UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

FAUSTO RODRIGO VICTORINO

**Análise da reação do tecido conjuntivo de ratos ao implante de
pastas experimentais à base de própolis.**

Bauru
2009

FAUSTO RODRIGO VICTORINO

**Análise da reação do tecido conjuntivo de ratos ao implante de pastas
experimentais à base de própolis.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Bauru
2009

Victorino, Fausto Rodrigo

V666a Análise da reação do tecido conjuntivo de ratos ao implante de pastas experimentais à base de própolis / Fausto Rodrigo Victorino. -- Bauru, 2009.

164p. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, em 21 de novembro de 2005.

Folha de Aprovação

FAUSTO RODRIGO VICTORINO

Dados Curriculares

Nascimento	15 de maio de 1979
Filiação	Vladimir Victorino Aparecida de Lourdes Gallego Victorino
1998 – 2002	Curso de Graduação em Odontologia na Universidade Estadual de Maringá – UEM.
2003 – 2005	Curso de Pós-Graduação em nível de Mestrado em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Maringá – UEM.
2004 – 2005	Curso de Especialização em Endodontia na Associação Maringaense de Odontologia – AMO/ABO.
2005 – 2009	Curso de Pós-Graduação em nível de Doutorado em Odontologia, Área de Concentração em Endodontia, na Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo – FOB/USP.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado à Silvia Veridiana Zamparoni Victorino, minha amada esposa, que com muita garra e sabedoria me deu suporte para enfrentar e superar todas as dificuldades desta importante etapa de minha vida.

"Façamos da interrupção um caminho novo. Da queda
um passo de dança, do medo uma escada, do sonho
uma ponte, da procura um encontro!"

Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e pela força que tem me dado para vivê-la em harmonia com os meus.

Aos meus pais Vladimir Victorino e Aparecida de Lourdes Gallego Victorino, pela educação que me deram, sempre norteada por princípios éticos e morais necessários para se viver dignamente. Muito obrigado.

À Minha esposa Silvia Veridiana Zamparoni Victorino e meus filhos Maria Luiza Zamparoni Victorino e João Pedro Victorino, por sempre estarem ao meu lado, sendo meu porto seguro. Amo muito vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante, exemplo de dedicação e profissionalismo, pela confiança depositada em minha pessoa, pelos ensinamentos e orientações, os quais contribuíram muito para meu crescimento profissional.

À Prof^a. Dr^a. Mirian Marubayashi Hidalgo, principal responsável pela idealização e concretização deste trabalho, por ter despertado em mim o interesse pela pesquisa e pela endodontia.

À Prof^a. Dr^a. Ciomar Aparecida Bersani-Amado, orientadora do mestrado, também responsável por este trabalho, quem viabilizou e colaborou com a fase cirúrgica com os ratos.

À Prof^a. Dr^a. Selma Lucy Franco, grande amiga e parceira em pesquisas com própolis, também responsável por este trabalho, quem manipulou todas as formulações de própolis, desde o mestrado.

Ao Prof. Dr. Alberto Consolaro, exemplo de pesquisador e mestre, pelos ensinamentos, orientações, conselhos e auxílio na análise das lâminas que muito contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho.

À colega Renata Consolaro, pelo auxílio na análise das lâminas e pela agradável convivência e troca de experiências.

Aos colegas de doutorado Adriana, Augusto, Ricardo e Jarcio, pela convivência, companheirismo e constante troca de experiências.

Aos Professores do Departamento de Endodontia: Prof. Dr. Ivaldo Gomes de Moraes, Prof. Dr. Norberti Bernardineli e Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia, pelos ensinamentos e lições transmitidas.

Aos colegas do mestrado Rodrigo (Digão), Ronald e Melina, pelos momentos agradáveis que tivemos juntos e pela troca de experiências. Em especial ao Ericson, quem me acolheu e guiou em Bauru no início do doutorado, quando tudo ainda era muito novo.

À Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP, representada pelo Diretor Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP, representada pela presidente Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

Aos funcionários do Departamento de Endodontia: Edimauro, Dona Neide, Patrícia e Suely, por todo apoio durante estes 4 anos.

A todos os funcionários da Biblioteca da FOB/USP, os quais sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos professores e funcionários da disciplina de Histologia da FOB/USP, por permitirem o processamento histotécnico no laboratório e em especial à Dani, pelo apoio e ajuda.

Aos funcionários Jailson e Célia do Laboratório de Inflamação da Universidade Estadual de Maringá, pelo companheirismo e fundamental apoio durante o manejo com os ratos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos, que de uma forma ou de outra colaboraram para concretização desta importante etapa de minha vida.

RESUMO

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar microscopicamente a resposta inflamatória do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos quando em contato com formulações à base de própolis (A70D e D70D). Foram utilizados 15 ratos machos da linhagem *Wistar*, com aproximadamente 40 dias de vida. Em períodos experimentais de 7, 15 e 30 dias, foram implantados tubos de polietileno contendo materiais diferentes, formando 4 grupos: Grupo I - Ca(OH)_2 , Grupo II - A70D, Grupo III - D70D, Grupo IV – Controle (tubo vazio). Após os períodos experimentais, os animais foram mortos e os tecidos contendo os implantes foram removidos para processamento histotécnico. Os cortes microscópicos semi-seriados de 5µm de espessura foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H.E.). A reação tecidual frente ao material utilizado foi analisada de forma semi-quantitativa e qualitativa. Para análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$. Os resultados mostraram intensa reação inflamatória para todas as pastas aos 7 dias, com intensa proliferação angioblástica, moderado infiltrado neutrofílico e necrose por coagulação no grupo do hidróxido de cálcio. Com o decorrer dos períodos a intensidade da reação diminuiu, com redução significativa em 30 dias. As pastas A70D e D70D apresentaram resultados semelhantes, porém aos 30 dias a reação se manteve mais intensa para a pasta D70D. Estes resultados sugerem a possibilidade da própolis ser utilizada como medicação intracanal.

Palavras-chave: própolis, endodontia, tecido subcutâneo, teste material.

ABSTRACT

ABSTRACT

Analysis of the tissue reaction of rats to experimental implantation of based propolis pastes.

The aim of this study was to evaluate the inflammatory tissue response of different based propolis pastes for endodontic use (A70D and D70D). 15 male rats of the Wistar strain, approximately 40 days of life were used. Polyethylene tubes containing different materials were divided in 4 groups: Group I - Ca(OH)_2 , Group II - A70D, Group III - D70D, Group IV - Control (empty tube). The inflammatory response of subcutaneous tissue was analyzed after 7, 15 and, 30 days. After the experimental periods, animals were killed and tissues containing the implants were removed and prepared using conventional histological procedures. Microscopic semi-serial sections of 5 μm in thickness were stained by the hematoxylin and eosin technique (HE). The tissue reaction was evaluated using semi-quantitative and qualitative criteria. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test with $p < 0.05$. The results showed intense inflammatory reaction in all the groups at the 7 day period. Intense proliferation of vessels, moderate neutrophilic infiltrate and necrosis by coagulation in the group of calcium hydroxide. The intensity of the reaction decreased with significant reduction after 30 days. The A70D and D70D pastes showed similar results, but at the 30 periods the most intense reaction was found in the D70D paste. These results suggest the possibility that propolis can be used as an intracanal medication.

Keywords: propolis, endodontics, subcutaneous tissue.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADROS

Quadro 1 - Distribuição dos animais e espécimes em função dos períodos experimentais e dos materiais analisados.....	68
--	----

FIGURAS

Figura 1 - Dimensões dos tubos de polietileno.....	69
Figura 2 - Descontaminação dos tubos de polietileno em hipoclorito de sódio 5,25%.....	69
Figura 3 - Hidróxido de cálcio P.A. e propilenoglicol	70
Figura 4 - Amostra das pastas de própolis A70D e D70D	70
Figura 5 - Preenchimento do tubo de polietileno com seringa Centrix	70
Figura 6 - Divulgação do tecido subcutâneo com tesoura de ponta romba.....	73
Figura 7 - Introdução do tubo de polietileno com material teste e vazio.....	73
Figura 8 - Distribuição dos tubos de polietileno no dorso dos animais.....	73
Figura 9 - Peça macroscópica.....	73
Figura 10 - Ficha para Anotação dos Dados da Análise Descritiva.....	76
Figura 11- CONTROLE - Tubo vazio - 7 dias.....	81
Figura 12- CONTROLE - Tubo vazio - 15 dias.....	83
Figura 13 - CONTROLE - Tubo vazio - 30 dias	85
Figura 14 - Ca(OH) ₂ - 7dias	89
Figura 15 - Ca(OH) ₂ - 15dias	91
Figura 16 - Ca(OH) ₂ - 30dias	93
Figura 17 – A70D - 7dias	97
Figura 18 - A70D - 15dias	99
Figura 19 - A70D - 30dias	101
Figura 20 - D70D - 7 dias	105
Figura 21 - D70D-15 dias	107
Figura 22 - D70D - 30dias	109

GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação gráfica dos resultados, em escores, do infiltrado neutrofilico de cada grupo nos três tempos experimentais.....	123
Gráfico 2 - Representação gráfica dos resultados, em escores, do espessura de cada grupo nos três tempos experimentais	124
Gráfico 3 - Representação gráfica dos resultados, em escores, do fibrosamento de cada grupo nos três tempos experimentais	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média (M) e desvio padrão (DP) dos escores do infiltrado neutrofílico dos grupos nos três períodos experimentais.	112
Tabela 2 - Média (M) e desvio padrão (DP) dos escores da espessura dos grupos nos três períodos experimentais.....	113
Tabela 3 - Média (M) e desvio padrão (DP) dos escores do fibrosamento dos grupos nos três períodos experimentais.	114
Tabela 4 - Teste Kruskal-Wallis. Comparação entre os grupos nos períodos de 7, 15 e 30 dias para cada um dos critérios de análise.....	115
Tabela 5 - Teste de Dunn. Comparações individuais entre os grupos quanto ao infiltrado neutrofílico aos 7 dias.	116
Tabela 6 - Comparações individuais entre os grupos quanto ao infiltrado neutrofílico aos 15 dias	116
Tabela 7 - Comparações individuais entre os grupos quanto à espessura aos 30 dias	117
Tabela 8 - Comparações individuais entre os grupos quanto ao fibrosamento aos 7 dias	117
Tabela 9 - Comparações individuais entre os grupos quanto ao fibrosamento aos 15 dias	118
Tabela 10 - Comparações individuais entre os grupos quanto ao fibrosamento aos 30 dias	118

Tabela 11 - Teste Kruskal-Wallis. Comparação entre os 3 períodos, 7, 15 e 30 dias, nos grupos para cada critério de análise	119
Tabela 12 - Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo A70D quanto ao infiltrado neutrofílico	119
Tabela 13 - Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo D70D quanto ao infiltrado neutrofílico	120
Tabela 14 - Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo controle quanto à espessura	120
Tabela 15 - Tabela 15 – Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo Ca(OH) ₂ quanto à espessura	120
Tabela 16 - Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo A70D quanto à espessura	121
Tabela 17 - Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo D70D quanto à espessura.....	121
Tabela 18 - Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo controle quanto ao fibrosamento	121
Tabela 19 - Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo A70D quanto ao fibrosamento.....	122
Tabela 20 - Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo D70D quanto ao fibrosamento.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

m – metro

cm – centímetro

mm – milímetro

µm – micrometro

µg - micrograma

mg – miligrama

Kg - kilograma

mg/Kg – miligrama por kilograma

mL – mililitro

µg/mL – micrograma por mililitro

mg/mL – miligrama por mililitro

ppm – parte por milhão

% - percentagem

h – hora

PVPI – polivinilpirrolidona

CEEPA – comitê de ética no ensino e pesquisa em animais

°C – grau celsius

MEV – microscópio eletrônico de varredura

UFC – unidade formadora de colônia

UFC/mL – unidade formadora de colônia por mililitro

CIM – concentração inibitória mínima

CBM – concentração bactericida mínima

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	37
2 REVISÃO DE LITERATURA	43
3 PROPOSIÇÃO	61
4 MATERIAL E MÉTODO	65
4.1 Formulações.....	67
4.2 Seleção e distribuição dos animais	67
4.3 Preparo dos tubos de polietileno e das pastas.....	68
4.4 Preparo dos animais e implantação dos tubos de polietileno.....	71
4.5 Preparo das peças para análise.....	71
4.6 Análise Microscópica.....	74
5 RESULTADOS.....	77
6 DISCUSSÃO	127
6.1 DA METODOLOGIA.....	129
6.2 DOS RESULTADOS	131
7 CONCLUSÃO	137
REFERÊNCIAS.....	141
APÊNDICES	153
ANEXOS	161

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Dentre os fatores etiológicos das alterações pulpare inflamatórias, a contaminação microbiana é a mais comum. Quando não controlada, constitui a principal causa de periapicopatias. Em 1965 Kakehashi, Stanley e Fitzgerald foram os primeiros a demonstrar, através de animais germfree, o importante papel dos microrganismos no desenvolvimento de alterações periapicais. Estudos subseqüentes com polpas de macacos confirmaram a relação causa-efeito entre a infecção pulpar e periodontite apical (MÖLLER et al., 1981).

O preparo químico-mecânico do canal e a introdução de medicação intracanal entre sessões são capazes de diminuir, significativamente, o número de microrganismos presentes em um canal infectado e, conseqüentemente, reduzir a reação inflamatória do tecido periodontal (coto periodontal), condições primordiais para o sucesso do tratamento endodôntico.

O uso da medicação intracanal em casos de tratamento endodôntico de dentes com vitalidade pulpar, biopulpectomia, tem o objetivo de controlar ou impedir a exacerbação da reação inflamatória presente no coto periodontal e ainda preservar sua vitalidade (LEONARDO; SILVA, 1998). Nos casos de tratamento endodôntico de dentes sem vitalidade pulpar, definido como necropulpectomia, a medicação intracanal deve tornar o sistema de canais radiculares em um meio impróprio para a sobrevivência microbiana, inibindo o crescimento ou destruindo aqueles que escaparam ao preparo químico-mecânico, principalmente os presentes em ramificações laterais, em canalículos dentinários, deltas e anfractuosidades apicais (LEONARDO; SILVA, 1998).

Outra justificativa para o uso da medicação intracanal é a presença de bactérias aeróbias residuais 72 a 96 horas após o preparo químico-mecânico como demonstrado por Leonardo (1965) e Assed et al. (1996). Em dentes portadores de lesão periapical a presença de bactérias residuais também ocorre, como demonstraram Peters et al. (2002), em coletas realizadas antes e após a instrumentação e após 4 semanas.

Dos medicamentos existentes, o hidróxido de cálcio é o mais utilizado, tanto em casos de bio quanto em necropulpetomia, devido às suas propriedades biológicas e ação antimicrobiana. Tais propriedades são devido à sua dissociação

em íons cálcio e hidroxila. Sua alcalinidade promove necrose superficial do tecido em contato direto sobre o qual forma-se uma barreira mineralizada (SEKINE et al., 1971). Isso ocorre também devido ao estímulo da fosfatase alcalina e a inibição da enzima fosfatase ácida de origem osteoclástica. O íon cálcio participa da formação de tecido mineralizado ativando a adenosina trifosfatase cálcio-dependente (LEONARDO, 1998). O efeito bactericida do hidróxido de cálcio é garantido por seu elevado pH, pela cedência de íons OH, chegando a um pH tecidual próximo a 12,0.

A própolis, muito utilizada na medicina popular, vem despertando o interesse da comunidade científica devido às suas diversas atividades biológicas: antibacteriana (WU-YUAN; GREEN; BIRCH, 1990; GRANGE; DAVEY, 1990), antiinflamatória (DOBROWOLSKI et al., 1991), antifúngica (KUJUMGIEV et al., 1999), cicatrizante (PERRI DE CARVALHO; TAGLIAVINI; TAGLIAVINI, 1991) e estimuladora de resposta imunológica (DIMOV et al., 1992; SFORCIN, 2007).

É utilizada pelas abelhas para vedação e proteção da colméia (TREVISAN, 1983). Sua etimologia vem do grego: *pro*: em defesa de; *polis*: cidade. As abelhas extraem uma resina de flores, folhas e casca de árvores e incorporam componentes enzimáticos, como a β glucosidase, presentes em sua saliva para a formação da própolis (BONHEVI; COLL; JORDÀ, 1994). Sua composição química é complexa e varia de acordo com a vegetação e o clima da região onde as abelhas vivem (MARCUCCI, 1995). Dentre os mais de 200 componentes já identificados, estão os ésteres fenólicos, ácidos graxos e fenólicos, derivados do ácido cinâmico compostos terpênicos e os flavonóides (GREENAWAY et al., 1991; AGA et al., 1994; MARCUCCI et al., 2001). Na própolis brasileira, ocorrem principalmente os flavonóides, os derivados do ácido cinâmico e outros ácidos cafeoilquímicos (MIORIN, 2003; SALOMÃO et al., 2008).

Estudos comprovando sua eficácia contra patógenos bucais (IKENO; IKENO; MIYAZAWA, 1991; KOO et al., 2000), cicatrizante de aftas e gengivites (SILVEIRA et al., 1988) meio de estocagem de dentes avulsionados (PETTIETTE et al., 1997) e estimulante de dentina reparadora (SABIR et al., 2005) despertou o interesse por seu uso como medicação intracanal. Contudo, seu aspecto resinoso seria um inconveniente para essa finalidade, devido à dificuldade de ser removida do interior do canal. Assim o desenvolvimento de uma formulação contendo a menor concentração de própolis que mantivesse suas atividades biológicas, com aspecto

físico de fácil preenchimento e remoção do interior dos canais radiculares permitiu ultrapassar essa dificuldade e criar nova opção terapêutica.

Estudos preliminares (VICTORINO et al., 2007), utilizando extratos e formulações líquidas, forneceram subsídios necessários que direcionaram o desenvolvimento dessa medicação.

Diante disto, faz-se necessário a realização de estudos para determinar e avaliar o comportamento biológico dessa nova proposta de tratamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Própolis

O uso da própolis pela medicina popular vem antes mesmo do nascimento de Cristo. Ghisalberti (1979), em uma sistemática revisão da literatura, descreveu relatos de 300 a.C. No antigo Egito, além de ser conhecida por suas propriedades medicinais, a própolis era utilizada também para embalsamar os mortos. Na Itália, durante o século XVII, fabricantes de violinos, como Stradivari, utilizavam a própolis como um componente do verniz aplicado em seus instrumentos (MONTI et al., 1983). Este hábito existe até hoje. No início do século XX, durante a Guerra do Bôeres, na África do Sul, a própolis, misturada em vaselina, era aplicada em feridas dos soldados o que impedia a necrose tecidual restabelecendo-os rapidamente para o fronte de batalha (MATSUNO, 1997).

Estudos científicos comprovando o conhecimento empírico a respeito das propriedades biológicas da própolis se inicia na primeira metade do século XX. O primeiro estudo demonstrando a atividade antibacteriana foi em 1948 por Kivalkina, na Rússia (GHISALBERT, 1979). Nesse estudo foi encontrada atividade bacteriostática contra *Streptococcus aureus*, bacilo do tifo e outras bactérias.

Estudos subseqüentes comprovaram a atividade antimicrobiana e começaram a fornecer concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) principalmente para bactérias aeróbias e facultativas (PRADO FILHO; AZEVEDO; FLETCHMANN, 1962; LINDENFELSER, 1967).

Lindenfelser (1967) avaliou 15 amostras de própolis de diferentes partes dos EUA. Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana contra 25 das 39 espécies utilizadas, principalmente cocos gram positivos. O *Bacillus larvae* mostrou-se o mais sensível e sete bacilos gram negativos foram resistentes. Demonstraram também significativa atividade antifúngica, pois das 39 espécies de fungos utilizadas, apenas duas se mostraram resistentes.

Grange e Davey em 1990 utilizaram o extrato etanólico de própolis de Lyon, França, contra 21 espécies bacterianas provenientes do Hospital Brompton e Laboratório de Saúde Pública. Realizaram um screening com diluição de 1:20 (3mg/mL) do extrato em agar sangue. Os extratos de própolis inibiram completamente o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, mas

não o da *Klebsiella pneumoniae*. Os autores sugeriram que a atividade antibacteriana da própolis está no sinergismo entre todos os seus componentes.

Kedzia (1990) estudando a ação da própolis em bactérias anaeróbias coletadas de abscessos abdominais de pacientes, encontrou, pelo método de diluição em agar, níveis de CIM entre 60 a 3000µg/mL. Das 267 espécies utilizadas, 63% foram sensíveis às baixas concentrações de própolis, de 60 a 1000µg/mL. Amostras de *Bacteriodes fragilis* foram significativamente sensíveis. As bactérias gram positivas mostraram-se mais resistentes, porém, também foram inibidas com 3000µg/mL.

Fuentes e Hernandez (1993) demonstraram acentuada atividade antimicrobiana da própolis contra bactérias gram positivas, como *S aureus*, *E coli*, *P aeruginosa*, *S epidermides* e *Streptococcus ssp* (B hemolítico). A própolis utilizada foi a de Havana (Cuba) preparado em extratos etanólicos com álcool em diferentes concentrações: 50%, 60%, 70%, 80% e 90%. Para cada uma dessas concentrações, foram criados dois grupos, um com agitação e outro sem agitação, totalizando 10 grupos. Passados 5 dias, realizaram a filtragem dos extratos obtendo a 1ª solução e com a sobra ou os resíduos encontrados no papel filtro, foi repetido o processo mais duas vezes, obtendo-se a 2ª e 3ª soluções. A metodologia utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana foi o método de difusão em ágar. Os resultados demonstraram que todas as soluções apresentaram atividade contra os microrganismos utilizados e que não houve diferença entre as diferentes concentrações de álcool. A 1ª solução mostrou ser mais efetiva do que a 2ª e 3ª, as quais apresentaram atividade similar. A agitação das soluções não influenciou nos resultados.

Sforcin et al. em 2000 investigaram a possível influência das diferentes estações do ano no desempenho de amostras de própolis brasileira, de Botucatu, em sua atividade antimicrobiana. Utilizaram espécies de bactérias coletadas de pacientes do Hospital Universitário da escola de Medicina de Botucatu – UNESP, dentre elas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Foi determinada a CIM pelo método de diluição em ágar. A espécie mais sensível foi o *Staphylococcus aureus* e as mais resistentes foram *Escherichia coli* e a *Salmonella typhimurium*. Mesmo coletados nas diferentes estações do ano, os extratos mantiveram as mesmas CIM, permitindo aos autores concluir que o clima não interfere na atividade antimicrobiana da própolis.

Em 2002, Gregory et al. utilizaram um creme à base de própolis em queimadura de pele de segundo grau. O objetivo desse estudo foi comparar um creme de própolis com o tratamento padrão para queimaduras de pele, a sulfadiazina de prata. Foram selecionados pacientes do serviço de emergência do Hospital de Queimaduras de Goiânia que apresentavam queimaduras de segundo grau, com menos de 20% da superfície corpórea e sem trauma colateral significativo como ossos quebrados, lacerações e hematomas. Pacientes gestantes ou alérgicos aos produtos utilizados também foram excluídos do estudo. As feridas foram limpas superficialmente com soro fisiológico. Um lado da ferida foi tratado superficialmente com o creme de própolis e o outro com sulfadiazina de prata. As feridas eram cobertas com gaze para queimados (complexo gaze e algodão) e o paciente orientado a retornar a cada 3 dias para desbridamento da ferida e nova aplicação dos cremes e observação clínica. Ao remover o tecido necrosado, colhia-se amostras com swab para posterior cultura em ágar e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), 24, 48 e 72 horas após a coleta. Os resultados não demonstraram diferença significativa entre os dois tratamentos.

Sosa et al. (2007) avaliaram a atividade antiinflamatória tópica de três soluções de própolis: aquosa, hidroglicérica e hidroalcoólica. A metodologia utilizada foi o padrão para se avaliar este tipo de atividade, Edema de Orelha de Camundongo induzida por óleo de cróton. Essa solução promove uma dermatite aguda, na qual os componentes celulares e vasculares podem ser quantificados facilmente pela diferença de peso e pela mensuração das células inflamatórias por um método enzimático. Foram utilizados camundongos com peso variando de 28 a 32g, os quais permaneceram por 7 dias, antes do experimento, em condições constantes de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), humidade do ar (60 a 70%) e ciclo de luz artificial. A indução da resposta inflamatória foi na superfície interna da orelha direita pela aplicação de 80µg de óleo de cróton dissolvido em acetona. Após 30 segundos, tempo aproximado para a evaporação da acetona, as substâncias em teste foram aplicadas. Como controle positivo foi utilizado o antiinflamatório indometacina. Os resultados mostraram que a atividade antiinflamatória das soluções de própolis foi dose-dependente do teor de flavonóides e quando utilizado apenas os veículos das soluções não houve atividade. Dentre as soluções, a aquosa apresentou melhores resultados, com 15µg/cm² de teor de flavonóides proporcionou uma redução de 50%

da inflamação. A indometacina também apresentou atividade dose-dependente, chegando a inibir 82% do processo inflamatório.

A Própolis em Odontologia

Estudos aplicados à odontologia se intensificam na década de 1990. Ikeno, Ikeno e Miyazawa (1991) demonstraram a atividade, *in vitro*, da própolis contra a glicosiltransferase de *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus mutans* PS14 e *Streptococcus cricetus* OMZ61 e contra a cárie dentária em ratos infectados com *Streptococcus sobrinus* 6715. A ação anti-cárie da própolis deu-se por interferir na aderência de bactérias cariogênicas à superfícies lisas e conseqüentemente prejudicar a formação de placa bacteriana. Não foi encontrado efeito tóxico da própolis sobre os ratos em estudo. Os resultados sugeriram que a própolis pode controlar a cárie em modelos experimentais em ratos.

Magro-filho e Carvalho em 1990 analisaram, microscopicamente, a ação da própolis em alvéolos dentários e em pele de ratos. Realizaram uma ferida no dorso de ratos de 5mm de diâmetro com um punch e a extração dos incisivos superiores. Extratos de própolis a 10% foram introduzidos nos alvéolos e aplicados diariamente nas feridas, por 3, 6, 9, 15 e 21 dias. No grupo controle não foi aplicado nada. Após os períodos experimentais, os animais foram mortos e realizada a análise microscópica das feridas e dos alvéolos. Os resultados mostraram que o reparo dos alvéolos não foram acelerados, mas na ferida cutânea, no 21º dia, foi observado epitélio escamoso estratificado ceratinizado, resultado superior ao encontrado no grupo controle, que no mesmo período ainda apresentava tecido conjuntivo com fibroblastos e fibras colágenas.

Os mesmos autores, Magro-filho e Carvalho em 1994 utilizaram colutório contendo própolis a 5% em pacientes submetidos a sulcoplastias com o objetivo de avaliar o reparo da ferida cirúrgica. Vinte e sete pacientes participaram deste estudo e retornavam após 7, 14, 30 e 45 dias do procedimento cirúrgico para avaliação clínica e citológica. Os pacientes realizavam bochecho 5 vezes ao dia. Os autores observaram, pela citologia esfoliativa, que o colutório contendo própolis a 5% melhorou a epitelização das feridas cirúrgicas intrabuciais. Clinicamente, a própolis demonstrou exercer certo efeito analgésico nos períodos iniciais pós-cirúrgicos.

Bretz et al. (1998) investigaram o poder de cicatrização da própolis aplicadas diretamente sobre a polpa dentária. Foram utilizados 25 ratos adultos, nos quais foram realizadas exposições pulpares com broca de 0,6mm de diâmetro. A proteção pulpar direta foi feita com cimento de hidróxido de cálcio (Life) e solução alcoólica de própolis a 20%. Após a aplicação, os dentes foram restaurados com resina composta. Os animais foram mortos em 5, 7, 10 e 14 dias, realizado o processamento histológico e análise microscópica de acordo com os seguintes parâmetros: presença de fibroblastos, resposta pulpar, presença de células inflamatórias, ausência de microrganismos, organização do suprimento sanguíneo e formação de tecido mineralizado. Ambos os grupos apresentaram reorganização celular da polpa, acentuada vascularidade, baixa resposta inflamatória e estimularam a formação de dentina reparadora. Os resultados mostraram a eficácia da própolis como agente protetor pulpar direto.

Giamalia et al. (1999) avaliaram a microdureza do esmalte dentário humano após a aplicação da própolis em sua superfície. A alteração da microdureza do esmalte dentário foi analisada após 1h de imersão em solução salina, grupo controle, e em extratos de própolis a 0,4, 1 e 2%. A microdureza foi medida com diamante Vickers sob uma carga de 300g. Foi medido também o pH e a quantidade de cálcio das soluções de própolis. A superfície do esmalte antes e após o tratamento foi analisada com MEV. Os resultados mostraram que as três soluções aumentaram a microdureza do esmalte comparada com a salina e que quanto maior a concentração, maior a microdureza. O pH ficou entre 5 e 6 e a quantidade de cálcio foi de 5 a 8 ppm. Ao MEV, observaram precipitações na superfícies expostas à própolis.

Silva et al. (2000) analisaram, microscopicamente, o efeito do extrato etanólico de própolis diluído em diferentes concentrações na cicatrização de feridas induzidas em mucosa. Os autores utilizaram ratos *Mus musculus* nos quais, após a anestesia geral com hidrato de cloral 10%, foram realizadas feridas na mucosa bucal da região vestibular com auxílio de broca esférica carbide nº1 em baixa rotação. As feridas foram tratadas com extratos de própolis a 10 e a 30% em intervalos de 6 horas aplicados superficialmente. Os sacrifícios foram realizados após 3, 5, 10 e 14 dias. Na análise microscópica o grupo tratado com extrato a 10% no 14º dia, apresentou formação de lâmina própria no fundo da lesão com numerosas células conjuntivas em meio a substância intercelular. No grupo utilizado extrato a 30%, no

14º dia, as lesões apresentaram apenas o tecido conjuntivo da lâmina própria em processo de reparação. Os autores concluíram que o extrato a 10% acelerou o processo de epitelização.

Koo et al. (2000) estudaram a atividade antimicrobiana de extratos de própolis a 10% e *Arnica Montana* 5 e 10%, provenientes de Minas Gerais. O método utilizado foi o de difusão em ágar para 14 cepas, entre elas *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *Cândida albicans*, *P. gingivalis*, *P. denticola* e *P. endodontalis*. A própolis inibiu todos os microrganismos testados. Foi avaliada ainda a inibição da aderência das cepas do grupo mutans, pela incubação de tubos inclinados a 30º e a formação de glucanos insolúveis em água, as quais foram totalmente inibidas pelo extrato de própolis na concentração de 400 e 500mg/ml respectivamente. Os autores sugeriram que a própolis pode prevenir a cárie e doença periodontal.

Em 2000, Geraldini, Salgado e Rode, analisaram em, MEV, a superfície de dentina de dentes humanos com o objetivo de verificar possíveis alterações morfológicas após aplicação de soluções de própolis. Foram utilizados dentes molares humanos, cujas coroas foram seccionados ao meio com disco de carborundum em peça de mão. Desses, foram obtidos fragmentos de 1mm de dentina. A própolis utilizada foi obtido, de colméias localizadas na região de Bauru, estado de São Paulo. Os espécimes foram divididos em grupos de acordo com a concentração do extrato de própolis; 10, 20 e 30%. O grupo controle foi sem tratamento e em um outro grupo foi aplicado etanol 70%. As aplicações foram realizadas com bolinhas de algodão por 30 segundos. Após o tratamento, as superfícies dentinárias foram lavadas e secas com jato de ar. Os espécimes foram metalizados e analisados ao MEV. Os resultados mostraram que todas as soluções promoveram alguma alteração morfológica na superfície dentinária. De acordo com a concentração das soluções, maior foi a deposição de resíduos, ou seja, no grupo do extrato 10% a dentina permaneceu menos suja que o grupo do extrato 30%. Neste grupo foram observadas ainda partículas esféricas de tamanhos variados, mantendo os túbulos dentinários obstruídos.

Santos et al. (2002) avaliaram e compararam a susceptibilidade de bactérias anaeróbias gram negativas presentes na doença periodontal, colhidas de pacientes, como *Prevotella intermédia* e *Prevotella nigrescens* e cepas padrão de *Porphyromonas gingivalis*. Além de seis extratos de própolis brasileira (Minas

Gerais), foram usados seis antimicrobianos prescritos na odontologia brasileira para doença periodontal: tetraciclina, penicilina, clindamicina, eritromicina, metronidazol e meropenem. Foi utilizado o método de diluição em ágar de acordo com NCCLS (1997) para se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) em anaerobiose a 37°C por 5 dias. Os resultados mostraram a ação dos extratos contra as bactérias utilizadas, com a CIM entre 64 e 256µg/mL, enquanto que os antimicrobianos apresentaram CIM variando de 0,06µg/mL para a penicilina a 8µg/mL para a clindamicina.

AL-Shaher et al. (2004) examinaram a tolerância de fibroblastos do ligamento periodontal e da polpa à própolis e ao hidróxido de cálcio. As células foram obtidas de terceiros molares de pacientes saudáveis e foram expostas a diferentes concentrações de própolis (0-20000µg/mL) e hidróxido de cálcio (0- 250.000µg/mL). A viabilidade celular foi analisada pelo manchamento com o cristal violeta, seguido da análise espectrofotométrica. Concentrações de própolis, solúveis em solução aquosa, até 4000µg/mL exerceram toxicidade mínima sobre os fibroblastos e quando comparadas ao hidróxido de cálcio, foram menos tóxicas. Os autores sugeriram o uso da própolis como medicação intracanal.

Martin e Pileggi (2004) utilizaram o modelo collagenase-dispase para investigar o potencial da própolis como meio de estocagem de dentes avulsionados, avaliando a manutenção das células do ligamento periodontal. Setenta dentes humanos extraídos foram divididos em cinco grupos experimentais e dois grupos controle. O controle positivo foi o grupo em que os dentes não foram secos nem permaneceram em algum meio, e passaram imediatamente pelo processamento com dispase e collagenase. O controle negativo foi o grupo em que os dentes permaneceram secos por 8 horas. Nos grupos experimentais, os dentes permaneceram por 30 minutos secos e depois imersos nos diferentes meios: solução de Hank, leite, solução salina, solução de própolis 50% e solução de própolis 100%. Os grupos foram divididos de acordo com o meio utilizado e permaneceram imersos por 45 minutos. Após a imersão, cada grupo foi encubado por 30 minutos em tubos Falcon de 15ml com 2,5ml de solução collagenase 0,2mg ml⁻¹ e 2,4mg ml⁻¹ de solução dispase grau II. Após a incubação, 50µl de soro bovino foi adicionado em cada tubo. Todos os tubos foram centrifugados a 1000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi então removido com micropipetas esterilizadas e as células foram marcadas com Azul de Tripán 0,4% para identificação da viabilidade.

As células viáveis foram contadas em microscópio de luz a um aumento de 20X. A análise estatística dos resultados mostrou que as soluções de própolis mantiveram significativamente a viabilidade das células do ligamento periodontal. Quando comparadas entre si, não apresentaram diferença, mas quando comparadas com os outros meios, ambas as soluções de própolis foram significativamente melhores. Os autores sugeriram que a própolis pode ser um meio alternativo para estocagem de dentes avulsionados.

O potencial irritativo da própolis foi avaliado por Silva, Almeida e Sousa (2004) que utilizaram o método de permeabilidade vascular ou edemogênico, no qual administra-se por via endovenosa o corante Azul de Evans (2%) e imediatamente após administra-se intradermicamente no dorso de rato, 0,1mL das soluções em teste: própolis (solução a 10%), extrato hidro-alcólico de *Casearia sylvestris* brasileira, otosporin e solução salina. Os tempos experimentais foram de ½, 1, 3 e 6 horas. Após esses períodos os animais foram sacrificados e removida a pele do dorso onde as soluções em teste foram administradas. Estes fragmentos permaneceram em 10mL de formamida por 72h, para remoção do Azul de Evans. Por meio da medida da densidade óptica com espectrofotômetro, chegou-se à quantidade de corante extravasado no tecido em µg. Os resultados mostraram que em todos os tempos experimentais, a própolis apresentou as menores quantidades de extravasamento de corante, demonstrando ser a solução menos irritante.

De modo semelhante ao estudo de Bretz et al. (1998), Sabir et al. (2005), aplicaram própolis diretamente sobre a polpa dentária de ratos para avaliar sua reação. Foram realizadas exposições pulpares, classe I, em molares superiores com broca esférica diamantada em baixa rotação e capeamento pulpar direto com pasta de óxido de zinco e eugenol como controle e os extratos de própolis, originários da Indonésia, com e sem flavonóides. Após o capeamento, os dentes foram restaurados com ionômero de vidro. Os períodos experimentais foram de 7, 14 e 28 dias. Após a análise microscópica, os autores observaram que em 7 dias, o grupo da própolis com flavonóides não apresentava processo inflamatório, o que ocorreu com os outros grupos, porém em nenhum deles havia sinais de formação de barreira dentinária. Contudo, no período de 28 dias, foi observado início de formação de ponte dentinária no grupo da própolis com flavonóides.

Sonmez et al. (2005) realizaram um estudo com o objetivo de investigar a atividade antimicrobiana e sua toxicidade em fibroblastos gengivais de 6 soluções de

própolis, e determinar a menor concentração que seja efetiva contra microorganismos e não agreda os fibroblastos gengivais. Duas soluções de pó de própolis (Sigma) e própolis da Turquia foram preparadas com propilenoglicol e álcool. Foram incluídos no estudo outras duas amostras de própolis de diferentes regiões geográficas (EUA e Austrália). A metodologia utilizada para a atividade antimicrobiana foi o teste de diluição em ágar e os microrganismos utilizados foram *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Compylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*. A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo método de MTT (Metil Tiazol Tetrazolium). Os resultados mostraram que na diluição de 1:2 a 1:128 todos as soluções de própolis foram citotóxicas para os fibroblastos gengivais. A diluição de 1:256 da solução alcoólica e da solução com propilenoglicol não agrediram as células e a solução de própolis originária dos EUA, necessitou ser diluída a 1:1024 para os fibroblastos se tornarem viáveis em seu meio. A concentração inibitória mínima para as bactérias foram de 1:128 a 1:256 e para as leveduras variaram entre 1:256 até 1:2048 para *Cândida albicans* e *Cândida parapsilosis* da solução de própolis dos EUA.

Oncag et al. em 2006 compararam a eficácia da atividade antimicrobiana de três medicamentos usualmente utilizados como medicação intracanal com própolis contra *Enterococcus faecalis*. Foram utilizados 180 dentes permanentes humanos extraídos unirradiculados com um único canal. Após o preparo químico-mecânico, os canais foram contaminados com *E. faecalis* e incubados a 37°C por 7 dias. Os dentes foram divididos em 6 grupos de acordo com a medicação utilizada: Grupo I – hidróxido de cálcio P.A. misturado com glicerina, Grupo II – gel de clorexidina a 1%, Grupo III – Vitapex com iodofórmio e óleo de silicone, Grupo IV – própolis, Grupo V – etanol 96% e Grupo VI – controle negativo, o qual foi contaminado com *E. faecalis* e nenhuma medicação foi aplicada. Com o auxílio de uma seringa e agulha gauge 26, os medicamentos foram introduzidos nos canais até que ficassem totalmente preenchidos, aproximadamente 0,1mL e a abertura coronária foi selada. Os espécimes foram incubados em anaerobiose a 37°C por um período de 48 horas e 10 dias. Para determinar o crescimento bacteriano os canais foram instrumentados com lima tipo Hedstrom nº 50 e irrigado com 5 mL de água destilada para remoção das medicações do interior dos canais. Os canais permaneceram com água destilada e a coleta das amostras se deu pela introdução de cone de papel

absorvente nº 50 por 60 segundos. O cone com a solução absorvida foi introduzido em tubos teste, contendo 1mL de solução salina esterilizada. Os tubos foram então pré incubados por 30 minutos a 37°C e agitados por 60 segundos. Diluições seriadas foram plaqueadas em ágar sangue. As placas foram encubadas em câmara de anaerobiose por 48 horas a 37°C e subseqüentemente realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os resultados mostraram que todos os medicamentos foram efetivos contra o *E. faecalis* no período de 48 horas. No período de 10 dias, a própolis apresentou-se mais efetiva que os demais grupos com boa atividade antimicrobiana, *in vitro*, contra *E. faecalis* em canais radiculares. Os autores sugeriram o uso da própolis como uma alternativa de medicação intracanal, devido à sua boa atividade *in vitro* contra *E. faecalis*.

Moraes (2006) utilizou a própolis em tecido subcutâneo de ratos como agente protetor do implante de tubo de polietileno contendo os cimentos obturadores; Sealer 26 e um a base de óxido de zinco e eugenol. Foram utilizados 39 ratos, nos quais foram implantados 3 tubos de polietileno na região dorsal. Cinquenta e quatro tubos foram preenchidos com cimento de óxido de zinco e eugenol consistente. Destes, 36 sofreram aplicação de própolis em suas extremidades recobrindo a área do cimento: em 18 a própolis BRP1 e em 18 a própolis MAR. Os 18 tubos restantes não sofreram tratamento nas extremidades. Outros 54 tubos foram preenchidos com Sealer 26, também consistente, da mesma forma com descrito anteriormente. Os períodos experimentais foram de 7, 30 e 60 dias. Após a morte dos animais, preparo das peças e obtenção dos cortes foram analisados os eventos microscópicos estipulando escores a cada situação apresentada. A aplicação das própolis recobrindo os cimentos não alterou o comportamento dos mesmos, a própolis tipo MAR mostrou resultados mais favoráveis do que a BRP1, porém, sem diferença estatística significativa entre elas.

Victorino et al. em 2007 avaliaram o potencial irritativo de extratos de própolis (originárias do norte do Paraná) a 8, 15 e 30% e formulações líquidas contendo extratos de própolis a 8%. Os autores utilizaram a metodologia da permeabilidade vascular ou edemogênico. Os períodos de avaliação foram 30 minutos, 4 e 24h e os fragmentos da pele onde foram injetadas as soluções de própolis permaneceram em 5mL solução de etanol/acetona (6:3) por 48 horas, para extração do corante (Azul de Evans 2%). Para todas as soluções houve um pico de extravasamento do corante no período de 4 horas. Entre os extratos, o de 8% mostrou-se o menos irritante, com

menor extravasamento do corante, e as formulações líquidas contendo este mesmo extrato apresentaram irritação ainda menor.

Ferreira et al. 2007 determinaram o efeito antimicrobiano do extrato etanólico de própolis (EEP) e os medicamentos intracanal: hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol canforado e formocresol, sobre bactérias endodônticas. O método utilizado foi o da macrodiluição utilizando o meio reinforced clostridial medium (RCM) e brucella e brain heart infusion. Os agentes antimicrobianos foram sequencialmente diluídos e testados contra as bactérias anaeróbias *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces israelii*, *Clostridium perfringens* e *Enterococcus faecalis*, com inóculo padronizado a 5×10^5 UFC/mL. Os tubos foram incubados e a concentração inibitória mínima foi determinada. Subculturas foram semeadas em agar sangue para se determinar a concentração bactericida mínima. Os resultados demonstraram que todas as soluções testadas foram efetivas contra os microrganismos testados, sem diferença estatística. A bactéria *E. faecalis* foi a espécie menos suscetível, e o caldo RCM promoveu maior crescimento bacteriano, mas não houve diferença significativa nesses resultados. O etanol não influenciou no efeito antimicrobiano da própolis.

Ozan em 2007 avaliou a viabilidade de células do ligamento periodontal de dentes humanos avulsionados quando imersos em soluções de própolis originária da Turquia como meio de estocagem. As células do ligamento periodontal foram obtidas de terceiros molares saudáveis e cultivados em meio Dulbecco's Modified Eagles (DMEM). As culturas foram expostas à solução de própolis a 10%, a 20%, leite longa vida com baixa concentração de gordura, solução balanceada de Hank, água de torneira como controle negativo e DMEM como controle positivo. As culturas de células foram incubadas a 37°C por 1, 3, 6, 12, e 24 horas. A viabilidade das células do ligamento periodontal foi avaliada pela exclusão do azul de trypan. Os resultados mostraram que a solução de própolis de menor concentração, 10%, foi o meio de estocagem mais efetivo que todos os outros grupos. Os autores concluíram que a própolis pode ser recomendada como um adequado meio de transporte de dentes avulsionados.

Gopikrishna et al. (2008) compararam água de coco, própolis, solução de Hanks (HBSS) e leite como meio de estocagem de dentes avulsionados. Foram utilizados setenta dentes humanos extraídos por indicação ortodôntica e divididos em 4 grupos experimentais e 2 grupos controle. Os controles positivo e negativo

corresponderam aos tempos em que os dentes permaneceram secos por 0 minuto e 8 horas respectivamente. Os dentes foram armazenados secos por 30 minutos e depois imersos nos meios experimentais: água de coco, própolis, HBSS e leite. Os dentes foram então tratados com dispase e colagenase por 30 minutos. O número de células viáveis do ligamento periodontal foram contadas e analisadas. A água de coco manteve a viabilidade das células significativamente maior quando comparada aos outros meios. Os autores concluíram que a água de coco pode ser utilizada como meio de estocagem ou transporte de dentes avulsionados.

Implantação Subcutânea

O primeiro autor a introduzir tubos de polietileno em estudos de implantação subcutânea foi Torneck, em 1966. Seu trabalho relacionou a característica do tubo, comprimento e diâmetro, com a resposta do tecido conjuntivo de ratos. Antes do implante, os tubos foram descontaminados com solução de iodo, lavados em solução salina e secos com gaze esterilizada. Os tubos foram divididos em dois grupos: um em que os tubos foram mantidos com as duas extremidades abertas e outro com uma das extremidades fechada. Após o período de 60 dias, os animais foram mortos e realizada a análise microscópica do tecido onde os tubos foram implantados. Os resultados mostraram a formação de uma cápsula fibrosa ao redor dos tubos, rica em fibroblastos e fibras colágenas e ausência de processo inflamatório, indicando boa biocompatibilidade do material. O autor encontrou também influência do diâmetro e o comprimento dos tubos no reparo do tecido conjuntivo: quanto mais estreito e comprido, mais difícil a invaginação do tecido para seu interior.

Resultados semelhantes foram encontrados um ano após por Phillips (1967). Este autor utilizou tubos de 6, 10 e 15mm de comprimento e diâmetros de 0,59; 0,77; 1,0; 1,2; 1,4 e 1,7mm. O grupo controle foram os tubos selados em ambas as extremidades. A desinfecção dos tubos foi pela imersão em cloreto de benzalcônio 1:1000 por 24h. Foram utilizados ratos Wistar, pesando entre 160 e 200g. Foram implantados 4 tubos de polietileno, vazios, por animal e o tempo experimental foi de 60 dias. Ao exame microscópico, foi observado que ao redor dos tubos houve formação de cápsula fibrosa rica em fibroblastos e fibras colágenas além de pequena reação inflamatória nas extremidades e ausência de necrose tecidual. A

invaginação de tecido conjuntivo para o interior dos tubos, foi mais freqüente naqueles de menor comprimento e maior diâmetro.

Zanoni et al. (1988) realizaram implante de tubos de polietileno e de dentina em tecido conjuntivo de ratos, obturados com Endomethasone, com o objetivo de comparar a resposta tecidual entre os tubos. Os 54 ratos utilizados foram divididos em dois grupos: o Grupo A recebeu implantes de tubos de polietileno com 10mm de comprimento e 5mm de diâmetro interno e o Grupo B recebeu tubos de dentina preparados a partir da raiz palatina de molares superiores, seccionados com a mesma medida. Os grupos foram subdivididos em 3 subgrupos (A1, A2, A3, B1, B2 e B3). Os tubos foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos e obturados com guta-percha e Endomethasone. Nos subgrupos A1 e B1, foi deixado 0,5 a 1,0mm de espaço vazio em uma das extremidades; nos subgrupos A2 e B2, de 1,5 a 2,0mm e nos A3 e B3, 4mm. Os períodos experimentais foram de 7, 21 e 60 dias. Os cortes histológicos foram semi-seriados com 6µm de espessura e corados com H.E.. À análise microscópica, os autores observaram que nos períodos de 7 e 21 dias, os subgrupos A2 e A3 apresentaram acentuado infiltrado inflamatório no tecido invaginado e moderado no subgrupo A1. Nos mesmos períodos, os subgrupos que receberam tubo de dentina, B1 e B2, o tecido invaginado apresentou infiltrado de grau discreto a moderado. O subgrupo B3 apresentou inflamação de moderada a intensa. Em todos os períodos, os subgrupos A3 e B3 apresentaram persistente resposta inflamatória. No período de 60 dias, os subgrupos A1, A2, B1 e B2 continham discreto infiltrado inflamatório. Os autores concluíram que os tubos de menor espaço vazio apresentaram melhor evolução por colagenização.

Economides et al. (1995) avaliaram a histocompatibilidade de quatro cimentos obturadores (AH-26, Roth 811, CRCS, and Sealapex) em tecido conjuntivo de ratos. Os cimentos foram manipulados e introduzidos em tubos de teflon de 5mm de comprimento e 1,6mm de diâmetro interno. Os tubos foram implantados no dorso dos animais. Tubos vazios foram utilizados como controle. Os períodos experimentais foram de 7, 14 e 21 dias. Ao final dos períodos experimentais, foram realizados os procedimentos histológicos e os espécimes analisados por meio de microscopia óptica. No período de 7 dias, o cérebro, fígado, rins e o útero foram retirados dos ratos mortos e analisada a presença de zinco e cálcio pela espectrofotometria. No total, 100 espécimes foram analisados. De acordo com os resultados, no sétimo dia, o material mais irritante foi o AH-26, mas esta resposta

inflamatória diminuiu com o tempo. O Roth 811 e o Sealapex causaram moderada a severa reação inflamatória, enquanto que o CRCS causou reação moderada. Sistemicamente, o CRCS e o Roth 811 induziram a redistribuição de zinco e o AH-26 induziu a alteração de cálcio em alguns organismos.

Görduysus, Etikan e Gokoz (1998) avaliaram a resposta do tecido conjuntivo de rato ao cimento obturador endodôntico Endo-Fill. Foram utilizados tubos de polietileno de 10mm de comprimento e 1,5mm de diâmetro interno. No dorso de cada animal foram implantados quatro tubos, preenchidos com o cimento obturador recém preparado. O grupo controle foi o composto pelos animais que receberam os tubos vazios. Os tempos experimentais foram de 2, 7, 14, 28 e 56 dias. Após a morte dos animais, os espécimes foram preparados e analisados microscopicamente. No segundo dia, foi observada uma reação periférica, com moderado infiltrado e notável exsudato inflamatório. Estavam presentes ainda edema, congestão e leucócitos. Proliferação fibroblástica e formação de colágeno não foram observados. Passados 7 dias, notou-se diminuição do edema e leve infiltrado inflamatório, além de leve proliferação fibroblástica e formação de colágeno. Em 14 dias, não foi observada a presença de infiltrado e exsudato inflamatório. Edema e congestão estavam quase inexistentes. No 28º dia, não havia edema, congestão, necrose, infiltrado nem exsudato. A proliferação fibroblástica estava similar ao 14º dia. Ao final do 56º dia, foi observada uma fina parede fibrosa e quase completo e avançado processo de reparo ao redor do material implantado, e não foi observada formação de cápsula ou qualquer infiltração inflamatória.

Yaltirik (2004) avaliou a reação do tecido subcutâneo ao amálgama e ao MTA. Os materiais foram introduzidos em tubos de polietileno de 1.1mm de diâmetro interno e 10mm de comprimento e implantados em tecido conjuntivo, no dorso de ratos da linhagem Wistar. O grupo controle foi aquele em que os tubos permaneceram vazios. Após a anestesia, foi realizada uma incisão de 2cm com lâmina de bisturi nº 15 e introduzidos os tubos com os respectivos materiais, formando três grupos: grupo I – MTA, grupo II – amálgama e grupo III – tubos vazios. Para evitar a interação entre os materiais, os tubos ficaram a uma distância mínima de 2cm distantes uns dos outros. Os períodos em que os materiais permaneceram no tecido conjuntivo dos animais foram de 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Após os respectivos períodos, os animais foram mortos e a região do implante foi analisada microscopicamente. Foram registradas a presença de resposta

inflamatória, células predominantes, presença de calcificação e espessura do tecido fibroso presente, atribuindo-se os seguintes escores: 0 - ausente; 1- <25 células, reação média; 2 entre 25 e 125 células, reação moderada e 3 - > 125 células, reação severa. A presença da cápsula fibrosa foi classificada como muito fina, < 150µm e fina >150µm. Ambos os materiais foram bem tolerados no período de 90 dias. Foi observada uma notável calcificação distrófica no tecido conjuntivo adjacente ao MTA. Este achado está de acordo com a hipótese de indução da formação de tecido mineralizado desse material.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar microscopicamente a resposta inflamatória do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao implante de formulações pastosas à base de própolis.

4 MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Formulações

As formulações de própolis foram preparadas a partir de um extrato pré-estabelecido em estudos anteriores (Casaroto et al., 2006; Victorino et al., 2007) denominado PPE1, cujo solvente foi a solução de álcool etílico, no Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá. As preparações (pastas) foram identificadas como A70D e D70D e acondicionadas em frascos âmbar em temperatura ambiente.

4.2 Seleção e distribuição dos animais

Foram utilizados 15 ratos machos da linhagem *Wistar*, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, pesando em média 234g, com aproximadamente 40 dias de vida.

Os animais foram alojados separadamente em gaiolas plásticas apropriadas, devidamente identificados e fornecida alimentação, ração comercial – Nuvilab CR-1® (Nuvital – Estrada da Ribeira, 3001 KM3, Colombo-PR) e água *ad libitum*. As condições ambientais foram normais, com luz natural e local arejado. O projeto desta pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru –FOB/USP (CEEPA – protocolo nº 25/2005) e aprovado em 21 de novembro de 2005 (Anexo A).

Para cada período experimental de 7, 15 e 30 dias, foram utilizados 5 animais. Em cada animal foram implantados 4 tubos de polietileno, cada qual com um material diferente, formando 4 grupos: Grupo I - Ca(OH)₂, Grupo II - A70D, Grupo III - D70D, Grupo IV – Controle (tubo vazio). Esta distribuição está representada no Quadro 1.

Quadro 1 – Distribuição dos animais e espécimes em função dos períodos experimentais e dos materiais analisados.

PERÍODOS DIAS	NÚMERO DE ANIMAIS	GRUPOS	NÚMERO DE ESPÉCIMES
7	5	I – Ca(OH)₂ II – Pasta A70D III – Pasta D70D IV – Controle	5 5 5 5
15	5	I – Ca(OH)₂ II – Pasta A70 III – Pasta D70 IV – Controle	5 5 5 5
30	5	I – Ca(OH)₂ II – Pasta A70 III – Pasta D70 IV – Controle	5 5 5 5
Total	15	---	60

4.3 Preparo dos tubos de polietileno e das pastas

Foram utilizados tubos de polietileno de 1,5mm de diâmetro e 10mm de comprimento (Figura 1). Para desinfecção, os tubos permaneceram imersos em hipoclorito de sódio a 5,25% por 1 minuto (Senia et al., 1975) (Figura 2). Antes de serem preenchidos com as pastas, os tubos foram lavados com soro fisiológico, secos com gaze e cones de papel absorvente esterilizados. O hidróxido de cálcio foi manipulado com propilenoglicol em placa de vidro imediatamente antes de ser utilizado (Figura 3). As pastas de própolis (Figura 4) foram fornecidas prontas para

uso pelo Laboratório de Farmacotécnica. O preenchimento dos tubos com as pastas, foi realizado com o auxílio de uma seringa Centrix (Figura 5). O grupo controle foi aquele em que os tubos permaneceram vazios.

FIGURA 1 – Dimensões dos tubos de polietileno.

FIGURA 2 – Descontaminação dos tubos de polietileno em hipoclorito de sódio 5,25%.

FIGURA 3 – Hidróxido de cálcio P.A. e propilenoglicol.

FIGURA 4 – Amostra das pastas de própolis A70D e D70D.

FIGURA 5 – Preenchimento do tubo de polietileno com seringa Centrix.

4.4 Preparo dos animais e implantação dos tubos de polietileno

A anestesia dos animais foi realizada com Cloridrato de Ketamina a 25mg/Kg via IM na face posterior da coxa. Após 5 minutos, a anestesia foi complementada com a associação de Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina (sedativo analgésico) via IM, a 25mg/Kg e 10mg/Kg respectivamente. Este esquema posológico foi de acordo com o protocolo estabelecido pelo biotério da FOB-USP (Anexo B).

Os animais tiveram o dorso depilado manualmente na região mediana caudal. Imediatamente após, foram banhados com água corrente, com a finalidade de se evitar a incorporação de pêlos durante o procedimento cirúrgico.

A anti-sepsia da região cirúrgica foi realizada com gaze embebida em solução aquosa de polivinilpirrolidona – iodo (PVP-I 10%) (Aqrabawi, 2000). A seguir, realizou-se uma incisão, com bisturi munido de lâmina nº15, na linha média do dorso do animal, de aproximadamente 2cm de comprimento. Com o auxílio de uma tesoura de ponta romba, realizou-se divulsão do tecido, para quatro pontos, sempre no sentido oposto à linha média (Figura 6). Os tubos foram inseridos com o auxílio de uma pinça reta. Para evitar a interação entre as pastas, os tubos foram deixados a uma distância de 2cm uns dos outros (Ozbas et al., 2003) (Figura 7).

Para padronização, os animais foram sempre posicionados com a cabeça voltada para o lado oposto ao operador e os tubos foram distribuídos em sistema de rodízio pelos quatro pontos (Figura 8).

Após o implante, a incisão foi suturada com fio de seda 3-0. Todos os procedimentos foram conduzidos sob condições de assépticas.

Todo procedimento cirúrgico foi realizado no Laboratório de Inflamação do Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá.

4.5 Preparo das peças para análise

Após os períodos experimentais de 7, 15 e 30 dias, os animais foram mortos com superdosagem anestésica (Cloridrato de Ketamina). Os tecidos contendo os implantes foram removidos cirurgicamente (Figura 9), lavados em soro fisiológico e fixados em solução aquosa de formol neutro a 10% durante 72h. Posteriormente, foram realizadas lavagens das amostras em água durante 24 horas. Em seguida,

eliminou-se o tecido adjacente em excesso, deixando a amostra com um formato retangular com tecido suficiente para a análise microscópica. Em seguida procedeu-se a remoção dos tubos. Primeiramente incizou-se longitudinalmente o tecido de um dos lados do tubo com auxílio de uma lâmina de bisturi nº11 sem atingir as extremidades dos tubos, criando um espaço por onde se introduziu cuidadosamente uma sonda interproximal nº1 para desprender a cápsula fibrosa e remover o tubo de polietileno sem dilacerar a cápsula fibrosa. As peças foram acondicionadas em cassetes unitários devidamente identificados. Finalmente as peças foram colocadas em álcool 70% durante um período de 24 horas.

Decorridas as 24 horas, foi realizada a desidratação das amostras, onde as peças foram imersas em três banhos de álcool etílico absoluto. Posteriormente, realizou-se a diafanização com três banhos de xilol e as amostras foram impregnadas em Histotec (parafina + resina sintética). Em seguida as peças foram incluídas em Histotec, tomando cuidado de eliminar as bolhas de ar que poderiam ter se formado no interior do espaço que era ocupado pelo tubo.

Após a inclusão das amostras, foram realizados cortes microscópicos semi-seriados de 5µm de espessura num micrótomo Leica (Leica – Jung RM2045 – Leica Instruments Gmbh D-6907 – Alemanha). Os cortes foram no sentido longitudinal do tubo com o objetivo de observar as extremidades e as laterais do tubo. Os cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H.E.).

FIGURA 6 – Divulção do tecido subcutâneo com tesoura de ponta romba.

FIGURA 7 – Introdução do tubo de polietileno com material teste e vazio.

FIGURA 8 – Distribuição dos tubos de polietileno no dorso dos animais.

FIGURA 9 – Peça macroscópica.

4.6 Análise Microscópica

A análise microscópica foi realizada ao microscópio óptico binocular, Olympus, CH-2, Japan, utilizando as objetivas 4, 10, 40 e 100X. Analisou-se microscopicamente a reação tecidual periférica ao tubo de polietileno anotando os fenômenos observados em uma tabela (Figura 10). Os critérios adotados para mensurá-los de forma semi-quantitativa e qualitativa foram os seguintes:

Fibrosamento: densidade das fibras colágenas de permeio às células periféricas localizadas no tecido reacional circunjacente ao material testado. Foi utilizado escore para classificar em três graus de severidade:

- 0: normal: tecido com aspecto de normalidade;
- 1 ou leve: quando as fibras colágenas apresentavam-se individualizadas tal qual um tecido conjuntivo normal, entremeadas por espaços negativos indicativos de componentes não fibrosos de matriz extracelular;
- 2 ou moderado: quando em algumas áreas as fibras colágenas apresentavam-se individualizadas, mas com áreas alternadas de matriz extracelular eosinofílica sem formações lineares e onduladas típicas das mesmas.
- 3 ou intenso: quando as fibras colágenas apresentavam-se em meio a uma matriz extracelular eosinofílica, sem formações lineares e onduladas típicas, sem que permitissem uma individualização das mesmas.

Espessura: considerou-se o número de células fibroblásticas e macrofágicas associadas e justapostas à superfície do material em direção ao tecido conjuntivo periférico. Esta mensuração foi realizada no maior eixo de espessura do tecido reacional e classificada em três graus de severidade:

- 0 ou normal: tecido com aspecto de normalidade;
 - 1 ou leve: quando se observava uma estratificação de uma a 3 camadas de células;
 - 2 ou moderado: quando a estratificação era de quatro a 10 camadas de células;
-

- 3 ou intenso: quando a estratificação celular era maior que 10 camadas de células.

Infiltrado inflamatório: avaliou-se a concentração de células polimorfonucleares tipo neutrófilos de permeio ao tecido reacional em torno ao material.

Esta concentração foi classificada em três graus de severidade:

- 0 ou normal: tecido com aspecto de normalidade;
- 1 ou leve: quando se observava de um a 10 neutrófilos no tecido reacional;
- 2 ou moderado: quando havia de 11 a 20 neutrófilos no tecido reacional;
- 3 ou intenso: quando mais de 21 neutrófilos estavam presentes no tecido reacional.

Em cada grupo e período experimental, os valores numéricos obtidos para cada variável: fibrosamento, espessura e infiltrado inflamatório foram somados e obtida uma média para fins de comparação estatística entre os grupos analisados.

Outros achados: registrou-se ainda a ocorrência de fenômenos eventualmente encontrados como extravasamento de material além da abertura do tubo implantado, abscedação e necrose dos tecidos circunjacentes ao material testado.

Figura 10 – Ficha para Anotação dos Dados da Análise Descritiva.

Período Experimental				7 dias					15 dias					30 dias						
Espécimes				1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
Infiltrado Inflamatório	Tipo Celular	PMN	Neutrófilo																	
			Eosinófilo																	
		MN	Macrófago																	
			Linfócito																	
			Plasmócito																	
		CGMNIs																		
	Macrófagos	Distribuição	Ao acaso																	
			Periférica																	
			À distância																	
		Citoplasma	Homogêneo																	
			Vacuolado																	
			Com Partículas																	
		Núcleo	Normal																	
			Alterado																	
		Células Gigantes Multinucleadas	Citoplasma	Aspecto	Homogêneo															
					Vacuolado															
	Com partículas																			
	Contorno		Regular																	
			Irregular																	
	Núcleo		Número																	
			Distribuição	Ao acaso																
				Periféricos																
			Tipo	Langerhans																
				Corpo estranho																
Fenômenos Reparatórios	Proliferação fibroblástica																			
	Proliferação angioblástica																			
	Fibrosamento	Densidade																		
		Organização	Ao acaso																	
			Capsular																	
	Tecido mineralizado	Periférico																		
À distância																				
Características do Material	Homogêneo																			
	Não Homogêneo	Granular																		
		Com cristais																		
		Fibroso																		
	Localização em relação à abertura do tubo	Aquém																		
		Ao nível																		
		Além																		
	Fagocitável	Sim																		
Não																				
Outras Observações	Abscedação																			
	Hemorragia																			
	Necrose																			

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

a) Análise microscópica descritiva do infiltrado inflamatório e fenômenos reparatórios.

Grupo Controle

7 dias.

Os cortes microscópicos revelaram tecido reacional localizado na abertura dos tubos vazios de polietileno, de espessura moderada, ricamente celularizado, pobre em exsudato inflamatório e com discreto fibrosamento. Observou-se ainda, macrófagos de permeio aos numerosos fibroblastos. Eventuais neutrófilos foram encontrados, além de intensa proliferação fibroblástica e angioblástica. Em alguns espécimes notou-se a presença discreta de células gigantes multinucleadas inflamatórias (Figura 11).

15 dias.

Observou-se ao redor da luz dos tubos de polietileno, presença de tecido reacional com fibrosamento leve a moderado, moderada proliferação fibroblástica e angioblástica permeada por macrófagos distribuídos ao acaso e por eventuais neutrófilos (Figura 12).

30 dias

O tecido reacional localizado na luz do tubo de polietileno apresentou-se com aumento do fibrosamento, redução de macrófagos e diminuição da proliferação fibroblástica e angioblástica quando comparados com o período de 15 dias. Ainda havia presença de eventuais neutrófilos (Figura 13).

Os dados referentes a este grupo experimental encontram-se no Apêndice A.

FIGURA 11A - Reação tecidual invaginando na luz do tubo de polietileno vazio (H.E.-4x).

FIGURA 11B - Maior aumento da figura 13A. Tecido ricamente celularizado (H.E.-10x).

FIGURA 11C - Maior aumento da região em vermelho da figura B. Presença numerosa de fibroblastos e macrófagos (H.E.-20x).

FIGURA 11D - Maior aumento da região em preto da figura B. Intensa proliferação angioblástica (H.E.-40x).

FIGURA 12A - Reação tecidual ao redor da luz do tubo de polietileno vazio (H.E.-4x).

FIGURA 12B - Aumento de 10x da figura 14A. Moderada espessura do tecido reacional (H.E.-10x).

FIGURA 12C - Maior aumento da figura B. Moderada proliferação fibroblástica e angioblástica (H.E.-20x).

FIGURA 12D - Maior aumento da figura C. Eventuais neutrófilos (setas) (H.E.-40x).

FIGURA 13 – CONTROLE - Tubo vazio - 30dias

FIGURA 13A - Reação tecidual frente a luz do tubo de polietileno vazio (H.E.-4x).

FIGURA 13B - Aumento de 10x da figura 15A. Moderada espessura do tecido reacional (H.E.-10x).

FIGURA 13C - Maior aumento da figura B. Moderada proliferação fibroblástica e angioblástica (H.E.-20x).

FIGURA 13D - Maior aumento da figura C. Ausência de neutrófilos (H.E.-40x).

Grupo Ca(OH)₂

7 dias

Presença de espesso tecido reacional em contato com o material, com leve grau de fibrosamento, moderado infiltrado inflamatório neutrofílico, intensa proliferação fibroblástica e angioblástica, rede fibrina e áreas edematosas. Nas áreas periféricas, onde o material encontrava-se em contato do com os tecidos, notou-se presença de necrose por coagulação. Em alguns espécimes houve a presença de células gigantes multinucleadas inflamatórias (Figura 14).

15 dias

Este período ainda apresentou grande espessura do tecido reacional, diminuição do infiltrado inflamatório neutrofílico e leve fibrosamento. A necrose por coagulação também se fez presente no tecido ao redor do material, quando extravasado. Tal material se mostrou birrefringente, irregular e cristalizado. Observou-se também proliferação angioblástica e poucas células gigantes multinucleadas inflamatórias (Figura 15).

30 dias

Tecido reacional delgado com fibrosamento de leve a moderado, permeado por proliferação angioblástica e fibroblástica, bem como, infiltrado inflamatório neutrofílico. Quando extravasado, o material apresentava-se circundado por macrófagos e algumas células gigantes multinucleadas inflamatórias ora do tipo Langhans, ora do tipo corpo estranho (Figura 16).

Os dados referentes a este grupo experimental encontram-se no Apêndice B.

FIGURA 14 - $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - 7dias

FIGURA 14A - Tecido reacional espesso em contato com o material. (H.E.-4x).

FIGURA 14B - Maior aumento de figura 16A. Presença de necrose por coagulação (H.E.-10x).

FIGURA 14C - Maior aumento da figura B. Presença de algumas células gigantes multinucleadas inflamatórias (seta) (H.E.-20x).

FIGURA 15 - Ca(OH)_2 - 15dias

FIGURA 15A - Material fora do tubo de polietileno em contato com tecido reacional ainda espesso (H.E.-4x).

FIGURA 15B - Maior aumento de figura 17A. Aspecto cristalizado, birrefringente e irregular do material extravasado (H.E.-10x).

FIGURA 15C - Maior aumento da figura B. Presença de células gigantes multinucleadas inflamatórias (seta) (H.E.-20x).

FIGURA 16 - $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - 30dias

FIGURA 16A - Leve espessura do tecido reacional (H.E.-4x).

FIGURA 16B - Maior aumento da figura 18A. Moderada proliferação angioblástica ao redor do tecido reacional (setas) (H.E.-10x).

FIGURA 16C - Maior aumento da figura B. Presença de células gigantes multinucleadas inflamatórias do tipo Langhans (seta) (H.E.-20x).

Grupo A70D

7 dias

A reação tecidual na interface com o material foi intensa, com grande infiltrado inflamatório macrofágico e moderado infiltrado inflamatório neutrofílico. Observou-se também intensa proliferação angioblástica, moderado grau de fibrosamento e poucas células gigantes multinucleadas inflamatórias (Figura 17).

15 dias

A espessura do tecido reacional ainda se mostrou intenso, com infiltrado inflamatório neutrofílico de moderado a intenso e algumas células gigantes multinucleadas inflamatórias. O material extravasado apresentou-se ora avermelhado, ora arroxeado e com pigmentos acastanhados. Em sua interface houve a presença de necrose por coagulação e uma faixa circundante de tecido reacional. Foi observado ainda áreas necróticas e poeira cromatínica formada pela interação entre células inflamatórias, macrófagos e o material durante sua fagocitose (Figura 18).

30 dias

A fragmentação celular ou poeira cromatínica ainda se fez presente em meio ao tecido reacional, porém com menor intensidade. O grau de fibrosamento mostrou-se intenso, com fibras individualizadas. Os macrófagos presentes apresentaram-se com o material em seu interior. Notou-se também, presença de cinturão periférico de linfócitos e algumas células gigantes multinucleadas inflamatórias (Figura 19).

Os dados referentes a este grupo experimental encontram-se no Apêndice C.

FIGURA 17A - Reação tecidual intensa com grande infiltrado macrofágico. Presença de material fora do tubo (*) (H.E.-4x).

FIGURA 17B - Maior aumento da figura 19A. Intensa proliferação angioblástica (setas). Presença de material fora do tubo (*) (H.E.-10x).

FIGURA 17C - Maior aumento da figura 19B. Intensa reação na interface do material extravasado (H.E.-20x).

FIGURA 18 - A70D - 15 dias

FIGURA 18A - Reação tecidual intensa com grande infiltrado macrofágico. Presença de material fora do tubo (*) (H.E.-4x).

FIGURA 18B - Maior aumento da figura 20A. Material extravasado com cicundante reação inflamatória. Presença de material fora do tubo (*) (H.E.-10x).

FIGURA 18C - Restos celulares (poeira cromatínica), devido à fagocitose do material (setas) (H.E.-20x).

FIGURA 19 - A70D-30 dias

FIGURA 19A - Discreta reação tecidual frente a luz do tubo de polietileno (H.E.-4x).

FIGURA 19B - Maior aumento da figura 21A. Presença de fibras colágenas individualizadas (H.E.-10x).

FIGURA 19C - Maior aumento da figura B. Cinturão periférico de linfócitos (setas) (H.E.-20x).

FIGURA 19D - Maior aumento da figura C. Macrófagos com o material em seu interior (setas) (H.E.-40x).

Grupo D70D

7 dias

O material extravasado mostrou-se semelhante ao do grupo anterior, com as mesmas características. A espessura do tecido reacional e do infiltrado inflamatório neutrofílico foi intensa e com fibrosamento leve. A proliferação angioblástica e fibroblástica foi intensa, permeada por macrófagos já fagocitando o material, com início da formação de poeira cromatínica. Ausência de células gigantes multinucleadas inflamatórias (Figura 20).

15 dias

A reação tecidual ainda apresentava-se intensa com proliferação angioblástica e fibroblástica, infiltrado inflamatório neutrofílico reduzido e numerosas áreas de poeira cromatínica. Notou-se ainda, células gigantes multinucleadas inflamatórias e macrófagos fagocitando o material (Figura 21).

30 dias

O tecido reacional mostrou-se delgado, com leve infiltrado inflamatório neutrofílico e reduzido infiltrado inflamatório macrofágico. Observou-se ainda redução do número de células gigantes multinucleadas inflamatórias, proliferação angioblástica e fibroblástica. A poeira cromatínica esteve presente de maneira bem reduzida e a necrose por coagulação ausente (Figura 22).

Os dados referentes a este grupo experimental encontram-se no Apêndice D.

FIGURA 20 - D70D - 7dias

FIGURA 20A - Reação tecidual intensa (H.E.-4x).

FIGURA 20B - Maior aumento da figura 22A. Intenso infiltrado neutrofílico (H.E.-10x).

FIGURA 20C - Maior aumento da figura B. Detalhe do material extravasado, com áreas de necrose por coagulação (setas) (H.E.-20x).

FIGURA 21 - D70D - 15dias

FIGURA 21A - Reação tecidual intensa (H.E.-4x).

FIGURA 21B - Maior aumento da figura 23A. Reação inflamatória intensa ao redor do material extravasado (H.E.-10x).

FIGURA 21C - Maior aumento da figura B. Detalhe do material extravasado, com áreas de necrose por coagulação (setas) (H.E.-20x).

FIGURA 22A - Reação tecidual espessa (H.E.-4x).

FIGURA 22B - Maior aumento da figura 24A – região em preto. Presença de poeira cromatínica (círculo) (H.E.-10x).

FIGURA 22C - Maior aumento da figura A – região em vermelho. Material extravasado rodeado por macrófagos (setas) (H.E.-20x).

FIGURA 22D - Maior aumento da figura C. Detalhe da proliferação angioblástica (setas) (H.E.-40x).

Análise estatística do fibrosamento, espessura e do infiltrado neutrofílico, caracterizados por escores, nos três períodos experimentais.

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar os resultados dos grupos em cada período experimental (7, 15 e 30 dias), como também para os materiais nos três períodos experimentais.

A análise está descrita nos tópicos a seguir:

Infiltrado neutrofílico

O período de 7 dias apresentou as maiores médias de infiltrado neutrofílico com redução em 15 e 30 dias. Este apresentou as menores médias para todos os grupos. Para os grupos controle e hidróxido de cálcio, os valores dos três períodos não apresentaram diferença significativa. Para a pasta A70D o período de 30 dias apresentou resultado significativamente menor do que o de 15 e 7 dias e para a pasta D70D, o período de 7 dias apresentou resultado significativamente maior do que os outros períodos.

Entre os mesmos períodos, o infiltrado inflamatório da pasta D70D foi significativamente maior do que o controle e o hidróxido de cálcio em 7 dias. Em 15 dias, a pasta A70D apresentou infiltrado inflamatório significativamente maior do que o controle e o Ca(OH)_2 e em 30 dias os grupos apresentaram-se semelhantes estatisticamente.

Tabela 1 – Média (M) e desvio padrão (DP) dos escores do infiltrado neutrofílico dos grupos nos três períodos experimentais.

Grupo	Controle		Ca(OH)2		A70D		D70D	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
7 dias	1,50	0,57	2,00	0,00	2,40	0,54	3,00	0,00
15 dias	1,00	0,00	1,25	0,50	2,50	0,57	1,50	0,57
30 dias	1,00	0,00	1,33	0,57	1,25	0,50	0,75	0,50

Espessura

A espessura apresentou valores maiores para todos os grupos no período de 7 dias e quando comparados com os outros períodos, apresentaram diferença estatística significativa apenas entre o período de 30 dias.

Quando comparados nos mesmos períodos experimentais, os materiais apresentaram resultados semelhantes estatisticamente para o período de 7 dias. Em 15 dias houve diferença apenas entre o controle e o hidróxido de cálcio. No período de 30 dias, a espessura foi maior para a pasta A70D.

Tabela 2 – Média (M) e desvio padrão (DP) dos escores da espessura dos grupos nos três períodos experimentais.

Grupo	Controle		Ca(OH) ₂		A70D		D70D	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
7 dias	2,60	0,57	3,00	0,0	3,00	0,0	3,00	0,0
15 dias	2,00	0,0	3,00	0,0	2,75	0,5	2,75	0,5
30 dias	1,00	0,0	1,25	0,5	1,00	0,0	2,00	0,0

Fibrosamento

Em cada grupo, com a mudança do período experimental, houve aumento no grau de fibrosamento, com diferença estatística significativa entre os períodos de 7 e 30 dias para o controle e para as pastas A70D e D70D. Apenas para o hidróxido de cálcio não houve diferença entre os períodos experimentais.

Quando comparados os materiais nos mesmos períodos experimentais, a pasta A70D apresentou maior fibrosamento no período de 7 dias. Em 15 e 30 dias, as pastas A70D e D70D foram iguais entre si e diferentes do controle e do hidróxido de cálcio, porém sem significância estatística.

Tabela 3 – Média (M) e desvio padrão (DP) dos escores do fibrosamento dos grupos nos três períodos experimentais.

Grupo	Controle		Ca(OH) ₂		A70D		D70D	
	M	DP	M	DP	M	DP	M	DP
7 dias	0,75	0,5	1,00	0,0	2,00	0,0	1,00	0,0
15 dias	1,00	0,0	1,75	0,5	2,00	0,0	2,00	0,0
30 dias	2,00	0,0	1,66	0,5	3,00	0,0	3,00	0,0

Análise estatística do infiltrado neutrofílico, espessura e fibrosamento, caracterizados por escores, nos três períodos experimentais.

O teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn, foi aplicado para comparação entre os grupos em cada período, como também entre os períodos de cada grupo.

Teste Kruskal-Wallis

Tabela 4 – Comparação entre os grupos nos períodos de 7, 15 e 30 dias para cada um dos critérios de análise.

Critérios de Análise Quantitativa	Valor de p		
	7 dias	15 dias	30 dias
Infiltrado neutrofílico	0,0042*	0,0336*	0,3408
Espessura	0,0965	0,0526	0,0084*
Fibrosamento	0,0015*	0,0153*	0,0057*

Os resultados acima, mostraram que houve diferença significativa estatisticamente entre os grupos nos períodos de 7, 15 e 30 dias, quanto aos três critérios. Diante disto, foi realizado o teste de Dunn para compará-los individualmente.

Teste de Dunn

Tabela 5 – Comparações individuais entre os grupos quanto ao infiltrado neutrofílico aos 7 dias.

Comparações	Interpretação
A70D vs D70D	P > 0,05 (não significante)
A70D vs Ca(OH)₂	P > 0,05 (não significante)
A70D vs Controle	P > 0,05 (não significante)
D70D vs Ca(OH)₂	P > 0,05 (não significante)
D70D vs Controle	P < 0,05 (significante)
Ca(OH)₂ vs Controle	P > 0,05 (não significante)

Tabela 6 – Comparações individuais entre os grupos quanto ao infiltrado neutrofílico aos 15 dias.

Comparações	Interpretação
A70D vs D70D	P > 0,05 (não significante)
A70D vs Ca(OH)₂	P < 0,05 (significante)
A70D vs Controle	P < 0,05 (significante)
D70D vs Ca(OH)₂	P > 0,05 (não significante)
D70D vs Controle	P > 0,05 (não significante)
Ca(OH)₂ vs Controle	P > 0,05 (não significante)

Tabela 7 – Comparações individuais entre os grupos quanto à espessura aos 30 dias.

Comparações	Interpretação
A70D vs D70D	P < 0,05 (significante)
A70D vs Ca(OH)₂	P > 0,05 (não significante)
A70D vs Controle	P > 0,05 (não significante)
D70D vs Ca(OH)₂	P > 0,05 (não significante)
D70D vs Controle	P < 0,05 (significante)
Ca(OH)₂ vs Controle	P > 0,05 (não significante)

Tabela 8 – Comparações individuais entre os grupos quanto ao fibrosamento aos 7 dias.

Comparações	Interpretação
A70D vs D70D	P < 0,05 (significante)
A70D vs Ca(OH)₂	P < 0,05 (significante)
A70D vs Controle	P < 0,05 (significante)
D70D vs Ca(OH)₂	P > 0,05 (não significante)
D70D vs Controle	P > 0,05 (não significante)
Ca(OH)₂ vs Controle	P > 0,05 (não significante)

Tabela 9 – Comparações individuais entre os grupos quanto ao fibrosamento aos 15 dias.

Comparações	Interpretação
A70D vs D70D	P > 0,05 (não significativa)
A70D vs Ca(OH)2	P > 0,05 (não significativa)
A70D vs Controle	P < 0,05 (significante)
D70D vs Ca(OH)2	P > 0,05 (não significativa)
D70D vs Controle	P > 0,05 (não significativa)
Ca(OH)2 vs Controle	P > 0,05 (não significativa)

Tabela 10 – Comparações individuais entre os grupos quanto ao fibrosamento aos 30 dias.

Comparações	Interpretação
A70D vs D70D	P > 0,05 (não significativa)
A70D vs Ca(OH)2	P < 0,05 (significante)
A70D vs Controle	P > 0,05 (não significativa)
D70D vs Ca(OH)2	P < 0,05 (significante)
D70D vs Controle	P > 0,05 (não significativa)
Ca(OH)2 vs Controle	P > 0,05 (não significativa)

Teste Kruskal-Wallis

Tabela 11 – Comparação entre os 3 períodos, 7, 15 e 30 dias, nos grupos para cada critério de análise.

Critérios de Análise Quantitativa	Valor de p			
	Controle	Ca(OH) ₂	A70D	D70D
Infiltrado neutrofílico	0,1850	0,0591	0,0359*	0,0050*
Espessura	0,0129*	0,0029*	0,0107*	0,0049*
Fibrosamento	0,0214*	0,0591	0,0025*	0,0025*

Os resultados acima mostraram que em todos os grupos houve diferença significativa estatisticamente entre os períodos, para os grupos quanto aos critérios de análise. Diante disto, foi realizado o teste de Dunn para compará-los individualmente.

Teste de Dunn

Tabela 12 – Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo A70D quanto ao infiltrado neutrofílico.

Comparações	Interpretação
7 dias X 15 dias	P > 0,05 (não significativa)
7 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)
15 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)

Tabela 13 – Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo D70D quanto ao infiltrado neutrofílico.

Comparações	Interpretação
7 dias X 15 dias	P > 0,05 (não significativa)
7 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)
15 dias X 30 dias	P > 0,05 (não significativa)

Tabela 14 – Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo controle quanto à espessura.

Comparações	Interpretação
7 dias X 15 dias	P > 0,05 (não significativa)
7 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)
15 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)

Tabela 15 – Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo Ca(OH)₂ quanto à espessura.

Comparações	Interpretação
7 dias X 15 dias	P > 0,05 (não significativa)
7 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)
15 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)

Tabela 16 – Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo A70D quanto à espessura.

Comparações	Interpretação
7 dias X 15 dias	P > 0,05 (não significativa)
7 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)
15 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)

Tabela 17 – Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo D70D quanto à espessura.

Comparações	Interpretação
7 dias X 15 dias	P > 0,05 (não significativa)
7 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)
15 dias X 30 dias	P > 0,05 (não significativa)

Tabela 18 – Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo controle quanto ao fibrosamento.

Comparações	Interpretação
7 dias X 15 dias	P > 0,05 (não significativa)
7 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)
15 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)

Tabela 19 – Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo A70D quanto ao fibrosamento.

Comparações	Interpretação
7 dias X 15 dias	P > 0,05 (não significativa)
7 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)
15 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)

Tabela 20 – Comparações individuais entre os 3 períodos no grupo D70D quanto ao fibrosamento.

Comparações	Interpretação
7 dias X 15 dias	P > 0,05 (não significativa)
7 dias X 30 dias	P < 0,05 (significante)
15 dias X 30 dias	P > 0,05 (não significativa)

Gráfico 1 - Representação gráfica dos resultados, em escores, do infiltrado neutrofílico de cada grupo nos três tempos experimentais.

* Diferença significativa entre os grupos no mesmo período.

** Diferença significativa entre os períodos do mesmo grupo.

Gráfico 2 - Representação gráfica dos resultados, em escores, do espessura de cada grupo nos três tempos experimentais.

* Diferença significativa entre os grupos no mesmo período.

** Diferença significativa entre os períodos do mesmo grupo.

Gráfico 3 - Representação gráfica dos resultados, em escores, do fibrosamento de cada grupo nos três tempos experimentais.

*Diferença significativa entre os grupos no mesmo período.

** Diferença significativa entre os períodos do mesmo grupo.

6 *DISCUSSÃO*

6 DISCUSSÃO

Biocompatibilidade é definida como a habilidade de um material agir em uma aplicação específica na presença de uma apropriada resposta do hospedeiro (WILLIAMS, 1987). De acordo com o European Committee for Standardization (1996), um material biocompatível deve ser livre de riscos. Materiais endodônticos devem apresentar esta característica pois são utilizados para manter a vitalidade pulpar, desinfetar o sistema de canais (soluções irrigantes e medicação intracanal) e obturar canal radicular (cimentos endodônticos). A biocompatibilidade desses materiais endodônticos é caracterizada por diversos parâmetros como genotoxicidade, mutagenicidade, carcinogenicidade, citotoxicidade, histocompatibilidade e efeito antimicrobiano. É impossível caracterizar biologicamente um material por um simples método e suas propriedades precisam ser investigadas por uma bateria de testes *in vitro* e *in vivo* (HAUMAN e LOVE 2003).

Autian (1970) foi o primeiro a propor uma estrutura de análise em três níveis: 1- toxicidade não específica; 2- toxicidade específica e 3- testes clínicos em humanos. Em 1984, a ISO utilizou essa estrutura e modificou para 1- testes iniciais (cultura de células, mutagenicidade); 2 – testes secundários (implantação em subcutâneo de animais, irritação de mucosa) e 3 – teste de uso. Dessa forma, o desenvolvimento de um novo material deve ser submetido aos três testes sequenciais passando pela metodologia mais simples e inespecífica para a mais complexa, e partindo de animais para uso clínico em seres humanos.

6.1 DA METODOLOGIA

A resposta tecidual não específica causada por materiais endodônticos são normalmente avaliadas por estudos microscópicos pela implantação do material em diferentes tecidos, como: ósseo, muscular ou conjuntivo de camundongos, coelhos, hamsters, porquinhos da índia ou ratos. O material teste pode ser injetado ou implantado por meio de tubos de teflon, silicone, dentina ou polietileno (TORNECK, 1966; SANGBERG, 1969; BINNIE e MITCHELL, 1973; OLSSON; SLIKOWSKI;

LANGLAND, 1981; SAFAVI; PASCON; LANGELAND, 1983; THOMAS; ADRIAN; BANKS, 1985; TAGGER E TAGGER, 1986; ØRSTAVIK e MJÖR, 1988; MAHER et al., 1992; PERTOT et al., 1992; TASSERY et al., 1997; KOLOKURIS et al., 1998).

Os ratos têm sido muito utilizados em pesquisas odontológicas para avaliar as propriedades biológicas dos materiais dentários. A preferência para o uso desse animal dá-se pelo fato de seu metabolismo ser mais acelerado, permitindo a obtenção dos resultados em curto período de tempo (RODRIGUEZ, 2004) além de ser um animal que se reproduz facilmente em laboratório, o que facilita a obtenção de animais livres de doenças. Limitada área para manutenção dos animais, facilidade de higienização e baixo custo são outras vantagens do uso de ratos (COSTA; HEBLING; SOUZA, 2005). No presente estudo, foram utilizados ratos machos provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, de mesma idade e peso corporal aproximado.

Para pesquisas de compatibilidade tecidual de medicamentos, o método de implantação de tubos de polietileno em tecido subcutâneo de rato tem sido recomendada como teste preliminar (LANGELAND et al., 1969). A ISO e a ADA definiram o teste de implantação subcutânea como teste secundário, o segundo passo da avaliação de um novo medicamento, previamente ao uso clínico em seres humanos. Esse método foi idealizado por Dixon e Rickert (1933) e aprimorado por Torneck em 1966, o qual sugeriu o uso de tubos de polietileno, material inerte e que simula as condições do canal radicular, pois permite que o material entre em contato com o tecido apenas nas porções terminais dos tubos. Os tubos de polietileno apresentam ainda a vantagem de serem de fácil manipulação e implantação, não estimularem reação no tecido circunjacente, serem estáveis quimicamente e não sofrerem influência dos medicamentos acondicionados em seu interior (MAKKES et al., 1977). Alguns autores utilizaram tubos de teflon (ECONOMIDES et al., 1995; KOLOKURIS et al., 1998) e ainda tubos de dentina (HOLLAND et al., 2002). No presente estudo optou-se pelo uso do tubo de polietileno pelo fácil manuseio e por ser o recomendado pela ISO.

O diâmetro interno de 1,5mm e o comprimento de 10mm dos tubos de polietileno utilizados foram os utilizados por alguns autores como: Görduysus, Etikan e Gököz (1998), Bortoluzzi (2005) e Ortíz-Oropeza (2007). Como os materiais apresentam consistência pastosa, não houve o problema dos mesmos saírem dos tubos, assim, não foi necessário vedar uma de suas extremidades. A implantação

dos tubos, após a divulsão tecidual, pode ser feita por meio de pinça clínica ou por trocarte, como utilizado por Bortoluzzi em 2005. A opção pelo uso da pinça clínica deu-se pela experiência anterior e pela rotina do laboratório em que foram realizados os experimentos. Seguindo as normas da ISO, foram implantados quatro tubos por animal, sendo que um permaneceu vazio, servindo como controle. Foi respeitada também a distância de no mínimo 2cm entre os tubos, afim de evitar que houvesse a união das regiões dos implantes, comprometendo dessa forma a análise microscópica. Para evitar possíveis interferências das condições anatômicas, sistêmicas e nutritivas dos animais sobre os tubos implantados, realizou-se um rodízio das regiões de implantação de cada material.

Em relação aos períodos experimentais, a ISO recomenda períodos de 7, 28 e 84 dias, a ADA recomenda períodos que podem variar de 7-10, 21-35 e 60-80 dias, porém, na literatura os autores não têm seguido esta recomendação e não há consenso entre os trabalhos como demonstrado no APÊNDICE E. Costa, Hebling e Souza (2005) sugeriram períodos experimentais de 7, 15, 30 e 60 dias, justificando ser possível dessa forma determinar de maneira comparativa a evolução do quadro reacional frente aos materiais em teste. Yaltirik et al. (2004) também já haviam utilizado esses períodos de avaliação. No presente estudo foram seguidas essas sugestões com exceção do período de 60 dias, levando em consideração a observação feita por Moretton et al. (2000), de que, um mês de vida do rato, equivale a aproximadamente 30 meses do ser humano; assim um período de 30 dias para o rato equivale a 2,5 anos para o ser humano. Além disso, no estudo piloto, o período de 30 dias já havia apresentado redução significativa da reação inflamatória. Assim foi decidido não realizar o período de 60 dias para evitar o sacrifício de animais desnecessariamente por questões éticas. Porém ao final do estudo, notou-se que seria interessante ter utilizado o período de 60 dias para melhor observação do mecanismo de reparo em períodos mais longos.

6.2 DOS RESULTADOS

De acordo com os achados neste estudo, pôde-se observar primeiramente a inocuidade dos tubos de polietileno ao tecido conjuntivo dos ratos, uma vez que em todos os períodos experimentais, as laterais dos mesmos não estimularam o

processo inflamatório, como já descrito anteriormente por Torneck et al. (1966), Makkes et al. (1977) e Yaltirik et al. (2004). É válido salientar também que em nenhum espécime foi detectada a presença de microrganismos, demonstrando que a desinfecção dos tubos antes de sua implantação foi eficiente.

O grupo controle, representado pelos espécimes em que os tubos permaneceram vazios, apresentou um crescimento do tecido conjuntivo para o interior dos tubos, como descrito por Makkes et al. (1977). Em todos os períodos, o tecido reacional esteve localizado apenas frente à luz dos tubos e no período de 30 dias notou-se redução significativa de macrófagos e da proliferação fibroblástica e angioblástica, demonstrando a reorganização do tecido anteriormente alterado. O objetivo do grupo controle ser constituído apenas pelos tubos vazios foi para que servisse como parâmetro de comparação com os outros grupos, os quais apresentavam os tubos mais os medicamentos teste, diferentemente dos estudos de Bortoluzzi (2005) e Cintra (2005), que utilizaram a guta-percha como grupo controle.

Na presença do hidróxido de cálcio, a reação tecidual foi semelhante aos relatos descritos na literatura (SCHRÖDER, 1985; NELSON FILHO et al., 1999; LU et al., 2008), com presença de necrose por coagulação no tecido em contato direto e intensa reação inflamatória, caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório neutrofílico, intensa proliferação angioblástica e fibroblástica, além de áreas edematosas. Aos 7 dias, esses fenômenos foram mais intensos, diminuindo aos 15 dias chegando ao trigésimo dia com um tecido reacional delgado, infiltrado inflamatório neutrofílico diminuído e com a presença de células gigantes fagocitando o material. Resultados semelhantes foram descritos para a pasta Callen quando implantada em subcutâneo de camundongos, em que nos períodos de 21 e 63 dias o tecido reacional já se apresentava praticamente normal (BEZERRA DA SILVA, 2007).

Quanto às pastas à base de própolis, ambas apresentaram intensa reação inflamatória no período de 7 dias com intenso infiltrado macrofágico, proliferação angioblástica e fibroblástica, com tecido reacional maior em espessura que o controle (Gráfico 2). A pasta D70D apresentou ainda, infiltrado neutrofílico mais intenso (Gráfico 1) e algumas regiões com macrófagos já fagocitando o material com a presença de necrose por coagulação (Figura 20C), demonstrando maior potencial irritativo. A pasta A70D também apresentou intenso infiltrado neutrofílico, com

grande presença de macrófagos ao redor do material quando extravasado, como demonstrado na Figura 17C.

Aos 15 dias, observou-se pequena redução do tecido reacional de ambas as pastas (Gráfico 2), e ainda com presença de infiltrado neutrofílico e algumas células gigantes. A interação entre os macrófagos e as pastas extravasadas proporcionou numerosas áreas de poeira cromatínica tanto para a pasta A70D (Figura 18C) quanto para a D70D. Quando extravasadas, apresentavam necrose por coagulação ao seu redor.

No período de 30 dias, todos os aspectos da resposta inflamatória estiveram ainda mais reduzidos, com destaque para a pasta A70D, cujo tecido reacional apresentou-se bem reduzido com aspecto muito parecido com o do grupo controle (Figura 19A). Contudo, o fibrosamento esteve maior que os outros grupos e que nos períodos iniciais (Gráfico 3), demonstrando a instalação do processo de reparo.

Essa característica de redução da reação inflamatória com o passar do tempo está de acordo com materiais considerados biocompatíveis por estudos realizados com a mesma metodologia. Mittal, Chandra e Chandra (1995) investigaram a reação do tecido subcutâneo de ratos a cimentos endodônticos por 48h, 7, 14, 30 e 90 dias e constataram que a reação inflamatória diminui com o passar dos períodos. De todos os cimentos testados, o cimento Sealapex, apresentou os melhores resultados, aos 30 dias e a reação inflamatória era leve ou ausente aos 90 dias. Kolokuris et al., (1998) avaliaram a reação do tecido subcutâneo de ratos ao cimento obturador Ketac-Endo e Tubli Seal e observaram que, com o passar dos períodos de 5, 15, 60 e 120 dias a reação tecidual diminuiu. Shahi et al. (2006) compararam a capacidade irritativa do MTA branco, MTA cinza e amálgama em tecido subcutâneo de ratos e também observaram melhora do tecido em contato com o material. Embora o MTA cinza tenha apresentado melhores resultados durante os períodos de 3, 7 e 21 dias, todos os cimentos mostraram-se semelhantes ao grupo controle, no qual os tubos de polietileno permaneceram vazios, o que também aconteceu com a pasta A70D.

A biocompatibilidade de um material é evidenciado pela neoformação óssea e cementária da região afetada (TORABINEJAD et al., 1993; HOLLAND et al., 2001, p.3; HOLLAND et al 2001, p.109). Estudo que envolve apenas tecido conjuntivo, como este, a biocompatibilidade é demonstrada sugestivamente pela formação de fina cápsula fibrosa ao redor do material. Realmente, a formação de um granuloma

de corpo estranho representa uma resposta inflamatória crônica limitante indicando que o organismo foi capaz de isolar o material dos outros tecidos devido à presença e persistência local do agente agressor. A presença de tecido de granulação, indica um processo de reparo, uma pretensa cicatrização da área, com o posterior restabelecimento do tecido perdido por um conjuntivo fibroso (CONSOLARO e RIBEIRO 1998)

Em diferentes estudos utilizando esta técnica, diferentes métodos têm sido usados para comparar os cortes microscópicos em relação à severidade da inflamação ao redor dos tubos contendo os materiais (TORNECK, 1966; OLSSON; SLIKOWSKI; LANGLAND, 1981; OZBAS et al., 2003). Um desses métodos é baseado no critério de Standford. Nesse método, o número de células do infiltrado inflamatório em diferentes partes das secções microscópicas são contadas. Outro método tem sido proposto por Cox et al. (1996), no qual se determina a densidade das células do infiltrado inflamatório da resposta tecidual e necrose para graduar a inflamação. O método utilizado no presente estudo foi baseado no método de Cox com ênfase nas bases histológicas da inflamação. De acordo com esse método a densidade das células inflamatórias, presença de resposta tecidual como fibrose e resposta vascular como a congestão e o extravasamento de fibrina, foram utilizados para determinar a intensidade e a seqüência cronológica da resposta inflamatória (ROBBINS, 1991; COX et al., 1996).

Como a resposta inflamatória do tecido conjuntivo tem diferentes aspectos, focar a interpretação apenas no número de células inflamatórias pode não abranger todos os aspectos da resposta do tecido conjuntivo e parece ser menos compreensivo. Portanto, a atenção às respostas vasculares e reparativas proporciona uma visão mais completa da severidade da inflamação ao redor dos tubos contendo os materiais. Esse modo de avaliação foi utilizado por Bezerra da Silva (2007), o qual além de realizar análise descritiva do tecido reacional utiliza parâmetros como grau de fibrosamento, espessura e infiltrado inflamatório, fornecendo uma visão mais ampla da resposta inflamatória tecidual.

Por ter sido um estudo cego, não se sabe exatamente os componentes das pastas experimentais, sabendo-se apenas que continham própolis. O resultado satisfatório encontrado para a Pasta A70D está relacionado às boas propriedades biológicas da própolis, além dos outros constituintes da pasta, uma vez que a pasta D70D apresentava a mesma concentração de própolis, porém com outros

componentes. Os autores relacionam a boa atividade da própolis a alguns de seus constituintes, como os flavonóides, que são seus principais marcadores e estão relacionados à atividade antiinflamatória, imunomoduladora e redutora de radicais livres (BURDOCK, 1998; BANSKOTA et al., 1998; ROSSI et al., 2002; CARDILE et al., 2003). Outros autores acreditam no sinergismo entre os mais de 300 compostos presentes no extrato de própolis (MENEZES; ALVAREZ; AMEIDA, 1999; KUJUNGIEV et al., 1999).

A própolis quando em contato direto com a polpa dentária demonstrou redução da inflamação pulpar e formação parcial de ponte de dentina após 28 dias (SABIR et al., 2005). Esse achado sugere que a própolis pode estimular a dentinogênese reparadora, envolvendo nesse processo a diferenciação de “odontoblastos-like”, que formam dentina reparadora e atividade biossintética sobre odontoblastos primários. Esses fenômenos exigem a interação entre as moléculas da matriz extracelular e fatores de crescimento, como o TGF- β 1 (TZIAFAS, 2004), e em 2003, Ansorge, Reinhold e Lendeckel já haviam demonstrado que a própolis estimula a formação de TGF- β 1.

Diante dos resultados com as pastas experimentais e os relatos encontrados na literatura a respeito das propriedades biológicas da própolis, cresce a perspectiva do uso clínico de uma medicação intra-canal à base de própolis, devido à boa tolerância tecidual. Porém, apenas o bom comportamento frente aos tecidos vivos não é o suficiente, estudos posteriores microbiológicos são necessários para se determinar a atividade antimicrobiana, condição de suma importância para a descontaminação de canais radiculares com infecções primárias e secundárias.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada é pertinente concluir que:

7.1 - As pastas experimentais à base de própolis apresentam, quando em contato com tecido conjuntivo, intensa reação inflamatória nos primeiros 7 dias, com redução quase completa aos 30 dias, e menor lesão tecidual (necrose) quando comparadas ao hidróxido de cálcio;

7.2 - Os achados deste estudo reforçam a hipótese de que a própolis preparada em forma de pasta, pode ser utilizada como medicação intracanal, embora estudos subseqüentes devam ser realizados para comprovar sua atividade antimicrobiana e seu comportamento no interior do canal radicular.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Aga H et al. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1994;58(5):945-6.

Al-Shaher A, Wallace J, Agarwal S, Bretz W, Baugh D. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. *J Endod*. 2004;30(5):359-61.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION (ADA) – Council on Dental Materials and Devices of the American Dental Association. *J Amer Dent Assoc* 1972; 84:375-95.

Ansorge A, Reinhold D, Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. *Z Naturforsch (C)*. 2003;58(7-8):580-9.

Aqrabawi J. Sealing ability of amalgam, super EBA cement, and MTA when used as retrograde filling materials. *Br Dent J*. 2000;188(5):266-8.

Assed S, Leonardo MR, Silva LAB, Ito IY. Prevalência de microrganismos em canais radiculares de dentes com necrose pulpar e reação periapical crônica – imunofluorescência indireta:efeito do preparo biomecânico e do curativo de demora pela cultura. *Rev Bras Odontol*. 1996;53(1):24-8.

Banskota AH et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their activities. *J Nat Prod*. 1998;61(7):896-900.

Bezerra da Silva RA. Hidróxido de cálcio associado à clorexidina – Estudo em cultura de células (RAW 264.7 e cultura primária de células da linhagem osteoblástica) e em tecido subcutâneo de camundongos. Avaliação da atividade antimicrobiana [tese]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2007.

Binnie WH, Mitchell DF. Induced calcification in the subdermal tissues of the rat. *J Dent Res* 1973;52:1087-91.

Bonhevi JS, Coll FV, Jordà RC. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *J Am Oil Chem Soc, Champaign*. 1994;71(5):529-32.

Bortoluzzi, EA. Avaliação da reação do tecido subcutâneo de ratos à implantação dos cimentos MTA e Portland brancos acrescidos de radiopacificadores

[dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2005.

Bretz WA, Chiego DJ Jr, Marcucci MC, Cunha I, Custódio A, Schneider LG. Preliminary Report on the Effects of Propolis on Wound Healing in the Dental Pulp. *Z. Naturforsch.* 1998;53c(11-12):1045-8.

Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee própolis. *Food Chem Toxicol.* 1998;36(4):347-63.

Campos-Pinto MMD, Oliveira DA, Versiani MA, Silva-Souza YTC, Sousa-Neto MD, Perez DEC. Assessment of the biocompatibility of Epiphany root canal sealer in rat subcutaneous tissues. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod.* 2008;105(5):77-81.

Cardile V, Panico A, Gentile B, Borrelli F, Russo A. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sci.* 2003;73(8):1027-35.

Casaroto AR, Sell AM, Victorino FR, Nagata JY, Brunetta EV, Franco SL, Hidalgo MM. Própolis: promissor meio de estocagem para dentes avulsionados [resumo PI006]. *Braz Oral Res.* 2006;20(supplement):49. Apresentado na 23ª Reunial Anual da SBPqO; 2006, 4-6 de setembro, Atibaia, SP.

Cintra LTA. Avaliação da resposta tecidual frente aos cimentos MTA e MBPc. Análise microscópica de implantes realizados em alvéolos dentários de ratos [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2005.

Consolaro A, Ribeiro FC. Periapicopatias: etiopatogenia e inter-relações dos aspectos clínicos, radiográficos e microscópicos e suas implicações terapêuticas. In: Leonardo MR; Leal JM. *Endodontia: tratamento de canais radiculares*. 3ª edição, São Paulo, Panamericana, 1998. cap.5, p.77-102.

Costa, CAS, Hebling J, Souza PPC. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: ESTRELA, C. *Metodologia Científica*. 2ª edição. São Paulo: Artes Médicas, 2005. cap.12, p.232-271.

Cox CF, Subay RK, Suzuki S, Ostro E. Biocompatibility of various dental materials,pulp healing with a surface seal. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1996;16(3):240–51.

Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis: Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of water-soluble derivative. *Vaccine*. 1992;10(12):817-23.

Dixon, CM, Rickert UG. Tissue tolerance to foreign materials. *Arch Oral Biol*. 1933;20(8):1458-72.

Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol*. 1991;35(1):77-82.

Economides N et al. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod*. 1995;21(3):122-7.

EN 1441 European Committee for Standardization 1996.

Fuentes AMO, Hernandez NR. Accion antimicrobiana de los extractos alcoholicos de propóleo. *Rev Cubana Farm*. 1993;24(1):34-44.

Geraldini CAC, Salgado EGC, Rode SM. Ação de diferentes soluções de própolis na superfície dentinária – avaliação ultra-estrutural. *Pós-Grad Ver Odontol São José dos Campos*. 2000;3(2): 37-42.

Ghisalberti E. Propolis: a review. *Bee World*. 1979;60:59-84.

Giamalia I, Steinberg D, Grobler S, Gedalia I. The effect of propolis exposure on microhardness of human enamel *in vitro*. *J Oral Rehabil*. 1999;26(12):.941–3.

Gopikrishna V, Baweja PS, Venkateshbabu N, Thomas T, Kandaswamy D. Comparison of Coconut Water, Propolis, HBSS, and Milk on PDL Cell Survival. *J Endod*. 2008;34(5):587-9.

Görduysus MO, Etikan I, Gököz A. Histopathological Evaluation of the Tissue Reactions to Endo-Fill Root Canal Sealant and Filling Material in Rats. *J Endod*. 1998;24(3):194-6.

Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of própolis (bee glue). *J R Soc Med*. 1990;83(3):159-60.

Greenaway W et al. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. *Z Naturforsch C*. 1991;46(1-2):111-121.

Gregory SR, Piccolo N, Piccolo MT, Piccolo MS, Heggors JP. Comparison of Propolis Skin Cream to Silver Sulfadiazine: A Naturopathic Alternative to Antibiotics in Treatment of Minor Burns. *J Altern Complement Med*. 2002;8(1):77-83.

Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J*. 2003;36(3):75-85.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabe PFE, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E, Murata SS. Calcium Salts Deposition in Rat Connective Tissue After the Implantation of Calcium Hydroxide-Containing Sealers. *J Endod*. 2002;28(3):173-5.

Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni-Filho JA, Dezan Jr E. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with Mineral Trioxide Aggregate or Portland Cement. *Braz Dent J*. 2001;12(2):109-13.

Holland R, de Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PFE, Otoboni-Filho JA, Dezan Jr E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with Mineral Trioxide Aggregate, Portland Cement or Calcium Hydroxide. *Braz Dent J*. 2001;12(1):3-8.

Ikeno K, Ikeno P, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res*. 1991;25(5):347-51.

International Organization for Standardization. ISO 10993-6: Biological evaluation of medical devices – Part 6: Tests for local effects after implantation. Genève, ISO, 1997.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. Effects of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965;20(3):340-9.

Kedzia A. Sensitivity of anaerobic bacteria to the ethanol extract of propolis. *Phytotherapie pratique*. 1990;6:4-6.

Kolokuris I, Economides N, Beltes P, Vlemmas I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod*. 1998;24(2):82-5.

Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica Montana* against oral pathogens. Arch Oral Biol. 2000;45(2):141-8.

Kujumgiev A et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J Ethnopharmacol. 1999;64(3):235-40.

Langeland K et al. Methods in the study of biologic responses to endodontic materials. Oral Surg. 1969;27(4):522-42.

Leonardo MR, Silva LAB. Medicação tópica entre sessões, “curativo de demora” em biopulpectomia e necropulpectomias I e II. In: Leonardo MR, Leal JM. Endodontia: Tratamento de canais radiculares. 3rd ed. São Paulo: editora Médica Panamericana; 1998. p.491-534.

Leonardo MR. Contribuição para o estudo dos efeitos da biomecânica e da medicação tópica na desinfecção dos canais radiculares [tese]. Araraquara (SP): Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara, Universidade Paulista;1965.

Lindenfelser LA. Antimicrobial activity of própolis. Am Bee J. 1967;107(3):90-2.

Lu Y, Liu T, Li H, Pi G. Histological evaluation of direct pulp capping with a self-etching adhesive and calcium hydroxide on human pulp tissue. Int Endod J. 2008;41(8): 643–50.

Magro-Filho O, Carvalho ACP. Application of própolis to dental sockets and skin wounds. J Nihom Univ Sch Dent. 1990;32:4-13.

Magro-Filho O, Carvalho ACP. Topical effect of própolis in the repair of sulcoplasties by the modified Kazanjian technique. J Nihom Univ Sch Dent. 1994;36(2):102-11.

Maher WO, Johnson RL, Hess J, Steinman HR. Biocompatibility of retrograde filling materials in the ferret canine. Amalgam and IRM. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1992;73(6):738-45.

Makkes PCH, Thoden van Velsen SK, Wesselink PR, Greeve PCM. Polyethylene tubes as a model for the root canal. Oral Surg. 1977;44(2):293-300.

Marcucci MC et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. J Ethnopharmacol. 2001;74(2):105-112.

Marcucci MC. Própolis: chemical composition, biological properties and therapeutical activity. *Apidologie*, Avignon. 1995 ;26(2):83-99.

Martin MP, Pileggi R. A quantitative analisys of propolis : a promising new storage media following avulsion. *Dent Traumatol* 2004 ; 20(2) :85-89.

Matos TC. Mumificação pulpar pelo emprego da própolis (nota prévia). *Rev Bras Odont.* 1989;46(6):44.

Matsuno T. O Efeito terapêutico da própolis. 1ª Ed. Abaeté, São Paulo; 1997.

Menezes H, Alvarez JM, Ameida E. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. *Arzneimittelforschung.* 1999;49(8):705-7.

Miorin PL, Levy Júnior NC, Custodio AR, Bretz WA, Marcucci MC. Antibacterial activity of honey and própolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol.* 2003;95(5):913-20.

Mittal M, Chandra S, Chandra S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. *J Endod.* 1995; 21(12):622-4.

Möller AJ, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res.* 1981;89(6):475-84.

Monti M, Berti E, Carminati G and Cusini M. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis* 1983; 9(2):163-163.

Moraes, FG. Biocompatibilidade dos cimentos Sealer 26 e óxido de zinco e eugenol protegidos ou não com dois diferentes tipos de própolis: análise em tecido subcutâneo de ratos [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2006.

Nelson Filho P, Bezerra Silva LA, Leonardo MR, Sabbag Utrilla L, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. *Int Endod J.* 1999;32(4):303-11.

Olsson B, Siwkowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation in the biological evaluation of endodontic material. *J Endod.* 1981;7(8):355-69.

Oncag O, Cogulu D, Uzel A, Sorkun K. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *Gen Dent*. 2006;54:319-22.

Ørstavik D, Mjör IA. Histopathology and x-ray microanalysis of the subcutaneous tissue response to endodontic sealers. *J Endod*. 1988;14(1):13-23.

Ortiz-Oropeza RM. Avaliação microscópica da resposta do tecido subcutâneo de ratos à implantação do Endo-CPM-Sealer e do Clínquer do cimento Portland cinza puro e acrescido com sulfato de cálcio a 2% e 5% [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.

Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H. Reaction of connective tissue to compomers, composite and amalgam root end filling materials. *Int Endod J*. 2003;36(4):281-7.

Perri de Carvalho OS, Tagliavini DG, Tagliavini RL. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas – Estudo clínico e histológico em ratos. *Rev Ciênc Bioméd*. 1991;12:39-50.

Pertot WJ, Camps J, Remusat M, Proust JP. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the mandibular bone of rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1992;73(5):613-20.

Peters LB, Winkelhoff AJ, Bujis JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J*. 2002;35(1):13-21.

Pettiette M, Hupp J, Mesaros S, Trope M. Periodontal healing of extracted dogs' teeth air-dried for extended periods and soaked in various media. *End Dent Traumatol*. 1997;13(3):113-8.

Phillips JM. Rat connective tissue response to hollow polyethylene tube implants. *J Can Dent Assoc*. 1967;33(2):59-64.

Prado Filho LG, Azevedo L, Flechtmann CHW. Antimicrobianos em própolis de *Apis mellifera*. *Boletim Indústria Animal*. 1962;20:399-403.

Robbins SL, Cortan RS, Kumar V. Pocket compaction to Robbins pathologic basis of diseases, 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1991.

Rodriguez Sosa, SA. Reação histopatológica do tecido conjuntivo do dorso de ratos irradiado com laser de CO₂ ou de Er:YAG [dissertação]. Araraquara (SP): ,

Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista; 2004.

Rossi A, Ligresti A, Longo R, Russo A, Borelli F, Sautebin L. The inhibitory effect of própolis and caffeic acid phenethyl Ester (CAPE) on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine*. 2002;9(6):530-5.

Sabir A, Tabu CR, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Scienc*. 2005;47(3):135-8.

Safavi KE, Pascon EA, Langeland K. Evaluation of tissue reaction to endodontic materials. *J Endod*. 1983;9(10):421-9.

Salomão K et al. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. *Evid. Based Complement. Altern. Med* 2008;5(3):317-324.

Sangberg L. Biological effects of root canal filling materials. 7. Reaction of bony tissue to implanted root canal filling material in guinea pigs. *Odontologisk Tidskrift* 1969; 77:133-59.

Santos FA et al. Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (Bee Glue) and other antimicrobial agents. *Anaerobe*. 2002;8(1):9-15.

Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res*. 1985;64(Spec No):541–8.

Sekine N, Asai Y, Nakamura Y, Tagami T, Nagakubo T. Clinico pathological study of pulp capping with various calcium hydroxide pastes. *Bull Tokyo Dent Coll*. 1971;12(3):149-73.

Senia ES, Marraro RV, Mitchell JL, Lewis AG, Thomas L. Rapid sterilization of gutta-percha cones with 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 1975;1(4):136-40.

Sforcin JM, Fernandes Jr A, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*. 2000;73(1-2):243-9.

Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol*. 2007;113(1):1-14.

Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari HR, Gaderian RA. A Comparative Study of the Biocompatibility of Three Root-end Filling Materials in Rat Connective Tissue. *J Endod.* 2006;32(8):776-80.

Silva EB, Silva FB, Franco SL, Ramalho LTO, Peruchi CMS. Efeito da ação da própolis na lâmina própria da mucosa bucal de ratos. *Estudo histológico.* *Robrac.* 2000;9(28):4-8.

Sonmez S, Kirilmaz L, Yucesoy M, Yücel B, Yilmaz B. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. *J Ethnopharmacol.* 2005;102(3):371-6.

Sosa S, Bornancin A, Tubaro A, Loggia RD. Topical antiinflammatory activity of an innovative aqueous formulation of actichelated propolis vs two commercial propolis formulations. *Phytother Res.* 2007;21(9):823-6.

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(11):1094-1096.

Tagger M, Tagger E. Subcutaneous reactions to implantation of tubes with AH26 and Grossman's sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986;62(4):434-40.

Tassery H, Remusat M, Koubi G, Pertot WJ. Comparison of the intraosseous biocompatibility of Vitremer and super EBA by implantation into the mandible of rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997;83(5):602-8.

Thomas GP, Adrian JC, Banks KE, Robinson JA, Peagler FD. Biocompatibility evaluation of resins in hamsters. *Journal of Prosthetic Dentistry.* 1985;53(3):428-30.

Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* 1993;19(12):591-5.

Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol.* 1966;21(3):379-87.

Trevisan MDP. Própolis. *Inf. Agropec.* 1983;9:50-2.

Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res.* 2004;38(3):314-20.

Victorino FR, Franco SL, Svidzinski TIE, Avila-Campos MJ, Cuman RKN, Hidalgo MM, Bersani-Amado CA. Pharmacological Evaluation of Propolis Solutions for Endodontic Use. *Pharma Biol.* 2007;45(9):721-7.

Williams DF. *Definitions in Biomaterials*. Elsevier, Oxford; 1987.

Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of Connective Tissue to Mineral Trioxide Aggregate and Amalgam. *J Endod.* 2004;30(2):95-9.

Zafalon EJ, Versiani MA, Souza CJA, Moura CCG, Dechichi P. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted into the subcutaneous connective tissue of rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103(5):88-94

Zanoni EMS, Leonardo MR, Lia RCC, Tagliavini RL. Espaços vazios nas obturações endodônticas. *RGO.* 1988;36(3):232-9.

Zmener O. Tissue Response to a New Methacrylate-Based Root Canal Sealer: Preliminary Observations in the Subcutaneous Connective Tissue of Rats. *J Endod.* 2004;30(5): 348-351.

APÊNDICES

APÊNDICE B - Dados da Análise Descritiva dos Espécimes nos 3 Períodos Experimentais do Grupo Ca(OH)₂.

Período Experimental					7 dias					15 dias					30 dias						
Espécimes					1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
Infiltrado Inflamatório	Tipo Celular	PMN	Neutrófilo		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X				
			Eosinófilo																		
		MN	Macrófago		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X				
			Linfócito		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X				
			Plasmócito																		
			CGMNI's					X	X		X	X				X	X	X			
	Macrófagos	Distribuição	Ao acaso		X	X	X	X	X	X	X										
			Periférica																		
			À distância																		
		Citoplasma	Homogêneo		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X				
			Vacuolado																		
			Com Partículas																		
		Núcleo	Normal		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X				
			Alterado																		
		Células Gigantes Multinucleadas	Citoplasma	Aspecto	Homogêneo				X	X		X	X	X	X						
					Vacuolado																
	Com partículas																				
	Contorno			Regular				X	X		X	X									
				Irregular																	
	Núcleo		Número																		
			Distribuição	Ao acaso																	
				Periféricos				X	X		X	X									
			Tipo	Langerhans				X	X		X	X				X		X			
				Corpo estranho													X	X	X		
Fenômenos Reparatórios	Proliferação fibroblástica			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X				
	Proliferação angioblástica			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X				
	Fibrosamento	Densidade		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		3	1	1				
		Organização	Ao acaso		X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X				
	Capsular																				
	Tecido mineralizado			Periférico																	
			À distância																		
Características do Material	Homogêneo																				
	Não Homogêneo	Granular		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X				
		Com cristais		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X				
		Fibroso																			
	Localização em relação à abertura do tubo	Aquém																			
		Ao nível		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X				
		Além		X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X				
	Fagocitável	Sim		X	X	X	X	X	X	X	X	X									
		Não																			
Outras Observações			Abscedação																		
			Hemorragia																		
			Necrose		X	X	X	X	X	X	X	X	X								

APÊNDICE C - Dados da Análise Descritiva dos Espécimes nos 3 Períodos Experimentais do
Grupo A70D.

Período Experimental					7 dias					15 dias					30 dias						
Espécimes					1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5		
Infiltrado Inflamatório	Tipo Celular	PMN		Neutrófilo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
				Eosinófilo																	
		MN		Macrófago	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		
				Linfócito	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		
				Plasmócito																	
				CGMNIs									X								
	Macrófagos	Distribuição		Ao acaso	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		
				Periférica																	
				À distância																	
		Citoplasma		Homogêneo	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		
				Vacuolado																	
				Com Partículas																	
		Núcleo		Normal	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		
				Alterado																	
		Células Gigantes Multinucleadas	Citoplasma	Aspecto	Homogêneo								X								
					Vacuolado																
	Com partículas																				
	Contorno		Regular									X									
			Irregular																		
	Núcleo		Número																		
			Distribuição	Ao acaso									X								
				Periféricos																	
			Tipo	Langerhans																	
Corpo estranho																					
Fenômenos Reparatórios	Proliferação fibroblástica			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X			
	Proliferação angioblástica			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X			
	Fibrosamento	Densidade		3	3	3	3	3	3	3	3	2	2		2	2	2	2			
		Organização	Ao acaso	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
			Capsular													X	X	X			
	Tecido mineralizado		Periférico																		
À distância																					
Características do Material	Homogêneo																				
	Não Homogêneo		Granular	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X			
			Com cristais	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		
	Localização em relação à abertura do tubo		Fibroso																		
			Aquém																		
			Ao nível	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		
	Fagocitável		Além								X	X	X	X							
			Sim								X	X	X	X		X	X	X	X		
			Não																		
Outras Observações			Abscedação																		
			Hemorragia																		
			Necrose								X	X	X	X							

APÊNDICE D - Dados da Análise Descritiva dos Espécimes nos 3 Períodos Experimentais do Grupo D70D.

Período Experimental					7 dias					15 dias					30 dias					
Espécimes					1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
Infiltrado Inflamatório	Tipo Celular	PMN	Neutrófilo		X	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X		
			Eosinófilo																	
		MN	Macrófago		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
			Linfócito		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
			Plasmócito																	
		CGMNI's											X	X						
	Macrófagos	Distribuição	Ao acaso		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
			Periférica																	
			À distância																	
		Citoplasma	Homogêneo		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
			Vacuolado																	
			Com Partículas																	
		Núcleo	Normal		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	
			Alterado																	
	Células Gigantes Multinucleadas	Citoplasma	Aspecto	Homogêneo								X								
				Vacuolado																
				Com partículas																
			Contorno	Regular									X							
				Irregular																
		Núcleo	Número																	
			Distribuição	Ao acaso									X							
				Periféricos																
			Tipo	Langerhans																
				Corpo estranho									X	X						
		Fenômenos Reparatórios	Proliferação fibroblástica			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
Proliferação angioblástica			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X			
Fibrosamento	Densidade		3	3	3	3	3	2	3	2	3		1	1	1	1				
	Organização		Ao acaso		X	X	X	X	X											
Capsular									X	X	X	X		X	X	X				
Tecido mineralizado			Periférico																	
			À distância																	
Características do Material	Homogêneo																			
	Não Homogêneo	Granular		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X			X		
		Com cristais		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X			X		
		Fibroso																		
	Localização em relação à abertura do tubo	Aquém																		
		Ao nível		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X		
		Além		X	X	X	X	X	X			X	X					X		
	Fagocitável	Sim		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
		Não																		
Outras Observações			Abscedação																	
			Hemorragia																	
			Necrose		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						

APÊNDICE E - Tabela dos tempos experimentais utilizados por autores em estudos com implantação em tecido conjuntivo de ratos.

Autor	Revista	Tempos Experimentais
Campos-Pinto <i>et al.</i> 2008	OOO	7, 21 e 42 dias
Zafalon <i>et al.</i> 2007	OOO	15, 30, 60 e 90 dias
Shahi S <i>et al.</i> 2006	JOE	3, 7 e 21 dias
Sumer <i>et al.</i> 2006	JOE	15, 30 e 60 dias
Zmener O 2004	JOE	10, 30, 90, 120 dias
Yaltirik M 2004	JOE	7, 15, 30, 60, 90 dias
Ozbas H 2003	Int End J	7, 15, 30, 60, 90 dias
Görduysus M <i>et al.</i> 1998	JOE	2, 7, 14, 28, 56 dias
Kolokouris I, <i>et al.</i> 1998	JOE	5, 15, 60 e 120 dias
Economides N, <i>et al.</i> 1995	JOE	7, 14, 21 dias

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética o Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru –FOB/USP.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 25/2005

Bauru, 21 de novembro de 2005.

Senhor Professor,

Informamos que esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, apreciou o projeto de pesquisa **"Avaliação microscópica do tecido conjuntivo de ratos frente ao uso de formulações a base de própolis"** de autoria de Fausto Rodrigo Victorino, emitindo **parecer favorável "ad referendum"** à realização do trabalho tendo em vista não haver infrações éticas.

Sendo o que nos apresenta para o momento, despedimo-nos

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Antônio de Assis Taveira
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Ilmº Sr. Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante
DD, Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários

ANEXO B - Esquema posológico estabelecido pelo biotério da FOB-USP.

TABELA PARA ANESTESIA DE RATO

INTRAMUSCULAR: (Face posterior da coxa , agulha: 13 x 3,8)

MEDICAÇÃO PRÉ-ANESTÉSICA (M.P.A): Quetamina 25 mg/Kg IM.

ANESTESIA: Xilazina 10 mg/kg (IP) associada à
Quetamina 25 mg/kg (IP) na mesma seringa.

Período latência (PL): 2-5 min;

Período hábil (PH): 40 min.

Rato Peso (g)	Relaxante Muscular (M.P.A)	ANESTESIA	
	QUETAMINA Francotar, Dopalen, Vetaset ml.	XILAZINA Anasedan, rompun ml.	QUETAMINA 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

Fonte: Manual para técnicos em bioterismo
Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)

BIOTÉRIO - FOB