 p=0.8683	r=1.000				
Intensidade Inflamação	r=0.2976 p=0.0000	r=0.3245 p=0.0000	r=-0.4464 p=0.0000	r=1.000			
CGMIs	r=0.3469 p=0.0000	r=0.3375 p=0.0000	r=-0.2095 p=0.0020	r=0.4150 p=0.0000	r=1.000		
Macrófagos	r=0.2174 p=0.0013	r=0.2819 p=0.0000	r=-0.2870 p=0.0000	r=0.3352 p=0.0000	r=0.5250 p=0.0000	r=1.000	
Neovasos	r=0.2791 p=0.0000	r=0.4392 p=0.0000	r=-0.3664 p=0.0000	r=0.6106 p=0.0000	r=0.3637 p=0.0000	r=0.3310 p=0.0000	r=1.000

Teste de Correlação de Spearman.

Valor de correlação: r

Significância estatística: $p \leq 0.05$

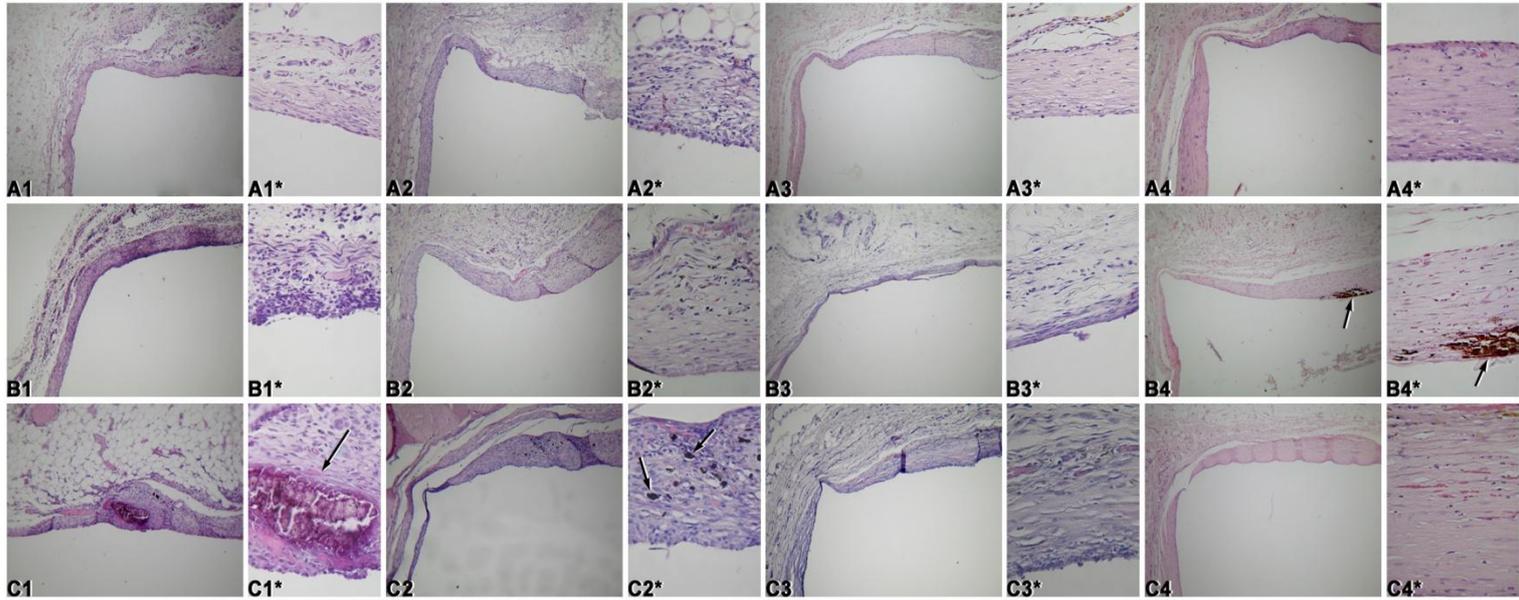


Figura 1- Análise da reação inflamatória e fenômenos correlatos para os grupos Controle, MTA e Diarroot. Aumentos de 100x e 400x (*). Coloração H&E.
A) Grupo Controle: (A1), 7 dias; (A1*) Infiltrado inflamatório moderado, cápsula constituída por tecido de granulação; (A2) 15 dias; (A2*) cápsula constituída por tecido de granulação com infiltrado inflamatório leve; (A3) 30 dias; (A3*) Cápsula de tecido conjuntivo mostrando infiltrado inflamatório leve; (A4) 90 dias; (A4*) Ausência de infiltrado inflamatório na cápsula de tecido conjuntivo. **B) MTA:** (B1), 7 dias; (B1*) cápsula constituída por tecido de granulação com infiltrado inflamatório moderado; (B2) 15 dias; (B2*) cápsula constituída por tecido conjuntivo com infiltrado inflamatório leve; (B3) 30 dias; (B3*) Fina cápsula de tecido conjuntivo mostrando ausência de infiltrado inflamatório; (B4) 90 dias; (B4*) Ausência de infiltrado inflamatório na cápsula de tecido conjuntivo com a presença de partículas de cimento (seta). **C) Diarroot:** (C1), 7 dias; (C1*) Infiltrado inflamatório moderado, cápsula constituída por tecido de granulação, com área de necrose por coagulação (seta); (C2) 15 dias; (C2*) cápsula constituída por tecido de granulação com presença de partículas de cimento (seta); (C3) 30 dias; (C3*) Cápsula de tecido conjuntivo mostrando infiltrado inflamatório leve; (C4) 90 dias; (C4*) Ausência de infiltrado inflamatório na cápsula.

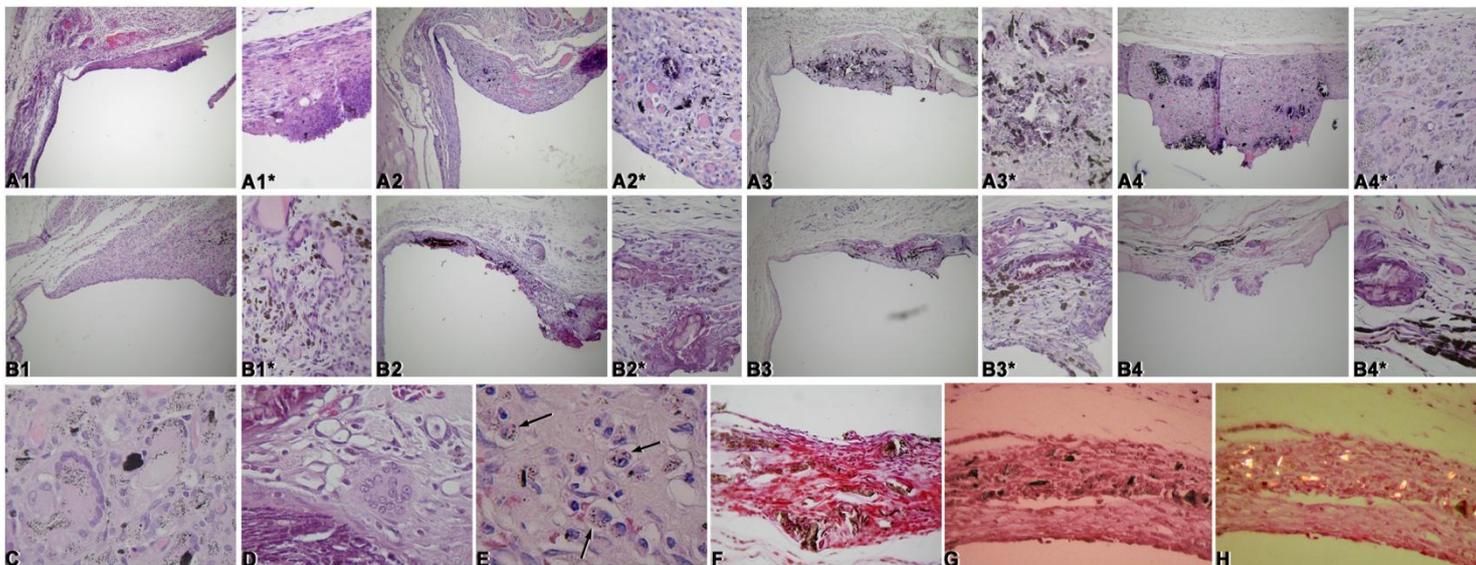


Figura 2: Análise da reação inflamatória e fenômenos correlatos para os grupos Fillapex e iROOT SP. Aumentos de 100x e 400x (*). Coloração H&E.
A) Fillapex: (A1), 7 dias; (A1*) cápsula de tecido de granulação com infiltrado inflamatório moderado e área de necrose (seta); (A2) 15 dias; (A2*) tecido de granulação mostrando neovascularização e numerosas partículas de cimento; (A3) 30 dias; (A3*) tecido de granulação com partículas de cimento e extensas áreas de necrose. (A4), 90 dias; (A4*) cápsula de tecido de granulação com partículas de cimento associadas a CGMNs. **B) iROOT SP:** (B1), 7 dias; (B1*) tecido de granulação com infiltrado inflamatório moderado, neovascularização e partículas de cimento; (B2) 15 dias; (B2*) tecido de granulação com áreas de necrose; (B3) 30 dias; (B3*) tecido de granulação com áreas de necrose e partículas de cimento; (B4) 90 dias; (B4*) Cápsula de tecido conjuntivo fibroso com área focal de necrose e partículas de cimento. **C)** CGMNs, tipo Langhans, fagocitando as partículas de Fillapex. Aumento de 1000X. **D)** CGMN do tipo corpo estranho associada à área de necrose por coagulação. **E)** macrófagos (setas) fagocitando as partículas de Fillapex. **F)** área de necrose corada pela técnica de Von Kossa. **G)** Coloração de Von Kossa mostrando áreas enegrecidas compatíveis com as partículas de Fillapex. **H)** Mesma área submetida à luz polarizada.

Referências

1. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as root end filling material. *J Endod* 1993;19:591-95.
2. Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furca perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;79:756-63.
3. Holland R, Otoboni Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 2001;27: 281-84.
4. Main C, Mirzayan N, Shabahang S, Torabinejad M. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. *J Endod* 2004;30:80-3.
5. Torabinejad M, Hong C, McDonald F, Pitt Ford TR. Investigation of mineral trioxide aggregate for root end filling in dogs. *J Endod* 1995;21:603-8.
6. Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc* 1996;127:1491-94.
7. Felipe WT, Felipe MCS, Rocha MJC. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod J* 2006; 39: 2-9.
8. Holland R, Souza V, Nery MJ, Filho JAO, Bernabé PFE, Dezan E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999; 25:161-6.
9. Economides N, Pantelidou O, Kokkas A, Tziafas D. Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate (MTA) as root-end filling material. *Int Endod J* 2003; 36: 44-8.

10. Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, Junior ED, Murata SS. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod* 2002; 28: 173-76.
11. Sarkar N, Caiedo P, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005; 31: 97-100.
12. Tay FR, Pasley DH, Rueggeberg FA, Loushine RJ, Weller RN. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the Portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. *J Endod* 2007; 33: 1347-51.
13. Tay FR, Pashley D H. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomater* 2008; 29:1127-37.
14. Reyes-Carmona JF, Felipe M S, Felipe WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *J Endod* 2009; 35:731-36.
15. Scarparo RK, Haddad D, Acasigua GAX, Fossati ACM, Fachin EVF, Grecca FS. Mineral Trioxide Aggregate-based sealer: Analysis of tissue reactions to a New Endodontic Material. *J Endod* 2010; 36: 1174-78.
16. Gandolfi, M.G. Pagani S, Perut F, Ciapetti G, Baldini N, Mongiorgi R, Prati C. Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response. *J Biomed Mater Res* 2008; 87: 477-86.
17. Lee YL, Lee BS, Lin FH, Lin AY, Lan WH, Lin CP. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. *Biomater* 2004; 25: 787-93.
18. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghoddusi J, Kheirieh S, Brink F. Comparison of Mineral Trioxide Aggregate's composition with

- Portland Cements and a New Endodontic Cement. *J Endod* 2009; 35:243-50.
19. Dubok VA. Bioceramics: yesterday, today, tomorrow. *Powder Metal and Metal Cer* 2000; 39:381-94.
 20. De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI; Granjeiro JM. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. *J Endod* 2009; 35: 1387-90.
 21. Zhang W, Li Z, Peng B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium-silicate-based canal filling material. *Int Endod J* 2010;43:769-74.
 22. Yuan Z, Peng B, Jian H, Bian Z, Yan P. Effect of Bioaggregate on mineral-associated gene expression in osteoblast cells. *J Endod* 2010;36:1146-48.
 23. Park JW, Hong SH, Kim JH, Lee SJ, Shin SJ. X-ray diffraction analysis of White ProRoot MTA and Diadent Bioaggregate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:155-58.
 24. Zhang H, Pappen FG, Haapasalo M. Dentin enhances the antibacterial effect of Mineral Trioxide Aggregate and Bioaggregate. *J Endod* 2009;35:221-24.
 25. Yan P, Yuan Z, Jiang H, Peng B, Bian Z. Effect of Bioggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J* 2010;43:1116-2.
 26. Zhang W, Li Z, Peng B. Effects of iRoot SP on mineralization-related genes expression in MG63 cells. *J Endod* 2010;36:1978-82.
 27. Bin CV, Valera MC, Camargo SEA, Rabelo SB, Silva GO, Balducci, I, Camargo CHR. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 2012;38:495-500.
 28. Morgental RD, Vier-Pelisser FV, Oliveira SD, Antunes FC, Cogo DM, Kopper PMP. Antibacterial activity of two MTA-based root canal sealers. *Int Endod J* 2011;44:1128-33.

29. Reyes-Carmona, JF, Santos A, Figueiredo CP, Baggio CH, Felipe MCS, Felipe WT, Cordeiro MM. Host–mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. *J Endod* 2010; 36: 1347-53.
30. Costa CAS. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: Estrela C. Metodologia Científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo, Artes Médicas, 2001. Cap. 9, p.147-60.
31. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to Mineral Trioxide and Amalgam. *J Endod* 2004;30:95-9.
32. Moretton,TR, Brown Jr CE, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res* 2000;52:528-533.
33. Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod* 1981;7:355-69.
34. Safavi KE, Pascon EA, Langeland K. Evaluation of tissue reaction to endodontic materials. *J Endod* 1983;9:421-9.
35. Shahi S, Saeed R, Lotfi M, Hamid RY, Gaderian AR. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. *J Endod* 2006;32:776-80.
36. American National Standards Institute/Revised American National Standards Institute American Dental Association, Document n.41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. New York, NY: American National Standards Institute; 1979.
37. Hammad HM, Mohammed AH, Al-Omari, WM. Histological evaluation of rat tissue response to GMTA, Retroplast, and Geristore retrograde filling materials. *Aust Endod J* 2011;37:18-25.

38. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LTA, Nery MJ, Otoboni-Filho JA, Dezan Jr E, Bernabé PFE. Rat tissue reaction to MTA Fillapex. *Dental Traumat* 2011;12:1-5.
39. Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariahhasi M, Saghiri A, Zand V, Rahimi S, Saghiri MA. Influence of White versus Gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. *J Endod* 2008;34:715-17.
40. Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari HR, Gaderian AR. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. *J Endod* 2006;32:776-80.
41. Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of connective tissue to Amalgam, Intermediate Restorative Material, Mineral Trioxide Aggregate, and Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Chlorhexidine. *J Endod* 2006;32:1094-96.
42. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review-part I: Chemical, Physical, and Antibacterial properties, *J Endod* 2010;36:16-27.
43. Economides N, Kovatsi-Kotsaki VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod* 1995;21:122-27.
44. Ørstavik D, Mjör IA. Histopathology and X-ray microanalysis of the subcutaneous tissue response to endodontic sealers. *J Endod* 1988;14:13-23.
45. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 7ªed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2005. 1592 p.
46. Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, John AS, George A. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod* 2008;34:421-26.

REFERÊNCIAS³

- ALANEZI, A.Z. et al. Cytotoxicity evaluation of Endosequence root repair material. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 109, n.3, p.122-25, March 2010.
- ASGARY S. et al. Chemical composition of Mineral Trioxide Aggregates. **J. Endod.**, Baltimore, v.31, n.2, p.101-03, Feb. 2005.
- ASGARY S. et al. Comparison of Mineral Trioxide Aggregate's Composition with Portland Cements and a New Endodontic Cement. **J. Endod.**, Baltimore, v.35, n.2, p.243-50, Feb. 2009.
- BARRIESHI-NUSAIR, K.M.; QUDEIMAT, M.A. A prospective clinical study of mineral trioxide for parcial pulpotomy in cariously exposed permanent teeth. **J. Endod.**, Baltimore, v.32, n.8, p.731-35, Aug. 2006.
- BER, B.S; HATTON, J.F; STEWART, G.P. Chemical modification of ProRoot MTA to improve handling characteristics and decrease setting time. **J. Endod.**, Baltimore, v. 33, n. 10, p. 1231-34, Oct. 2007.
- BIN, C.V. et al. Citotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on Mineral Trioxide Aggregate. **J. Endod.**, Baltimore, v.38, n.4, p.495-500, April 2012.
- BORTOLUZI, E.A. et al. The use of a setting accelerator and its effect on pH and calcium ion release of Mineral Trioxide Aggregate and White Portland Cement. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, n.12, p. 1194-97, Dec. 2006.
- BOZEMAN, T. B.; LEMON, R. R.; ELEAZER, P. D. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, n. 5, p. 425-428, May 2006.
- CAMILLERI, J. et al. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.38, n.11, p.834-42, Nov. 2005.

³ Baseada na NBR 6023: 2002 da ABNT.

COSTA, C.A.S. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: ESTRELA, C. **Metodologia Científica: ensino e pesquisa em odontologia.** São Paulo, Artes Médicas, 2001. Cap. 9, p.147-60.

CUMMINGS, N.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate (MTA) as an isolating barrier for internal bleaching. **J. Endod.**, Baltimore, v.21, n.4, p. 228, April 1995.

DESAI, S.; CHANDLER, N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. **J. Endod.**, Baltimore, v.35, n.4, p. 475-80, April 2009.

DE-DEUS, G. et al. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. **J. Endod.**, Baltimore, v.35, n.10, p. 1387-90, Oct. 2009.

DUARTE, M.A.H et al. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v.95, n.3, p. 345-7, Mar. 2003.

DUBOK, V.A. Bioceramics: yesterday, today, tomorrow. **Powder Metal. and Metal Ceram.**, v.39, n.7-8, p.381-94, July 2000.

FAYYAD, D.M. Cytocompatibility of new bioceramic-based materials on human fibroblast cells. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.112, n.12, p.137-42, Dec. 2011.

FELIPPE, W.T.; FELIPPE M.C.S.; ROCHA, M.J.C. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.39, n.1, p.2-9, Jan. 2006.

GANDOLFI, M.G. et al. Innovative silicate-based cements for endodontics: a study of osteoblast-like cell response. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v. 87, n.2, p.477-86, Nov. 2008.

GOMES-FILHO, J.E. et al. Reaction of rat connective tissue to a new calcium hydroxide-based sealer. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.106, n.2, p.71-6, August 2008.

GOMES-FILHO, J.E. et al. Rat tissue reaction to MTA Fillapex. **Dental Traumat.**, Copenhagen, n.12, p.1-5, Dec. 2011.

HENCH, L. L. Bioceramics: from concepts to clinic. **J. Am. Cer. Society**, Malden, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, July 1991.

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

HOLLAND, R. et al. Reaction of dogs teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or glass ionomer sealer. **J. Endod.**, Baltimore, v.25, n.11, p. 728-30, Nov. 1999b.

HOLLAND, R. et al. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. **J. Endod.**, Baltimore, v.27, n.4, p. 281-84, April 2001.

HOLLAND R. et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. **J. Endod.**, Baltimore, v. 28, n. 3, p. 173-76, March 2002.

KOMABAYASHI, T.; SPANGBERG, L.S.W. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyser. **J. Endod.**, Baltimore, v. 34, n. 1, p. 94-98, Jan. 2008.

KOGAN, P.; HE, J.; GLICKMAN, G.N. The effects of various additives on setting properties of MTA. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, n. 6, p. 569-72, June 2006.

LEE, S.J.; MONSEF, M.; TORABINEJAD, M. Sealing ability of mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **J. Endod.**, Baltimore, v.19, n.11, p.541-44, Nov. 1993.

LEE, Y.L. et al. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. **Biomaterials**, Oxford, v. 25, n.5, p.787-93, Feb. 2004.

LOUSHINE B.A. et al. Setting properties and cytotoxicity evaluation of a premixed Bioceramic root canal sealer. **J. Endod.**, Baltimore, v.37, n.5, p.673-77, May 2011.

MAH, T. et al. Periapical inflammation affecting coronally-inoculated dog teeth with root filling augmented by white MTA orifice plugs. **J. Endod.**, Baltimore, v.29, n.7, p.442-46, July 2003.

MAHDI, J.G. et al. Calcium salicylate-mediated apoptosis in human HT-1080 fibrosarcoma cells. **Cell Prolif.**, v.39, n.4, p. 249-60, Apr. 2006.

MAIN, C. et al. Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. **J. Endod.**, Baltimore, v.30, n.2, p.80-3, Feb. 2004.

MENEZES, R. et al. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular white Portland cement as wound dressings. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.98, n.3, p.376-9, Sep. 2004.

MORETTON, T. R. et al. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.52, n. 3, p. 528-533, Oct/Dec. 2000.

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

OLSSON, B.; SLIWJOWSKI, A.; LANGELAND, K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. **J. Endod.**, Baltimore, v.7, n.8, p.355-69, Aug. 1981.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral Trioxide Aggregate: a comprehensive literature review-part I: chemical, physical and antibacterial properties. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, n.1, p.16-27, Jan. 2010.

PARK, J.W. et al. X-ray diffraction analysis of White ProRoot MTA and Diadent Bioaggregate. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St.Louis, v. 109, n.1, p. 155-58, Jan. 2010.

PITT FORD, T. R. et al. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St.Louis, v.79, n.6, p.756-63, June 1995.

PITT FORD, T.R. et al. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 127, n.10, p. 1491-94, Oct. 1996.

REYES-CARMONA, J. F.; FELIPPE, M. S.; FELIPPE, W.T. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. **J. Endod.**, Baltimore, v. 35, n. 5, p. 731-736, May 2009.

REYES-CARMONA, J. F. et al. Host–mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, n. 8, p. 1347-1353, Aug. 2010.

ROY C.O.; JEANSONNE B. G.; GERRETS T.F. Effect of an acid environment on leakage of root-end filling materials. **J. Endod.**, Baltimore, v. 27, n. 1, p. 7-8, Jan. 2001.

SAIDON, J. et al., Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 95, n.4, p. 483-9, April 2003.

SARKAR, N. et al. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. **J. Endod.**, Baltimore, v. 31, n. 2, p. 97-100, Feb. 2005.

SCARPARO, R.K. et al. Mineral Trioxide Aggregate-based sealer: Analysis of Tissue Reactions to a New Endodontic Material. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, n. 7, p. 1174-78, July 2010.

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.117-28. Jan/June 1991.

SHAHI, S. et al. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, n.8, p.776-80, Aug. 2006.

SCHWARTZ, R. S. et al. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.130, n.7, p. 967-75, July 1999.

SUMER, M. et al. Reactions of connective tissue to Amalgam, Intermediate Restorative Material, Mineral Trioxide Aggregate, and Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Chlorhexidine. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, n. 11, p. 1094-96, Nov. 2006.

TAY, F. R. et al. Calcium phosphate phase transformation produced by the interaction of the Portland cement component of white mineral trioxide aggregate with a phosphate-containing fluid. **J. Endod.**, Baltimore, v. 33, n. 11, p. 1347-1351, Nov. 2007.

TAY, F. R.; PASHLEY D. H. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. **Biomaterials**, Oxford, v.29, n.8, p.1127-37. Mar. 2008.

TORABINEJAD, M.; WATSON T.F.; PITT FORD T.R. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as root end filling material. **J. Endod.**, Baltimore, v. 19, n. 12, p. 591-95, Dec. 1993.

TORABINEJAD, M. et al. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. **J. Endod.**, Baltimore, v. 20, n. 4, p. 159-63, Apr. 1994.

TORABINEJAD M. et al. Investigation of mineral trioxide aggregate for root end filling in dogs. **J. Endod.**, Baltimore, v.21, n.12, p.603-8, Dec. 1995.

TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **J. Endod.**, Baltimore, v.25, n.3, p.197-205, Mar. 1999.

TRONSTAD L. et al. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. **J. Endod.**, Baltimore, v. 7, n. 1, p. 17-21, Jan. 1981.

TUNA, E.B. et al. Fracture resistance of immature teeth filled with BioAggregate, mineral trioxide and calcium hydroxide. **Dental Traumatol.**, Copenhagen, v. 27, n.3, p.174-78, March 2011.

VOSOUGHOSSEINI, S. et al. Influence of White versus Gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. **J. Endod.**, Baltimore, v. 34, n. 6, p.715-17, June 2008.

YALTIRIK, M. Reactions of connective tissue to Mineral Trioxide Aggregate and Amalgam. **J. Endod.**, Baltimore, v. 30, n. 2, p. 95-99, Feb. 2004.

YAN, P. et al. Effect of Bioaggregate on differentiation of human periodontal ligament fibroblasts. **Int. Endod. J.**, Oxford, v.43, n.12, p.1116-21, Dec. 2010.

YUAN, Z. et al. Effect of Bioaggregate on mineral-associated gene expression in osteoblast cells. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, n.7, p.1146-48, July 2010.

ZHANG, H.; PAPPEN, F.G.; HAAPASALO, M. Dentin enhances the antibacterial effect of Mineral Trioxide Aggregate and Bioaggregate. **J. Endod.**, Baltimore, v. 35, n.2, p.221-24, Feb. 2009.

ZHANG, W.; LI, Z.; PENG, B. Ex vivo cytotoxicity of a new calcium-silicate-based canal filling material. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 43, n. 7, p. 769-74, Jul. 2010a.

ZHANG, W.; LI, Z.; PENG, B. Effects of iRoot SP on mineralization-related genes expression in MG63 cells. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, n. 12, p. 1978-82, Dez. 2010b.

ZOUFAN, K. et al. Cytotoxicity evaluation of Gutta Flow and Endo Sequence BC sealers. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.112, n.5, p.657-61, Nov. 2011.

Apêndices

APÊNDICE

METODOLOGIA EXPANDIDA

Para a realização da fase experimental desta pesquisa, todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

1. Obtenção e preparo dos tubos de dentina

A amostra foi constituída de 160 dentes humanos unirradiculados extraídos por motivos alheios a esta pesquisa e obtidos através de doação do Banco de Dentes da UFSC (Florianópolis, SC). A porção coronária e apical de cada dente foi removida através de cortes transversais realizados com um disco de carborundum (Macrodent S.A., São Paulo, SP, Brasil) a fim de se obter um tubo de aproximadamente 7 mm de comprimento e 1,7mm de diâmetro externo. Com o objetivo de padronizar o diâmetro interno dos tubos, o espaço correspondente ao canal radicular foi ampliado através do uso sequencial de brocas Gates-Glidden 2 à 5, alcançando um diâmetro interno de 1,30 mm. Os tubos foram então lavados em água destilada e esterilizados em autoclave (Figura 3).

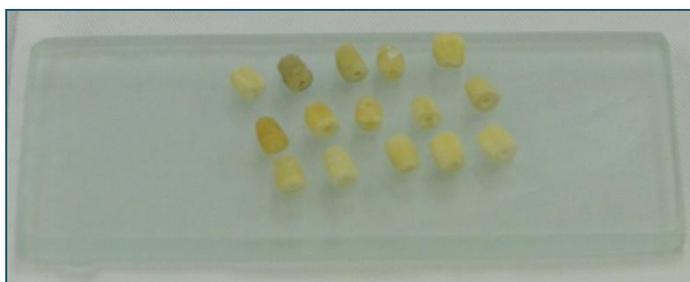


Figura 3. Tubos de dentina após preparo e esterilização.

Previamente à implantação nos animais, os tubos foram irrigados com solução de EDTA 17% por 3 minutos e hipoclorito de sódio 1% pelo mesmo tempo e secos com gaze e cones de papel estéreis (REYES-CARMONA et al.2010).

Logo em seguida, os 160 tubos de dentina foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos (n=32) e preenchidos com os cimentos experimentais ou deixados vazios para controle negativo (Figura 4): Grupo 1: controle; Grupo 2: MTA Branco (Angelus Soluções Odontológicas, PR, Brasil); Grupo 3: DiaRoot® Bioaggregate (DiaDent Group International, BC, Canada); Grupo 4: MTA Fillapex® (Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, PR, Brasil); Grupo 5, iROOT® SP (Innovative Bioceramics, Vancouver, Canadá).

Em relação aos cimentos que necessitavam de manipulação, como o Diaroot Bioaggregate e MTA Branco, foram seguidas as proporções e instruções recomendadas pelos fabricantes.



Figura 4. Cimentos utilizados no preenchimento dos tubos de dentina.

2. Intervenção cirúrgica – implantação dos tubos

Foram utilizados trinta e dois ratos machos adultos jovens (4-6 meses) (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com peso entre 250 e 300 gramas. Durante o período experimental os animais foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas higienizadas, medindo 42x34x17cm (4 animais por gaiola), em ambiente arejado sob temperatura de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e iluminado artificialmente, recebendo água *ad libitum* e alimentação constituída de ração comercial balanceada.

Os animais foram anestesiados por via intra-muscular, na face posterior da coxa, com associação de cloridrato de ketamina (Dopalen, Sespo Ind. e com. Ltda, Paulínia, SP), anestésico, e cloridrato de xilazina (Anasedan, Sespo Ind. e com. Ltda, Paulínia, SP), relaxante

muscular, analgésico e sedativo, nas doses de 25 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente. O tempo de trabalho para cada animal foi de aproximadamente 40 minutos. A conduta anestésica seguiu a tabela peso/dosagem estabelecida pelo Manual para Técnicos em Bioterismo do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Anexo C).

Na sequência, foi realizada tricotomia manual da região dorsal e antissepsia da área com solução de álcool iodado 1%. Foram realizadas 2 incisões longitudinais de aproximadamente 2 cm na região mediana do dorso de cada animal, uma anterior e outra posterior, utilizando lâmina de bisturi nº 15 (Eletromed - Comércio de Materiais Médicos Cirúrgicos, Manaus, Amazônia, Brasil). Lateralmente às incisões, foram feitas quatro divulsões de aproximadamente 2 cm, equidistantes, realizadas com tesoura de ponta romba: duas em direção escapular e duas em direção à região pélvica, a fim de se obter 4 lojas cirúrgicas. Em seguida, cada sítio recebeu 1 tubo de dentina preenchido com um dos cimentos. Cada tubo foi acoplado à ponta de um trocarte para facilitar a implantação, obedecendo a uma ordem previamente estabelecida para que houvesse rotatividade dos materiais em relação às regiões anatômicas. Tomou-se o cuidado de não realizar os implantes paralelos à linha de incisão, para evitar sua expulsão ou mobilidade.

Após a implantação nos 4 sítios cirúrgicos, confeccionou-se um quinto sítio, a partir da segunda incisão realizada no dorso dos ratos. Descolou-se o tecido lateralmente à incisão utilizando uma tesoura de ponta romba, de modo a obter um sítio entre as cavidades escapular e pélvica, do lado direito, para a implantação do tubo vazio (controle negativo), que foi implantado sempre no mesmo local, não participando da rotatividade entre os tubos. Cada um dos ratos recebeu 5 tubos de dentina, 4 preenchidos com os cimentos e 1 vazio. Finalizado o procedimento de implantação, as bordas das incisões foram unidas e suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon – Johnson & Johnson, Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos, SP) e os ratos receberam marcações nos rabos com tinta permanente para identificação dos grupos, de acordo com os períodos experimentais. Os animais foram colocados em gaiolas individuais e acompanhados até que se recuperassem da anestesia, sendo observados diariamente para a verificação do comportamento, com a finalidade de evitar intercorrências que pudessem comprometer o experimento (Figura 5). Passados sete dias, os animais foram novamente colocados em gaiolas coletivas, numa proporção de 4 animais por gaiola.

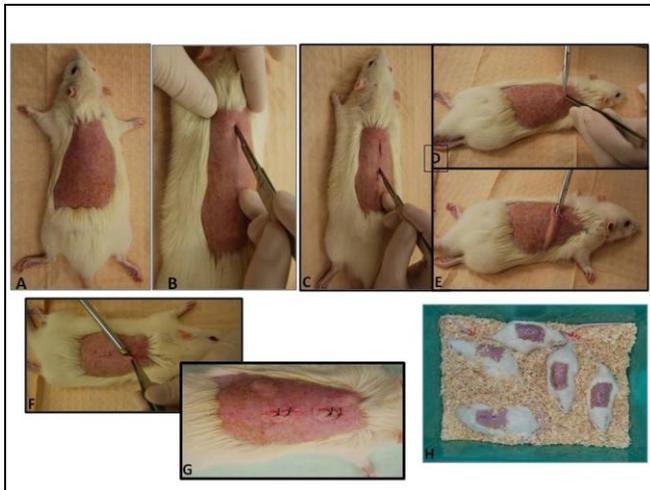


Figura 5. Sequência de implantação cirúrgica nos ratos.

3. Eutanásia dos animais e remoção dos tubos

Após os períodos experimentais de 7, 15, 30 e 90 dias, foi realizada a eutanásia dos animais em câmara de CO₂, sendo 8 animais por período. Após a eutanásia, a região dorsal dos ratos foi depilada e os tubos foram localizados por palpação e dissecados juntamente com o tecido circundante. As peças contendo os tubos e tecidos foram removidas, distendidas em papel cartão e fixadas em solução de formol a 10% tamponado, acondicionadas em frascos unitários, contendo a identificação do rato e grupo, por um período mínimo de 24 horas (Figura 6, A-D). Passado esse período, os tubos foram encaminhados para a fase laboratorial.

4. Processamento laboratorial

4.1 Macroscopia

Foram realizados cortes macroscópicos para a remoção do excesso de tecido; o formato das peças ficou retangular, localizando-se ao centro, o tubo de dentina e ao redor, tecido suficiente para análise microscópica. A seguir, as peças foram submersas em água destilada por 1 hora, com o objetivo de remover o excesso de formol.

4.2 Remoção dos tubos de dentina

Foi utilizada uma pinça clínica para apreender o tubo de cada espécime enquanto uma incisão era realizada longitudinal e lateralmente no tecido que envolvia o tubo de dentina, utilizando lâmina de bisturi nº11 montada em cabo nº3. Esta etapa foi realizada de maneira extremamente cuidadosa, com incisão firme e única, evitando que o tecido fosse dilacerado, principalmente na região de sua embocadura, local de interesse da investigação. Após a incisão, com o auxílio de uma sonda interproximal modificada desprende-se cuidadosamente o tecido que envolvia o tubo; a sonda foi então passada por baixo do tubo, removendo-o. Neste momento foi realizado um corte na extremidade da peça, correspondente a uma das extremidades do tubo, para servir de referência posteriormente, no momento da inclusão em parafina. As peças foram acondicionadas em cassetes unitários com a devida identificação dos espécimes na parte externa e interna dos cassetes (Figura 6, E-N).

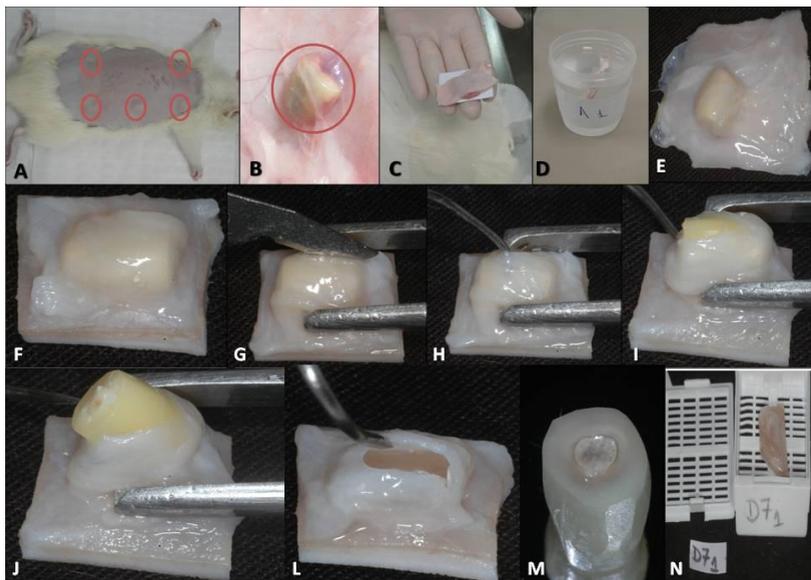


Figura 6. Sequência de remoção dos tubos e tecido circundante.

4.3 Desidratação, diafanização e inclusão em parafina

Para a desidratação dos espécimes foram utilizadas cadeias crescentes de etanol e para a diafanização foi utilizado o xilol. A seguir, as peças foram embebidas e incluídas manualmente em parafina. Antes

da inclusão, tomou-se o cuidado de abrir a parte central da cápsula que envolvia o tubo, retornando à sua forma antes da remoção do tubo, e mergulhando-a em parafina líquida para que o espaço vazio fosse preenchido. Em seguida, a inclusão foi realizada observando-se a marcação que havia sido feita no tecido anteriormente.

Após a obtenção dos blocos de parafina, cada um foi identificado de acordo com o grupo e período experimental do espécime que continha. Foi utilizado um micrótomo para confecção de cortes semi-seriados de 4 micrômetros, feitos no sentido longitudinal dos tubos, de modo a englobar suas duas extremidades. Cada espécime foi cortado até que se atingisse aproximadamente a metade do espaço deixado pelo tubo. A partir daí, colhiam-se cerca de 5 cortes seriados por espécime, os quais foram posteriormente corados pelas técnicas H&E e Von Kossa. Após avaliação em microscópio óptico, os cortes positivos para Von Kossa foram observados também em microscópio de luz polarizada (microscópio Zeiss Primo), para observação de estruturas birrefringentes.

5. Análise microscópica

A análise das respostas do tecido conjuntivo em contato com o material foi realizada de maneira semi-quantitativa e descritiva, considerando 3 campos em cada extremidade do tubo e utilizando um microscópio óptico Axiostar da Zeiss (aumentos de 5x 10x 40x). As avaliações foram realizadas por 2 observadores previamente calibrados. Após a calibração, os examinadores realizaram o teste Kappa intra e inter examinadores, para avaliar a confiabilidade das leituras realizadas e a concordância entre os mesmos (Tabelas 1 e 2).

Coeficiente Kappa	Nível de Concordância
<0,00	-
0,00 – 0,20	Baixo
0,21 – 0,40	Médio
0,41 – 0,60	Moderado
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1,00	Quase perfeito

Tabela 1. Critérios de classificação dos níveis de concordância do coeficiente Kappa.

Variável avaliada	Coeficiente Kappa Intra Examinador	Coeficiente Kappa Inter Examinadores
Necrose	1,00	1,00
Definição da Cápsula	0,855	0,855
Composição da cápsula	1,00	1,00
Intensidade Inflamação	0,919	0,919
CGMNs	1,00	0,919
Macrófagos	0,894	0,889
Neovasos	1,000	1,000

Tabela 2. Índices Kappa Intra e Inter examinadores.

Todas as lâminas foram fotomicrografadas utilizando uma câmera digital Canon Power Shot A62 acoplada a um microscópio óptico Axiostar (Zeiss).

Os espécimes positivos para a coloração Von Kossa foram registrados de maneira descritiva, bem como aqueles que apresentaram estruturas birrefringentes à luz polarizada.

Para a avaliação da reação tecidual, uma modificação do critério descrito por Yaltirik et al. (2004) foi utilizada. Os seguintes eventos foram analisados:

5.1- Organização da cápsula conjuntiva: classificada de acordo com a presença ou ausência de limites definidos entre a cápsula e o tecido conjuntivo adjacente. **0**, não definida; **1**, definida.

5.2- Espessura da cápsula conjuntiva: definida como a extensão do tecido conjuntivo formado ao redor do tubo, mensurada em aumento de 10x e expressa em micrômetros, utilizando o programa Image J. Primeiramente o programa ImageJ foi configurado para fornecer as medidas, em micrômetros, do segmento selecionado. Para essa configuração, uma escala micrométrica foi acoplada ao microscópio e fotografada, utilizando o mesmo aumento (10x) padronizado para a fotografia das lâminas. A seguir, o programa foi inicializado, selecionando-se o arquivo que continha a imagem da escala, para que fosse aberto (Figura 7).

5.3- Composição da cápsula conjuntiva: **1**, tecido de granulação: ricamente celularizado e vascularizado; **2**, tecido fibroso: ricamente colagenizado e pouco celularizado.

5.4- Intensidade da inflamação: definida como a concentração de células inflamatórias no interior ou ao redor da cápsula de tecido conjuntivo, em aumento de 40x, através dos escores **0**, inflamação ausente ou discreta – até 10 células inflamatórias por campo; **1**, inflamação leve – acima de 10 e até 25 células inflamatórias por campo; **2**, inflamação moderada – acima de 25 e até 65 células inflamatórias por campo; **3**, inflamação severa – acima de 65 células por campo. Foi obtida uma média do número de células em 3 áreas separadas, em cada uma das extremidades dos tubos.

5.5- Células gigantes: **0**, ausente; **1**, presente.

5.6- Macrófagos: **0**, ausente; **1**, presente.

5.7- Necrose tecidual: **0**, ausente; **1**, presente.

5.8- Neovascularização: **0**, ausente (menos de 10 neovasos por campo); **1**, presente (10 ou mais neovasos por campo).

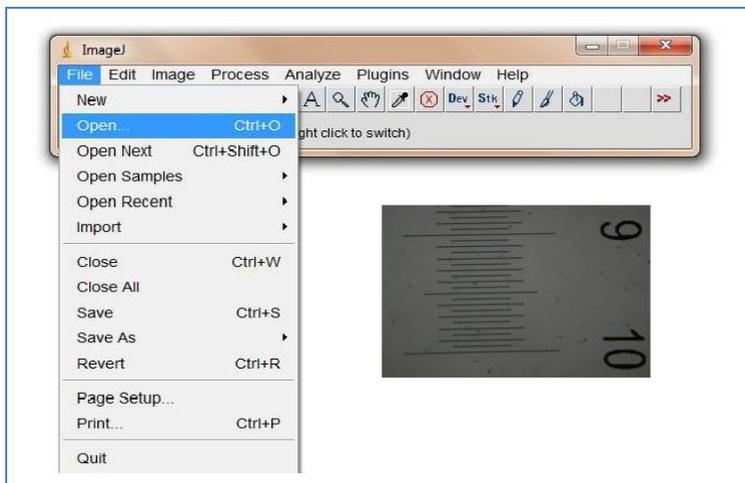


Figura 7. Programa Image J e escala para medição das cápsulas.

Configuração do programa Image J:

Para a configuração do programa, deve-se traçar um segmento de medida conhecida na escala e selecionar as opções: Analyse > Set Scale (Figura 8). A partir daí, uma nova janela será aberta, na qual deve-se especificar a medida previamente conhecida do segmento traçado, e selecionar a unidade de medida adotada; em nosso caso, micrômetros. Marca-se a opção Global, para que a padronização estabelecida neste momento seja utilizada para a medição de todas as cápsulas, posteriormente. A partir daí, podemos abrir novas imagens e realizar as medições da seguinte forma: seleciona-se a imagem na qual deseja-se efetuar a mensuração; traça-se o segmento na região a ser medida e seleciona-se as opções: Analyse > Measure. Assim, a medida do segmento selecionado será fornecida, na unidade de medida previamente selecionada (Figura 9). Todas as lâminas foram fotomicrografadas em aparelho Axios Plus (Zeiss) acoplado à câmera digital Canon Power Shot A62.

Os espécimes que receberam o escore **0** na variável **5.6 (Organização da Cápsula Conjuntiva)** não foram mensuradas, pela impossibilidade de estabelecimento dos limites da cápsula para mensuração.

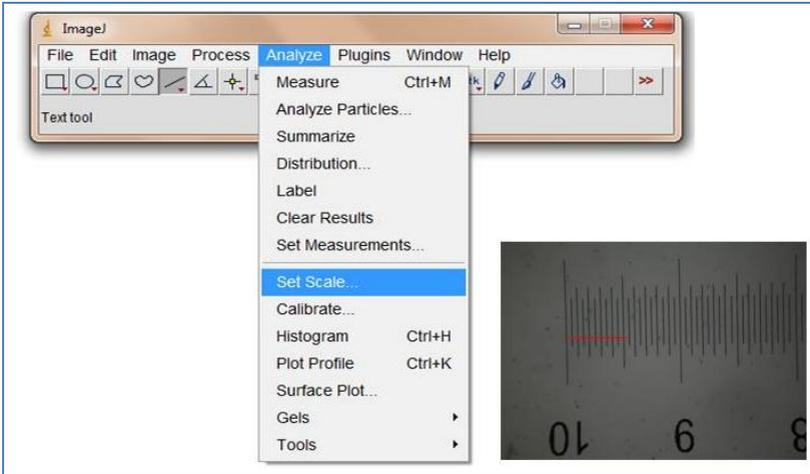


Figura 8. Traçado para configuração do programa Image J.

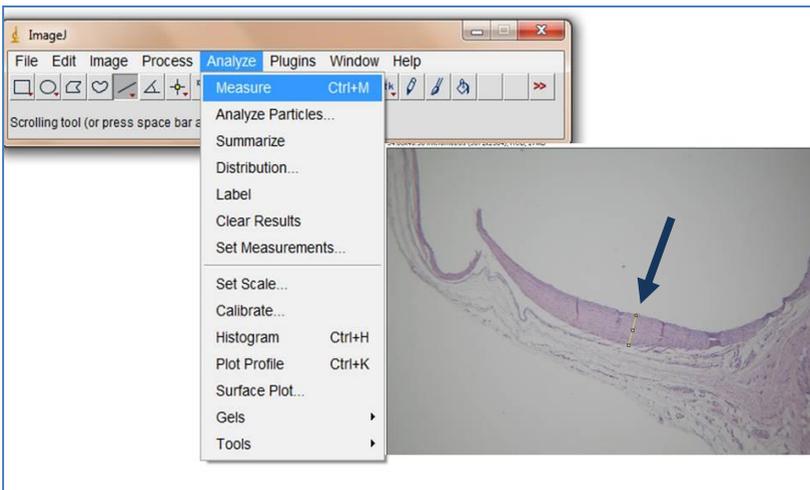


Figura 9. Seleção da área da cápsula a ser mensurada em micrômetros.

Para a análise estatística da espessura das cápsulas foram utilizadas as medidas exatas de cada cápsula em micrômetros.

6. Análise estatística

Foi realizado o Teste Exato de Fischer para comparações entre as variáveis analisadas, sendo considerado o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Os 4 cimentos e o controle foram comparados nos 4

períodos experimentais. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para a variável *espessura de cápsula conjuntiva*, comparando-se os 4 cimentos e o controle nos 4 períodos experimentais. O Teste de correlação de Spearman foi aplicado a todas as variáveis, nos 4 períodos experimentais.

Anexos

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
 Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão
 Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CERTIFICADO Nº 2166

O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º 0584-GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o conteúdo no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

APROVADO

PROCESSO: 2166

FR: 445500

TÍTULO: Comentários à base de MTA: análise de biocompatibilidade e da interface cimento dentina.

AUTOR: Elena Riet Correa Rivoiro, EDUARDO ANTUNES BORTOLUZZI, CLAUDIA CAROLINE BOSIO, GABRIELA SANTOS FELIPPE

FLORIANÓPOLIS, 03 de Outubro de 2011.

 Coordenador do CEPSH UFSC

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00555

Título

Cimentos à base de MTA: análise da biocompatibilidade e da interface cimento/dentina

Data de Entrada

21/10/2010

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo
03/12/2010

Considerações

Ofício nº 254/CEUA/PRPE/2010

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Eduardo Antunes Bortoluzzi, Departamento de Odontologia – CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por dois ano(s), para a utilização de trinta e quatro ratos (*Rattus Norvegicus*).

- Procedência do animal: Biotério Central da UFSC.

- Processo cadastrado sob o número: 23080.040917/2010-80

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ONLINE CEUA.

Atenciosamente,

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 10/03/2013

Data 10/12/2010



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**

ANEXO C – Relação Peso/Dosagem para anestesia dos animais.

Rato Peso (g)	ANESTESIA		
	Relaxante Muscular (M.P.A.)	XILAZINA	QUETAMINA
	Francotar, Dopalen, Vetaset ml.	Anasedan, rompun ml.	Francotar, Dopalen, Vetaset ml.
100	.025	.050	.025
110	.027	.055	.027
120	.030	.060	.030
130	.032	.065	.032
140	.035	.070	.035
150	.037	.075	.037
160	.040	.080	.040
170	.042	.085	.042
180	.045	.090	.045
190	.047	.095	.047
200	.050	.100	.050
210	.052	.105	.052
220	.055	.110	.055
230	.057	.115	.057
240	.060	.120	.060
250	.062	.125	.062
260	.065	.130	.065
270	.067	.135	.067
280	.070	.140	.070
290	.072	.145	.072
300	.075	.150	.075
310	.077	.155	.077
320	.080	.160	.080
330	.082	.165	.082
340	.085	.170	.085
350	.087	.175	.087

