UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MELINA VIEIRA BORTOLO

Análise comparativa da reação tecidual à implantação de tubos de polietileno, bastões de dentina e cápsulas de colágeno. Estudo microscópico em tecido subcutâneo de ratos. Avaliação de um modelo metodológico

BAURU

2009

MELINA VIEIRA BORTOLO

Análise comparativa da reação tecidual à implantação de tubos de polietileno, bastões de dentina e cápsulas de colágeno. Estudo microscópico em tecido subcutâneo de ratos. Avaliação de um modelo metodológico

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração em Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia

BAURU

2009

Bortolo, Melina Vieira

B648a Análise comparativa da reação tecidual à implantação de tubos de polietileno, bastões de dentina e cápsulas de colágeno. Estudo microscópico em tecido subcutâneo de ratos. Avaliação de um modelo metodológico / Melina Vieira Bortolo – Bauru, 2009.
173 p.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia

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

Assinatura:

Data:

Data de aprovação pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP: 29 de janeiro de 2008.

Protocolo nº: 028/2007

A cópia do parecer de aprovação encontra-se no capítulo “Anexo”.

DADOS CURRICULARES

Melina Vieira Bortolo

Nascimento	18 de março de 1981, Presidente Prudente – SP
Filiação	Arlindo Vieira Bortolo Maria Elena Muradas Vieira Bortolo
1999 – 2003	Curso de Graduação em Odontologia na Universidade do Oeste Paulista – Presidente Prudente – SP
2004	Curso de Aperfeiçoamento em Endodontia – Profis – Bauru – SP
2004 – 2006	Curso de Especialização em Endodontia no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP – Bauru – SP
2006	Aluna Especial no Curso de Pós-Graduação em nível de Mestrado em Odontologia, Área de concentração em Endodontia, na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Araraquara – SP
2007 - 2009	Curso de Pós-Graduação em nível de Mestrado em Odontologia, Área de concentração em Endodontia, na Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo
Associações	ABO – Associação Brasileira de Odontologia – SP APCD – Associação Paulista Dos Cirurgiões Dentistas GRUBE – Grupo Bauruense de Endodontia SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, Brasil

Dedicatória

Dedicatória

Aos meus pais, *Arlindo e Maria Elena*, e ao meu irmão, *Caroldo*,
que é também um pai pra mim, dedico esta música que representa tudo que são em
minha vida: pais, amigos, irmãos, companheiros e principalmente pessoas que
cuidam de mim com um amor incondicional.

“Tens o dom de ver estradas onde eu vejo o fim
Me convences quando falas: Não é bem assim!
Se me esqueço, me recordas, se não sei, me ensinas
E se perco a direção, vens me encontrar

Tens o dom de ouvir segredos mesmo se me calo
E se falo, me escutas, queres compreender
Se pela força da distância, tu te ausentas
Pelo poder que há na saudade, voltarás!

Quando a solidão doeu em mim
Quando o meu passado não passou por mim
Quando eu não soube compreender a vida
Tu vieste compreender por mim

Quando os meus olhos não podiam ver
Tua mão segura me ajudou a andar
Quando eu não tinha mais amor no peito
Teu amor me ajudou a amar

Quando os meus sonhos vi desmoronar
Me trouxeste outros pra recomeçar
Quando me esqueci que era alguém na vida
Teu amor veio me relembrar:

QUE DEUS ME AMA, QUE NÃO ESTOU SÓ
QUE DEUS CUIDA DE MIM QUANDO FALA PELA TUA VOZ
E ME DIZ: CORAGEM!”

Padre Fábio de Melo

*Eu amo vocês, de toda a minha alma! Obrigada por cuidarem de mim com tanto amor. Vocês
são iluminados por Deus e eu sou abençoada por tê-los em minha vida!*

E ao meu noivo, *Bruno*, que é o homem ideal na minha vida, que mudou por completo toda a minha história, que me acompanha, me incentiva, me apoia, é meu cúmplice, me escuta, enfim, é o marido que sempre desejei. Obrigada por modificar maravilhosamente a minha vida.

"Você me mostra o caminho e eu te ensino a caminhar!"

E foi assim que você mudou a minha vida, me mostrando novos caminhos, novos horizontes e, é por isso que hoje estou aqui! Obrigada por fazer parte da minha história, que se tornou mais abençoada depois de tê-lo conhecido! É assim que nos completamos!

Te amo, meu amor.

Agradecimientos

Agradecimento Especial

Deus

*"Graças Pai, hoje venho te dar e prostrar-me aos teus pés
Somente para agradecer-te, somente para dar-te graças
Pois não encontro outras palavras em meu ser*

*Graças Pai, pelos pequenos e belos detalhes
Por cada coisa que me deste, por cada coisa que me negaste
Mais que isto, Graças Pai, por ti mesmo e pelo que és
Por ti mesmo e como és, venho agradecer"*

Martín Valverde

Meu Pai querido, só tenho a agradecer pela minha vida, minha família, pelo meu noivo, pelos meus amigos, e por esse momento tão especial que estou vivendo. O Senhor me presenteia todos os dias com o dom da vida, me presenteia com os pequenos e belos detalhes, e é por isso que te dou GRAÇAS!

Eu te amo, meu Pai querido!

Agradecimento Especial

Ao meu orientador:

Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia

Pela paciência, apoio, incentivo e pela confiança em mim depositada. Fui agraciada no dia que fui escolhida para ser orientada por esse mestre, tão culto, educado e tão gentil. Meus dias se tornaram melhores com a presença de alguém tão iluminado em minha vida. Obrigada pela sua dedicação, por me ouvir e entender as minhas dúvidas e as minhas ansiedades. Admiro sua determinação e competência. Agradeço sua preciosa orientação, os ensinamentos repassados, sua amizade e incentivo constante que foram fundamentais para realização deste trabalho e contribuíram muito para o meu desenvolvimento e crescimento profissional e pessoal.

Meu sincero respeito e gratidão!

"Educar é ensinar a pensar sozinho."

Agradecimentos

À minha cunhada, *Lucinéia*, pelo apoio, pelo incentivo e pela amizade neste período que estive em busca desse ideal. Aos meus sobrinhos, *Nathália e Felipe*, que são como filhos para mim, que são meus amores, são tudo em minha vida.

Às minhas tias, *Lai, Nice, Tera e Vera*, e aos seus respectivos maridos, que estiveram sempre me apoiando, em prontidão para me ajudar. Sei que pude contar com as suas orações. Obrigada!

Aos meus primos queridos, *Ana Lúcia, Carolina, Junior, Márcia, Patrícia e à minha pequena e amada Rafaela* que sempre demonstraram tanto carinho e amor por mim. Tenho-os como irmãos. Obrigada pela preocupação e amizade constante! Agradeço à família de cada um de vocês, eles estão em meu coração!

Aos meus novos pais, *Orlando e Chaíza* e às minhas queridas cunhadas, *Veridiana e Giovanna*, pelo incentivo, apoio, confiança, amizade e constante carinho. Sou abençoada por essa nova família que estamos formando!

Aos meus queridos mestres, *Luís e Maria Luíza Stuardi*, meus primeiros professores de Endodontia, o início de tudo. Lembro-me da minha primeira abertura coronária, lembro-me de seus ensinamentos, com amor, paciência e dedicação e foi assim que me encantei por essa disciplina. Obrigada, meus queridos professores, se hoje estou aqui é porque vocês fizeram parte dessa história. Obrigada por me fazerem ser apaixonada pela Endodontia.

Aos professores do Centrinho, *Prof. Dr. Celso Kenji Nishiyama* e à *Prof. Dr.^a Renata Dardini Hussne*, por me ensinarem a amar ainda mais a Endodontia. Obrigada pela oportunidade, pela amizade e pelo incentivo constante. Viver nesse hospital por 2 anos é algo inexplicável, é contagiante, é prazeroso. Estar no Centrinho é um aprendizado para a vida, para o resto da vida! Obrigada meus queridos, por tudo, sempre!

À minha querida amiga e confidente, *Edinha*, pelo apoio, companheirismo e amizade. Obrigada querida, por tornar meus dias mais alegres!

Aos professores da disciplina de Endodontia da Unesp de Araraquara, em especial, *Fábio Luiz Berbert*, *Idomeo Bonetti Filho*, *Mário Tanomaru Filho* e *Renato de Toledo Leonardo* por confiarem em mim e pelo apoio nos momentos que precisei. Agradeço a convivência de 1 ano como aluna especial nessa instituição. Obrigada pela oportunidade!

Aos professores da disciplina de Endodontia da FOB-USP, *Glovis Monteiro Bramante*, *Ivaldo Gomes de Moraes*, *Norberti Bernardinelli* e *Roberto Brandão Garcia*, pela convivência, pelo apoio, pela amizade, pelos ensinamentos repassados. Foi gratificante estar nessa instituição ao lado de professores renomados como vocês! Obrigada pela oportunidade e confiança em mim depositada! Foram 2 anos muito produtivos, onde meu crescimento foi pessoal e profissional. Sinto pelo tempo ter passado rápido demais. Agradeço a oportunidade de tê-los ao meu lado!

E ao mais novo professor contratado pela FOB – USP, da disciplina de Endodontia, *Prof. Dr. Marco Antônio Hungaro Duarte*, pela ajuda com a análise estatística e pela prontidão em me ajudar. Admiro sua disposição, competência, determinação e principalmente sua humildade. Parabéns por alcançar seu objetivo e mais uma vez obrigada!

Ao *Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis*, do departamento de Histologia, pela orientação dada para a avaliação microscópica e interpretação dos resultados deste estudo e pela disposição e atenção em todos os momentos que precisei. Admiro sua dedicação, competência e amor à profissão! Obrigada mais uma vez!

Ao *Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira*, do departamento de Bioquímica, por me ajudar com suas experiências e ensinamentos!

A *todos os professores* do curso de mestrado da FOB – USP, pela contribuição neste período.

Às minhas amigas, *Juliane*, uma amiga sempre disposta a ajudar em todos os momentos que precisei, um anjo que sentirei muita falta e, *Michelle*, sempre me apoiando com suas palavras doces.

Ao meu amigo, *Fábio Aznar*, que em nenhum momento hesitou em me ajudar. Sua prontidão em ajudar as pessoas é algo fascinate, é admirável. Tem o dom de ajudar, o dom de ensinar, enfim, tem o dom de ser amigo! Fábio, obrigada por tudo! Você foi essencial para o meu aprendizado!

Aos meus colegas de mestrado, *Ericson, Fabiana, Marcela, Natasha, Paulo, Rodrigo, Ronald e Tatiana*, pelos bons momentos de convivência nos seminários, clínica, laboratório e pelo constante aprendizado. Que todos nós consigamos atingir os objetivos pelos quais lutamos!

Em especial aos amigos, *Ericson e Rodrigo*, pela amizade que foi desenvolvida entre nós. Obrigada, meus amigos, pelos momentos de desabafo, pelo apoio nas dificuldades, e também pelos tantos bons momentos que passamos juntos. E ao amigo, *Ronald*, que sempre muito disposto, esteve pronto nos momentos que precisei de sua ajuda. Obrigada Ronald, você me ensinou muito!

Aos colegas de doutorado da Endodontia, *Bethânia, Fausto, Fernando, Jácio, Livia e Ronan*, pela contribuição neste período. Meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas da Pós-Graduação de todas as áreas e aos alunos da Graduação, pelo convívio e aprendizado.

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia da FOB-USP, *Pleide Vital Martins, Edimauro de Andrade, Neide Leandro, Patrícia Fernanda Vital Lopes, Suelly Regina Bettio*, meu muito obrigado por todo auxílio e pelo carinho.

Ao pessoal da Disciplina de Histologia, as biólogas *Tânia Mary Pestari, Daniele Santi Peolin e Patrícia de Sá M. Germini*, sempre dispostas a ajudar com o maior desprendimento, obrigado pelos conselhos e ensinamentos para realização deste trabalho.

Aos amigos da Microbiologia, *André e Dabrá*, obrigada pela amizade, pelo carinho, pelas conversas, por toda a compreensão de vocês. E ao professor e querido amigo, *Sérgio Aparecido Torres*, obrigada pelo apoio e amizade! Tenho um carinho enorme por vocês!

À farmácia *Específica - Manipulação de Fórmulas (Bauru – SP)*, pela doação das cápsulas de colágeno.

E a *todas as pessoas* que contribuíram de forma direta ou indireta para a elaboração deste trabalho. Muito obrigada a todos vocês!

Melina Vieira Bortolo
Junho/2009

*Posso, tudo posso naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar*

*Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
Mas na alma, há certeza da vitória*

*Vou cantando minha história, profetizando
Que eu Posso, Tudo Posso.....*

Em JESUS

Celina Borges

*“A diferença entre o impossível e o possível reside na
determinação da pessoa”*

Tommy Lasorda

Agradecimentos Institucionais

À *Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo*, através do seu atual diretor, Prof. Dr. Luis Fernando Pegoraro e à *Comissão de Pós-Graduação*, representada, pela Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira, pelo apoio à pesquisa.

Aos funcionários da *secretaria de Pós-graduação*, pela colaboração prestada desde os primeiros dias do mestrado, muito obrigada!

Ao setor de *Biblioteca e Documentação da FOB - USP*, pelo apoio e colaboração durante este período.

À comissão do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, na pessoa de *Luiz Carlos da Silva* e demais funcionários, pela disponibilidade, ajuda, total atenção durante os procedimentos laboratoriais e cuidados com os animais utilizados neste trabalho.

Ao *setor Financeiro* da **FOB - USP**, pela aquisição de todos os materiais necessários para a realização deste trabalho.

Ao **CNPq**, pelo suporte financeiro.

Ao *Programa de Aperfeiçoamento de Ensino* (PAE), pelo apoio financeiro.

Resumo

RESUMO

Para se avaliar a citotoxicidade de materiais endodônticos, uma das metodologias utilizadas é a implantação de amostras dos materiais no tecido conjuntivo de pequenos animais, e para essa implantação são utilizados acondicionadores. O propósito deste estudo foi comparar as reações teciduais de alguns acondicionadores utilizados neste tipo de pesquisa, propondo desta maneira uma melhor metodologia para ser utilizada em trabalhos futuros. Foram implantados no tecido subcutâneo de 54 ratos, tubos de polietileno, bastões de dentina e cápsulas de colágeno, formando 3 grupos que permaneceram com os implantes pelos períodos de 15, 30 e 60 dias. Os espécimes dos grupos I e II foram analisados pela microscopia óptica de modo descritivo e morfométrico, considerando 5 critérios morfológicos: fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos, células inflamatórias e outros componentes. O grupo III foi submetido, apenas, à análise descritiva. Os valores médios encontrados nos grupos I e II foram submetidos ao Teste “t” de Student para comparação entre os grupos nos períodos experimentais. O Teste ANOVA foi aplicado para comparar os períodos, nos grupos experimentais, e os valores significantes foram submetidos ao teste de Tukey. Os resultados obtidos revelaram que os tubos de polietileno e bastões de dentina induziram reações teciduais semelhantes, demonstrando, aos 60 dias, um comportamento de reparo. As cápsulas de colágeno foram reabsorvidas e houve recomposição morfológica do tecido subcutâneo.

Palavras chave: Biocompatibilidade. Endodontia. Raízes dentais. Tecido conjuntivo.

Abstract

ABSTRACT

Comparative analysis of the tissue response to the implantation of polyethylene tubes, dentin tubes and collagen capsules. A microscopic study in subcutaneous tissue of rats. Evaluation of a methodology model

With the purpose of evaluating the citotoxicity of some endodontic materials, their implantation in subcutaneous tissue of small animals is performed, with the aid of containers, which are used to carry the testing materials. The aim of this study was to compare the subcutaneous tissue response related to the implantation of polyethylene tubes, dentin tubes and collagen capsules usually used as carrier materials in this kind of methodology. 54 rats were divided in 3 groups: polyethylene tubes (Group I), dentin tubes (Group II) and collagen capsules (Group III). After 15, 30 and 60 days of implantation, the animals were killed and the specimens of group I and II were prepared for descriptive and morphometric analysis considering: collagen fibers, fibroblasts, vessels, inflammatory cells and other components. The group III (collagen capsules) was only evaluated through descriptive analyses. The average values of group I and II were submitted to "T" student test for comparison between the groups in the experimental periods. ANOVA-Tukey test was used to show a difference in the tissue response in the different periods to each material. The results showed similar tissue reaction between polyethylene and dentin tubes, showing organization of the tissue at 60 days. The collagen capsules were resorbed showing morphological recomposition of the subcutaneous tissue.

Key words: Biocompatibility. Connective tissue. Dental roots. Endodontics.

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1-	Tubos de polietileno, bastões de dentina e cápsulas de colágeno	103
Figura 2-	Incisão no dorso do animal	103
Figura 3-	Divulsão do tecido subcutâneo com tesoura ponta romba	103
Figura 4-	Sutura com fio de seda 4.0	103
Figura 5-	Tecidos subcutâneo e cutâneo removidos em bloco com o material implantado	103
Figura 6-	Esquema de casualização dos campos microscópicos, em cada lateral, por corte histológico	109
Figura 7-	Gratículo de integração II Zeiss sobre a imagem de um corte histológico	109
Figura 8-	Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo tubo de polietileno aos 15 dias	117
Figura 9-	Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo bastão de dentina aos 15 dias	117
Figura 10-	Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pela cápsula de colágeno aos 15 dias	119
Figura 11-	Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo tubo de polietileno aos 30 dias	123
Figura 12-	Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo bastão de dentina aos 30 dias	123
Figura 13-	Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pela cápsula de colágeno aos 30 dias	125
Figura 14-	Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo tubo de polietileno aos 60 dias	129
Figura 15-	Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo bastão de dentina aos 60 dias	129
Figura 16-	Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pela cápsula de colágeno aos 60 dias	131

GRÁFICOS

Gráfico 1-	Representação gráfica dos valores médios da densidade de volume (%) das fibras colágenas	134
Gráfico 2-	Representação gráfica dos valores médios da densidade de volume (%) dos fibroblastos	134
Gráfico 3-	Representação gráfica dos valores médios da densidade de volume (%) dos vasos sanguíneos	135
Gráfico 4-	Representação gráfica dos valores médios da densidade de volume (%) das células inflamatórias	135
Gráfico 5-	Representação gráfica dos valores médios da densidade de volume (%) de outros componentes	136

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Grupos, condicionadores, períodos pós-operatórios e número de animais	99
Tabela 2-	Valores médios e desvio padrão da densidade de volume (%) de fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e de outros componentes encontrados no tecido conjuntivo adjacente à superfície do material implantado	133
Tabela 3-	Teste “t” de Student, comparando os grupos I e II, no período de 15 dias	137
Tabela 4-	Teste “t” de Student, comparando os grupos I e II, no período de 30 dias	137
Tabela 5-	Teste “t” de Student, comparando os grupos I e II, no período de 60 dias	138
Tabela 6-	Teste ANOVA. Comparação entre os períodos experimentais nos grupos I e II, e teste de Tukey para as diferenças significantes	139

Lista de Abreviaturas ou Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

cm:	centímetro
°C:	grau centígrado ou Celsius
µm:	micrômetro
ml:	mililitro
mm:	milímetro
g:	Grama
%:	por cento
p:	nível de significância
pH:	potencial hidrogênico
X:	fator de aumento
=:	Igual
Ltda:	limitada
H.E.:	Hematoxilina e Eosina
ADA:	American Dental Association
FDI:	Fédération Dentaire Internationale
EDTA:	ácido etilenodiaminotetracético
MTA:	Agregado Trióxido Mineral
IRM:	Material Restaurador Intermediário
PMNs:	Polimorfonucleadas
CEEPA:	Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
FOB:	Faculdade de Odontologia de Bauru
USP:	Universidade de São Paulo
Nº:	número

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	61
2	REVISÃO DE LITERATURA	67
2.1	TUBO DE POLIETILENO	67
2.2	TUBO DE DENTINA	76
2.3	CÁPSULA DE COLÁGENO	85
3	PROPOSIÇÃO	93
4	MATERIAL E MÉTODOS	97
4.1	ANIMAIS	97
4.2	ACONDICIONADORES AVALIADOS	97
A)	Tubos de polietileno	97
B)	Bastões de dentina	98
C)	Cápsulas de colágeno	99
4.3	ANESTÉSICO	99
4.4	GRUPOS EXPERIMENTAIS	99
4.5	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	100
4.6	OBTENÇÃO DAS PEÇAS	101
4.7	PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO	105
4.8	FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	106
4.8.1	Análise descritiva	106
4.8.2	Avaliação morfométrica	106
A.	Casualização dos campos microscópicos	107
B.	Avaliação morfométrica da densidade de volume (Vvi) das fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e outros componentes	107
4.8.3	Análise estatística	111
5	RESULTADOS	115
5.1	ANÁLISE DESCRITIVA	115
5.2	AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA DENSIDADE DE VOLUME (%) DE FIBRAS COLÁGENAS, FIBROBLASTOS, CÉLULAS INFLAMATÓRIAS, VASOS SANGÜÍNEOS E DE OUTROS COMPONENTES ENCONTRADOS NO TECIDO CONJUNTIVO ADJACENTE AO MATERIAL IMPLANTADO	133
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	137
6	DISCUSSÃO	143
6.1	DA METODOLOGIA	143
6.1.1	Dos condicionadores empregados	145
6.2	DOS RESULTADOS	148
7	CONCLUSÕES	155
	REFERÊNCIAS	159
	APÊNDICE	169
	ANEXO	173

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Durante o tratamento endodôntico, é imprescindível o cuidado com os tecidos apicais e periapicais. Tais tecidos podem apresentar-se íntegros, comprometidos por processo patológico ou agredidos durante o tratamento, em decorrência da sobreinstrumentação ou do extravasamento de soluções irrigadoras, medicamentos e materiais obturadores. O extravasamento de substâncias, durante as fases do tratamento endodôntico, caracteriza a presença de um corpo estranho no interstício dos tecidos apicais ou periapicais, cuja magnitude da reação depende da biocompatibilidade ou não das mesmas (TORNECK, 1966; 1967).

A aceitação para uso clínico de um determinado produto deve estar fundamentada em experimentos “in vitro” e “in vivo” que demonstrem propriedades físicas, químicas e biológicas adequadas para a aplicação em ser humano. Para o estudo de propriedades biológicas, diversas metodologias têm sido desenvolvidas de modo a elucidar com maior clareza a biocompatibilidade de diversos materiais de uso endodôntico. A implantação de amostras de materiais no tecido conjuntivo de pequenos animais é considerada uma das metodologias adequadas para avaliação da biocompatibilidade (OLSSON; SLIWKOWSKI; LANGELAND, 1981). Apesar de que as reações observadas, nesse tipo de teste, não podem ser consideradas réplicas daquelas encontradas nos tecidos pulpar, apical e periapical, as normas divulgadas pela ADA (1972; 1982) e FDI (STANFORD, 1980; STANLEY, 1992; ISO, 1997) consideram o referido teste como válido nas etapas preliminares da pesquisa da histocompatibilidade de diversos materiais endodônticos.

Os materiais a serem testados são acondicionados em tubos e desta maneira são implantados no tecido conjuntivo de pequenos animais. Essa metodologia

simula uma condição clínica de extravasamento de substância de uso endodôntico. Em geral, os implantes dos materiais endodônticos, em tecido conjuntivo, são realizados em tubos de polietileno (MAGRO, *et al.*, 1987; GORDUYSUS; ETIKAN; GOKOZ, 1998; YALTIRIK, *et al.*, 2004; CINTRA, *et al.*, 2006; MORAIS, *et al.*, 2006; SUMER, *et al.*, 2006; MORI, *et al.*, 2009). São utilizados também tubos de teflon (OLSSON; SLIWKOWSKI; LANGELAND, 1981; ECONOMIDES, *et al.*, 1995; KOLOKOURIS, *et al.*, 1996; 1998), de silicone rígido (ZMENER; GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1990), tubos de dentina (SOUZA, *et al.*, 1977; ZANONI, *et al.*, 1988; HOLLAND, *et al.*, 1999; 2001; 2002a; 2002b), e recentemente, tem sido utilizada cápsulas de colágeno para determinados materiais (OLIVEIRA, *et al.*, 1999; SICCA, *et al.*, 2000; ZAMBUZZI, *et al.*, 2005; 2006; GARCIA, 2008).

Torneck (1966) foi o primeiro a introduzir os tubos de polietileno em pesquisas de implantação subcutânea para simular canais radiculares. Avaliou a reação do tecido subcutâneo de ratos, relacionando o diâmetro e o comprimento dos tubos implantados, comparando assim, se os espaços não obturados em canais radiculares influenciariam no reparo do tecido conjuntivo. Os resultados mostraram a formação de uma cápsula fibrosa, que envolvia os implantes, ausência de reação inflamatória, indicando a aceitabilidade do material e um crescimento de tecido conjuntivo para o interior dos tubos de maior diâmetro e menor comprimento. Os resultados demonstram que o diâmetro e o comprimento dos tubos parecem influenciar no reparo, ou seja, havendo espaço suficiente, o tecido de granulação invagina-se, preenchendo os segmentos vazios. Em Endodontia a situação seria semelhante: segmentos de canais radiculares não obturados, porém limpos e com diâmetro adequado, seriam preenchidos por tecido de granulação, oriundos do periápice, e reparados.

Makkes et al. (1977), avaliaram a reação do tecido conjuntivo de ratos frente ao tubo de polietileno e, também o deslocamento desses tubos. Os autores concluíram que o modelo experimental é facilmente manejável, e observaram após 3 semanas de implantação, não havia nenhum sinal adicional de inflamação. Também demonstraram que o material é quimicamente estável no organismo do animal utilizado e que não é influenciado por medicamentos ou outras substâncias que possam estar em seu interior. Os tubos apresentaram o menor deslocamento quando implantados posteriormente às patas dianteiras, aproximadamente 2 cm lateral da coluna vertebral. Na maioria dos casos, o deslocamento dos tubos ficou limitado à primeira semana de implantação.

Entretanto, mesmo sendo o tubo de polietileno o material de escolha para esta metodologia, Horsted, Fejerskov e Johannesen (1980) acreditam que este pode apresentar limitações ao simular a anatomia de raízes humanas, sendo as propriedades adesivas do material teste com as paredes do tubo de polietileno diferentes do que ocorre no canal radicular. Para buscar maior proximidade com a prática clínica, utilizaram raiz dental humana como condicionador para implantação de materiais em tecido subcutâneo de ratos e verificaram que raízes dentais humanas autoclavadas são aceitáveis pelo tecido subcutâneo dos ratos, fornecendo, desta maneira, outro modelo para testes de materiais endodônticos.

A proposta de se utilizar raiz dental como tubo para implantação subcutânea, levou Zanoni et al. (1988) a compará-la com tubo de polietileno. Os tubos de dentina e de polietileno foram obturados parcialmente com cones de gutapercha e cimento Endomethasone, deixando espaços vazios de extensões variados, em uma das extremidades. Comparativamente, os tubos de dentina com menor espaço vazio apresentaram melhor evolução por colagenização, enquanto que no grupo com os

maiores espaços, quer em tubos de dentina como nos de polietileno, houve persistência da reação inflamatória.

Há autores (HOLLAND, *et al.*, 1999; 2001; 2002a; 2002b; GOMES, *et al.*, 2008) que preferem os tubos de dentina preparados a partir de raízes de dentes humanos aos tubos de polietileno e de teflon, para testes de materiais em tecido subcutâneo de ratos. Justificam tal opção, fundamentada na possibilidade de observar a ação dos materiais testados nas paredes dentinárias.

Atualmente têm sido utilizado também como acondicionador de materiais a ser implantado em tecido subcutâneo de pequenos animais, as cápsulas de colágeno. Seu uso é restrito, pelo fato de serem rapidamente dissolvidas e reabsorvidas.

Oliveira *et al.* (1999), Sicca *et al.* (2000) e Zambuzzi *et al.* (2005; 2006) fizeram uso de cápsulas de colágeno como acondicionadores de partículas de osso bovino em tecido subcutâneo de ratos. Observaram, aos 30 dias, reabsorção da cápsula e discreto infiltrado inflamatório com alguns focos de macrófagos com vacúolos citoplasmáticos, contendo vestígios da referida cápsula implantada, e aos 60 dias notaram ainda, persistência de reação inflamatória crônica. Posteriormente, Garcia (2008) também fez uso de cápsulas de colágeno, em tecido subcutâneo de ratos, entretanto, aos 30 dias, a microscopia dos espécimes revelou reabsorção completa da cápsula implantada e tecido subcutâneo normal.

Diante do exposto e devido ao fato de ainda não haver na literatura trabalhos comparando esses acondicionadores, nos parece oportuno realizar um experimento para comparar as propriedades biológicas dos tubos de polietileno, da dentina bovina e das cápsulas de colágeno, propondo desta maneira uma melhor metodologia para ser utilizada em trabalhos futuros.

2 Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura é apresentada de forma cronológica, onde se procurou abordar os estudos mais relevantes para o desenvolvimento deste trabalho. Foram revisados os trabalhos pertinentes ao tubo de polietileno, tubo de dentina e cápsula de colágeno.

2.1-TUBO DE POLIETILENO

O tubo de polietileno tem sido o acondicionador mais utilizado para se testar materiais odontológicos em tecido subcutâneo de pequenos animais. É importante salientar que outros tipos de acondicionadores são utilizados para essa metodologia como, por exemplo, os tubos de dentina, as cápsulas de colágeno, os tubos de silicone rígidos (ZMENER; GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1990), e os tubos de teflon (OLSSON; SLIWKOWSKI; LANGELAND, 1981; ECONOMIDES, *et al.*, 1995; KOLOKOURIS, *et al.*, 1996; 1998), ressaltando que a resposta tecidual dos tubos de teflon é similar aos tubos de polietileno (LANGELAND; OLSSON; PASCON, 1981). Entretanto, como já citado, a opção mais usual é o tubo de polietileno, havendo muitos experimentos com essa metodologia.

O primeiro trabalho referente ao tubo de polietileno data de 1966, quando Torneck (1966) introduziu esses tubos em pesquisas de implantação subcutânea. Ele fez uso desses materiais para simular canais radiculares. Para isso, avaliou a reação do tecido subcutâneo de ratos ao final de 60 dias, frente à implantação de tubos de polietileno, relacionando a capacidade de invaginação do tecido neo-

formado com o diâmetro e o comprimento dos tubos, comparando assim, com os espaços não obturados em canais radiculares, que dependendo do diâmetro do forame apical e comprimento do canal, o tecido de granulação, oriundo do periodonto apical, preencheria aqueles espaços promovendo o reparo. Antes da implantação, os tubos foram desinfetados em solução de iodo, por 5 minutos, lavados em solução salina, secos com gaze esterilizadas e armazenados em tubos também esterilizados até seu uso. Metade dos tubos, implantados, foram mantidos com as duas extremidades abertas, e a outra metade com uma de suas extremidades selada termicamente, variando-se os comprimentos e diâmetros destes. Os comprimentos foram de 4, 6 e 10mm, e os diâmetros internos, para cada comprimento, foram de 0,58, 0,86, 1,14 e 1,40mm. Utilizaram-se ratos albinos, machos e fêmeas, pesando entre 140 a 240 g. Os resultados mostraram a formação de uma cápsula fibrosa que envolvia os implantes, rica em fibras colágenas, ausência de inflamação, indicando a aceitabilidade do material e observando que o diâmetro e o comprimento dos tubos exercem influência no processo reparo. No grupo com as 2 extremidades abertas, observou que quanto mais comprido e mais estreito for o tubo, mais dificilmente ocorre a invaginação do tecido conjuntivo neo-formado para o seu interior. Nos tubos em que uma das extremidades foi selada, a invaginação ocorreu principalmente nos de menores diâmetros, indicando que os fatores que influenciam o crescimento do tecido conjuntivo são diferentes em cada sistema. O autor concluiu que os resultados obtidos neste estudo indicam que os canais radiculares não obturados, porém completamente limpos e adequadamente desinfetados, propiciam provavelmente a cura dos tecidos periapicais, demonstrando que este tecido tem uma capacidade normal de reparo.

Um ano depois, Phillips (1967) avaliou a resposta tecidual a tubos de polietileno vazios implantados em subcutâneo de ratos. Os tubos tinham 6, 10 e 15mm de comprimento e seis diâmetros diferentes para cada comprimento (0,59; 0,77; 1,0; 1,2; 1,4 e 1,7mm). Alguns tubos foram selados em ambas as extremidades e serviram como controle. Antes da implantação os tubos foram desinfetados pela imersão em cloreto de benzalcônio 1:1000 por 24h. Ratos Wistar com peso de aproximadamente 160 a 200g foram utilizados neste estudo. Os resultados, depois de 60 dias, mostraram que ao redor dos tubos houve a formação de uma cápsula fibrosa, reação inflamatória discreta e nos tubos de menor comprimento e de maior diâmetro uma maior invaginação de tecido conjuntivo neo-formado foi observada.

No mesmo ano, Torneck (1967) investigou comparativamente a reação do tecido conjuntivo de ratos a tubos de polietileno vazios e esterilizados, preenchidos com fragmentos de tecido muscular autoclavados e tubos preenchidos com os fragmentos musculares que foram autoclavados, porém contaminados com cocos gram-negativos da cavidade bucal de um dos animais. O tecido muscular foi removido da pata traseira de um dos ratos. Foram utilizados 6 animais, machos e fêmeas, pesando entre 140 a 175 g. Tubos de polietileno de variados comprimentos e diâmetros foram implantados no tecido subcutâneo do dorso dos animais. Os comprimentos foram de 4, 6 e 10mm, e 4 diâmetros internos para cada comprimento foram utilizados: 0,58, 0,86, 1,14 e 1,40mm. Antes da implantação uma das extremidades dos tubos foi termicamente selada e estes foram desinfetados em solução de iodo por 5 minutos, depois lavados em solução salina, secos em gazes esterilizadas e armazenados em tubos também esterilizados até o uso. Após 60 dias os animais foram mortos e os implantes e os tecidos adjacentes foram removidos e preparados para análise microscópica. As colorações utilizadas foram

H.E., Giemsa e Gram. Os resultados indicaram que os grupos com fragmentos de músculo, o prognóstico de reparo não foi favorável e entre esses dois grupos o menos favorável foi o preenchido com os fragmentos musculares contaminados. Os tubos esterilizados e vazios ofereceram melhores condições para o processo de reparo.

Em 1969, Langeland et al. (1969), avaliou a reação tecidual da pasta N2 acondicionada em tubos de polietileno, implantando-os na região subcutânea, pélvica e abdominal de ratos. Após os períodos de 14 e 77 dias os animais foram mortos e os tecidos preparados para análise microscópica. Os resultados mostraram que no período de 14 dias o tecido conjuntivo em contato com a pasta apresentava inflamação aguda com intenso infiltrado neutrofílico, macrófagos e células gigantes, enquanto que o tecido conjuntivo em contato com o tubo de polietileno mostrou a presença de fibrócitos. Aos 77 dias os resultados mostraram inflamação crônica caracterizada pela presença de linfócitos e macrófagos em contato com a pasta. Na superfície do tubo de polietileno predominaram os fibrocitos. Os autores observaram que o teste de implantação em tecidos moles de animais tem um valor limitado devido à impossibilidade de avaliá-lo na dentina e no osso alveolar. Concluíram, ainda, que o teste de implantação deve ser apenas de caráter preliminar e de curta duração e que outros testes devem ser realizados para melhores avaliações.

Makkes et al. (1977) implantaram em tecido subcutâneo de ratos, tubos de polietileno com 15mm de comprimento, diâmetro interno de 3,6mm e externo de 4,6 mm estando fechado em ambos os lados com cera e recebendo 4 perfurações ao centro. Como controle, tubos não perfurados foram implantados. Antes da implantação os tubos foram desinfetados por imersão por 24 horas em 10% de formalina, lavados por 5 vezes em solução salina esterilizada e secos em roletes de

algodão também esterilizados. Foram utilizados 14 ratos, sendo 3 fêmeas com o peso de aproximadamente 160g e 11 machos pesando aproximadamente 270g. Os animais foram mortos após 2, 3 e 5 semanas e os tubos com o tecido adjacente foram removidos e submetidos ao processamento histológico. Foi avaliada a reação do tecido conjuntivo ao redor da perfuração dos tubos vazios, a reação do tecido ao redor do tubo de polietileno e o deslocamento dos mesmos. Os resultados não demonstraram sinal adicional de inflamação, concluindo que o tubo de polietileno é estável quimicamente no meio tecidual e não sofre influência de medicamentos ou outras substâncias que estiverem dentro dele. Foi observado, ainda, que o menor deslocamento dos tubos ocorreu quando se implantou os tubos posteriormente às patas dianteiras, aproximadamente 2 cm lateral a coluna vertebral. Na maioria dos casos, os tubos implantados foram subcutaneamente deslocados, sendo esse deslocamento quase totalmente limitado à primeira semana de implantação. Concluíram que o modelo experimental descrito é facilmente manejável e que o polietileno provocou mínima ou nenhuma reação tecidual. Não houve diferença reacional entre os tubos íntegros e os perfurados.

Magro et al. (1987) investigaram histologicamente a reação e o reparo do tecido conjuntivo subcutâneo de rato em contato com tubo de polietileno preenchido com uma pomada de confrei, própolis e mel. Foram utilizados 42 ratos machos, pesando entre 160 a 200g. Os tubos de polietileno apresentavam-se com diâmetro interno de 1,5mm, externo de 2,0mm e 10mm de comprimento, sendo estes previamente esterilizados. Formaram-se 2 grupos de 21 animais cada. O grupo controle estava representado pelo tubo de polietileno vazio e os períodos experimentais foram de 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 60 dias. Na microscopia, os eventos teciduais demonstraram que o medicamento apresentou biocompatibilidade, com

aceleração do processo de reparo até os 10 primeiros dias, decrescendo depois, provavelmente, em função da presença do veículo, 10% de vaselina e lanolina. No grupo controle, aos 2 dias há fibrina, alguns fibroblastos e fraca infiltração de neutrófilos polimorfonucleados, aos 5 dias são vistas fibras colágenas com fibroblastos nas extremidades da luz do tubo, com moderado infiltrado de neutrófilos e na área subjacente há tecido conjuntivo neo-formado. Nos períodos de 10, 20, 30, 40 e 60 dias ocorreu a diminuição da inflamação e aos 30, 40 e 60 dias, uma espessa faixa de fibras colágenas ocluía a luz do tubo.

Gorduysus, Etikan e Gokoz (1998), avaliaram a biocompatibilidade do Endo-Fill quando implantado no tecido subcutâneo de ratos. Utilizaram 15 animais, pesando entre 140 a 170g, machos e fêmeas e quarenta tubos de polietileno de 10mm de comprimento e 1,5mm de diâmetro interno. 4 tubos preenchidos com o material foram implantados na região dorsal de cada animal. O grupo controle estava representado por tubos de polietileno vazios. Passado os períodos de 2, 7, 14, 28 e 56 dias os animais foram mortos, e as peças preparadas para análise microscópica, realizando-se cortes seriados de 6µm de espessura e coloração por H.E.. A análise dos espécimes revelou que ao final do período de 56 dias, ao redor do material implantado, havia uma fina camada fibrosa, indicando completo processo de reparo, sem vestígios de reação inflamatória.

Yaltirik et al. (2004), compararam a biocompatibilidade do MTA e do amálgama, implantado no tecido subcutâneo dorsal de 30 ratos, com peso entre 240 e 300 gramas. Para acondicionar os materiais, tubos de polietileno esterilizados de 10mm de comprimento e 1,1mm de diâmetro interno foram utilizados. Para grupo controle, 30 tubos de polietileno vazios foram utilizados. Os períodos de avaliação foram de 7, 15, 30, 60 e 90 dias e as amostras foram coradas pelos métodos de H.E.

e Von Kossa. Os resultados indicaram que a resposta tecidual provocada pelo amálgama e pelo MTA foi favorável no período de 90 dias e que a calcificação distrófica no tecido conjuntivo adjacente ao MTA, é um achado notável. No grupo controle, aos 7 dias, foi observado tecido conjuntivo com vasos sanguíneos e presença de linfócitos e polimorfonucleados. Esse infiltrado inflamatório já estava diminuído aos 15 dias e uma fina cápsula fibrosa circundava o tubo. Células inflamatórias escassas estavam presentes no período de 30 dias e a atividade fibroblástica era dominante no período de 60 e 90 dias.

Em 2006, Cintra et al. (2006) avaliaram e compararam quantitativa e qualitativamente a resposta inflamatória e o potencial de formação óssea observada no alvéolo dentário de ratos frente a implantação de tubos de polietileno preenchidos com um novo hidróxido de cálcio contendo cimento (MBPc) e o agregado trióxido mineral ProRoot (MTA). Após a anestesia, foi realizada a extração do incisivo superior direito e os implantes eram inseridos no alvéolo e posteriormente suturados. Foram utilizados 48 ratos Wistar divididos em 3 grupos: Grupo I (grupo controle), tubos de polietileno vazios foram implantados no local da extração, grupo II e III, tubos de polietileno foram implantados preenchidos com MTA e MBPc, respectivamente. Aos 7, 15 e 30 dias após a implantação, os animais foram mortos, as hemimaxilas foram removidas e preparadas para análise em microscopia de luz. Os aspectos microscópicos demonstraram que ambos os materiais permitiram um processo de reparo alveolar semelhante. Os valores obtidos por meio da avaliação por escores, quando submetidos ao teste de Kruskal-Wallis não demonstraram diferença significativa entre os materiais. O grupo controle, aos 7 e 15 dias demonstrou uma área preenchida com tecido de granulação bem organizado com leve infiltrado inflamatório, fibroblastos jovens, poucos macrófagos e linfócitos. Aos

30 dias, o tecido conjuntivo apresentava-se mais organizado, entretanto, o osso não estava completamente curado. Os grupos experimentais demonstraram infiltrado inflamatório similar ao observado no grupo controle para todos os períodos.

No mesmo ano, Moraes et al. (2006) estudaram a biocompatibilidade do cimento Portland com a adição de iodofórmio, comparando-o com o MTA (ProRoot). Para isso empregaram tubos de polietileno preenchidos com os referidos cimentos e implantaram em tecido subcutâneo de 18 ratos, machos, pesando entre 200 a 250g. Os tubos de polietileno de 7 mm de comprimento e 1,3 mm de diâmetro interno, foram previamente autoclavados, e posteriormente preenchidos com os materiais a serem testados. Tubos vazios foram utilizados como controle. Após 7, 30 e 60 dias, os implantes juntamente com os tecidos adjacente foram removidos. Os cortes foram avaliados pela formação e espessura da cápsula fibrosa, presença de tecido de granulação e severidade da resposta inflamatória. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença significativa com relação a resposta inflamatória entre MTA e cimento Portland misturado ao iodofórmio após 7, 30 e 60 dias. Quanto a cápsula fibrosa, aos 60 dias, mostrou-se mais organizada no grupo do cimento Portland com iodofórmio quando comparada ao grupo do MTA. O grupo controle, aos 60 dias, apresentou um denso tecido conjuntivo fibroso rico em fibras colágenas e escassas células inflamatórias estavam presentes neste período.

Sumer et al. (2006), compararam a biocompatibilidade do amálgama, IRM, MTA e MTA com clorexidina no tecido subcutâneo de ratos. Foram utilizados 30 ratos Wistar com peso aproximado de 270 gramas. Os materiais foram colocados em tubos de polietileno esterilizados de 10mm de comprimento e 1,1mm de diâmetro interno e implantados na região dorsal dos animais. Cada animal recebeu cinco implantes, um com cada cimento e o quinto implante vazio que serviu como controle.

Após os períodos experimentais de 15, 30 e 60 dias, os animais foram mortos e as amostras foram coletadas e processadas histologicamente. Nos resultados, os autores observaram uma resposta inflamatória leve nas amostras com amálgama, IRM e MTA com clorexidina nos três períodos. A formação da cápsula fibrosa foi observada desde 15 dias em todos os grupos, o que indica que os materiais são bem tolerados pelos tecidos. Os resultados permitiram concluir que o MTA misturado com clorexidina demonstrou ser biocompatível, porém, novas pesquisas são necessárias antes de utilizá-lo em clínica. Os tubos de polietileno vazios causaram pouca ou nenhuma reação inflamatória no tecido conjuntivo subcutâneo e apresentaram menor espessura de cápsula fibrosa quando comparada aos materiais avaliados.

Os tubos de polietileno também foram utilizados no estudo de Mori et al. (2009), no qual foi avaliado a biocompatibilidade da pasta experimental de alendronato em tecido subcutâneo de ratos, para utilização em dentes susceptíveis à reabsorção radicular. Neste estudo, foram utilizados 15 ratos machos, pesando 180-200 gramas. Os tubos de polietileno com 1,3 mm de diâmetro interno e 10 mm de comprimento apresentavam-se esterilizados, e foram selados em uma de suas aberturas com guta-percha, sendo este lado, o controle. Os tubos foram preenchidos com a pasta experimental de alendronato. Após os períodos de 7, 15 e 45 dias os animais foram mortos e os tecidos preparados para análise microscópica. Os cortes histológicos foram corados com Hematoxilina-Eosina. A pasta de alendronato promoveu um processo inflamatório severo aos 7 dias, com diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo controle. Entretanto, aos 15 dias, houve uma diminuição da inflamação e a presença de tecido conjuntivo com fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos foi observada. Aos 45 dias,

observou-se a presença de um tecido conjuntivo bem organizado, com fibras colágenas, fibroblastos e poucas células inflamatórias. Não houve diferença estatística entre o grupo controle e a pasta experimental aos 15 e 45 dias. A análise microscópica dos cortes histológicos confirmou a biocompatibilidade da gutapercha com o tecido conjuntivo. Não houve sinais de inflamação detectáveis em todos os períodos experimentais. Aos 15 e 45 dias, o tecido conjuntivo apresentava bem organizado, com fibras colágenas, fibroblastos e vasos sanguíneos. Não houve diferença estatisticamente significativa para nenhum dos períodos deste grupo. A pasta experimental de alendronato foi considerada biocompatível com o tecido subcutâneo de ratos, demonstrando resultados similares ao grupo controle, podendo ser considerada satisfatória para utilização como medicação intracanal, porém, estudos adicionais devem ser realizados.

2.2-TUBO DE DENTINA

Pesquisas que avaliam a reação do tecido de pequenos animais frente à implantação de dentina são realizadas desde 1928. Boulger (1931) utilizou porções finais de raízes de dentes humanos, sendo algumas saudáveis com tecido pulpar normal, outras infectadas e outras despulpadas. Esses segmentos de raízes foram implantados em tecido muscular de ratos brancos. A reação deste tecido foi analisada microscopicamente e observou-se que as raízes saudáveis foram bem toleradas pelo tecido, que apresentou processo de reparo, com a presença de fibras colágenas e fibroblastos. Já as raízes infectadas revelaram uma reação inflamatória no tecido que as circundava. Estas porções finais de raízes estavam implantadas

próximas ao fêmur dos ratos e nos casos de raízes infectadas, a inflamação causou reabsorção desse osso.

Souza et al. (1977) estudaram se a adição de diferentes substâncias ao hidróxido de cálcio interferiria na habilidade deste, em estimular a deposição de sais de cálcio. Para tal estudo, foram utilizados tubos de dentina, que foram preparados a partir do terço apical de raízes de dentes humanos. Os canais foram alargados até a lima 35 e a sobreinstrumentação feita 2mm além do forame. O comprimento dos tubos variou entre 5 e 7 mm, e no seu extremo coronário, a abertura do tubo foi ampliada com uma broca 702. Os tubos de dentina foram lavados e autoclavados. Os materiais testados foram os seguintes: hidróxido de cálcio misturado com água destilada, calxyl, pulpdent, hidróxido de cálcio da DFL, dycal, MPC, formagen, pasta de hidróxido de cálcio com iodofórmio, pasta de hidróxido de cálcio com paramonoclorofenolcanforado, pasta A (composta de 4g de hidróxido de cálcio, 2g de óxido de zinco e 5ml de propilenoglicol), pasta B (composta de 5 g de hidróxido de cálcio, 2,5 g de subnitrato de bismuto, 2,5g de óxido de zinco, 3,5 ml de óleo de cravo, 4 ml de balsamo do Canadá e 2,5 ml de propilenoglicol) e por fim o calvital. Foram utilizados 432 ratos. Como grupo controle foram utilizados tubos de dentina vazios implantados em 36 animais adicionais. Os animais foram mortos aos 2, 7, 15, 30, 60 e 180 dias. Algumas peças não descalcificadas foram coradas pela técnica de Von Kossa para avaliar deposição de sais de cálcio, as peças restantes foram descalcificadas e coradas pela técnica da hematoxilina-eosina. Os resultados obtidos demonstraram que a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo do rato foi semelhante nas duas aberturas dos tubos de dentina; o hidróxido de cálcio, calxyl, pulpdent, hidróxido de cálcio da DFL, pasta de hidróxido de cálcio com iodofórmio, pasta de hidróxido de cálcio com paramonoclorofenolcanforado, pasta A e o calvital

estimularam a deposição de uma barreira de tecido calcificado nas extremidades dos tubos de dentina, isolando o material do tecido conjuntivo adjacente. O formagen produziu somente a deposição de barreiras parciais de tecido duro em alguns espécimes; o dycal, MPC e pasta B não produziram a deposição de barreira de tecido duro. Observaram enfim, que o acréscimo de aditivos ao hidróxido de cálcio pode reduzir sua capacidade de estimular a deposição de tecido calcificado. Quanto a avaliação dos tubos de dentina vazios, a reação do tecido conjuntivo subcutâneo às paredes dos tubos de dentina foi favorável já aos 15 dias, quando a reação inflamatória aguda inicial, representada por um infiltrado inflamatório rico em neutrófilos provocada pelo ato cirúrgico, foi substituída pela cápsula de tecido conjuntivo fibroso sem presença de células inflamatórias. Aos 30 e 60 dias, a maioria das amostras apresentou invaginação de tecido conjuntivo, contendo algumas células inflamatórias, preenchendo todo o espaço do tubo em alguns casos. Aos 180 dias, havia uma fina cápsula fibrosa envolvendo o tubo de dentina vazio.

Horsted, Fejerskov e Johannesen (1980), também avaliaram o tubo de dentina como condicionador para implantar materiais endodônticos em tecido subcutâneo de pequenos animais. Segundo os autores, o tubo de polietileno, apresenta limitações ao simular a anatomia de raízes humanas, e as propriedades adesivas do material teste com as paredes do tubo de polietileno são diferentes do que ocorre no canal radicular. Para buscar maior proximidade com a prática clínica, utilizaram raiz humana como material de implantação em subcutâneo de ratos e avaliaram a reação histológica no tecido. As superfícies radiculares de 35 dentes anteriores humanos extraídos foram limpas, o tecido pulpar foi removido e os canais radiculares alargados até a lima Hedstroen de número 50 e as raízes autoclavadas antes de serem implantadas no tecido subcutâneo dos ratos. Foram utilizados 35

ratos, divididos em 5 grupos. As raízes foram implantadas vazias. Os animais foram mortos aos 7, 14, 21, 90 e 140 dias. Os resultados demonstraram a formação de uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso circundando os espécimes. Os canais radiculares vazios tornaram-se ocupados gradativamente por um tecido de granulação maduro, contendo, ocasionalmente linfócitos. Após 140 dias o tecido do canal, ainda, encontrava-se altamente vascularizado com células gigantes multinucleadas esparsas ao longo das paredes dentinárias, porém reabsorção interna não foi observada. Concluíram, portanto, que raízes humanas autoclavadas são aceitáveis pelo tecido subcutâneo dos ratos, fornecendo desta maneira o melhor modelo para experimentos endodônticos, pois a adaptação dos materiais às paredes dentinárias dos canais radiculares é similar ao que realmente ocorre.

Zanoni et al. (1988) compararam a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos frente ao implante de tubos de polietileno e de dentina, obturados parcialmente com cones de gutapercha e Endomethasone, de tal forma a deixar espaços vazios em uma de suas extremidades, com distâncias variadas. Foram utilizados 54 ratos, divididos em dois grupos, sendo que o grupo A recebeu implantes de tubos de polietileno com 10mm de comprimento e 0,5mm de diâmetro interno e o grupo B recebeu tubos de dentina, preparados a partir da raiz palatina de primeiro molares superiores, preparados com as mesmas medidas, ou seja, 10mm de comprimento e 0,5mm de diâmetro interno. Cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos (A1, A2, A3, B1, B2 e B3). Os tubos foram autoclavados a 120°C, por 20 minutos e obturados com cones de gutapercha e o referido cimento. No subgrupo 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 2mm e nos subgrupos A3 e B3 4mm. Decorridos os períodos de 7, 21 e 60 dias, os animais foram mortos, e as peças removidas foram

preparadas para análise microscópica. Os espécimes contendo os tubos de dentina foram desmineralizados. Os cortes semi-seriados com 6µm de espessura foram corados com H.E.. Todos os subgrupos, os quais receberam tubos de polietileno, apresentaram invaginação de tecido de granulação, com grau mais acentuado de infiltrado inflamatório nos períodos de 7 e 21 dias nos subgrupos A2 e A3 e de grau mais moderado no A1. No período de 7 dias, quando utilizaram tubos de dentina, este tecido foi observado nos subgrupos B1 e B2 com infiltrado inflamatório de grau discreto a moderado. Contudo, o subgrupo B3 apresentou inflamação de grau moderado a intenso. Os subgrupos A3 e B3, em todos os períodos, apresentaram uma concentração de exsudato nos espaços vazios em contato com o material obturador, e persistente reação inflamatória. No período de 60 dias, os subgrupos A1, A2, B1 e B2 apresentaram discreto infiltrado inflamatório. Comparativamente, os tubos de dentina com menor espaço vazio apresentaram melhor evolução por colagenização. Já no grupo com os maiores espaços, quer em tubos de dentina como nos de polietileno, houve persistência da reação inflamatória.

Holland et al. (1999) fizeram uso de tubos de dentina para implantar hidróxido de cálcio e MTA, e comparar a resposta do tecido subcutâneo de ratos frente a estes materiais. Os tubos de dentina foram preparados a partir de raízes de dentes humanos. Os canais foram alargados até a lima 35 e a sobreinstrumentação feita 2mm além do forame. O comprimento dos tubos foi de 7 mm, estes foram irrigados com hipoclorito de sódio e EDTA, lavados em água destilada para posteriormente serem autoclavados. Foram então preenchidos com os materiais a serem testados e imediatamente implantados no dorso de 40 ratos. Para o grupo controle, tubos de dentina vazios foram implantados em 12 animais adicionais. Os animais foram mortos após 7 e 30 dias, as peças foram removidas e preparadas para análise

microscópica. As peças foram coradas com H.E. e Von Kossa. Aos 7 dias, o grupo controle demonstrou um infiltrado inflamatório com neutrófilos ao redor dos tubos implantados. Próximo a esta área, a população celular estava representada por fibroblastos jovens e células inflamatórias crônicas. Os tubos de dentina foram preenchidos com uma massa eosinofílica contendo raros neutrófilos. Aos 30 dias, as amostras do grupo controle apresentaram crescimento de tecido conjuntivo, contendo algumas células inflamatórias, preenchendo, em alguns casos, todo o espaço do tubo. Além disso, os tubos foram circundados por uma fina cápsula fibrosa demonstrando uma reação inflamatória crônica suave, em alguns casos. No grupo do hidróxido de cálcio, aos sete dias, observaram numerosas granulações birrefringentes à luz polarizada. Essas granulações foram positivas para a técnica de Von Kossa, localizadas próximas a embocadura do tubo, rodeados por tecido conjuntivo com reação inflamatória leve a moderada. Aos 30 dias, os resultados foram semelhantes. No grupo do MTA, aos sete dias, os resultados foram quase os mesmos que no grupo anterior, as granulações birrefringentes encontravam-se em contato com os materiais, porém em menor número. O tecido conjuntivo ao redor dos tubos mostrava proliferação de fibroblastos e reação inflamatória crônica leve a moderada. Já aos 30 dias, os resultados foram semelhantes aos do primeiro período, apresentando uma reação inflamatória leve. Os resultados levaram a concluir que os dois cimentos apresentaram formação de tecido mineralizado, e que o mecanismo de ação de ambos os materiais são similares.

Holland et al. (2001) compararam a reação do tecido subcutâneo de ratos à implantação de tubos de dentina preenchidos com MTA, cimento Portland e hidróxido de cálcio. Os tubos de dentina foram preparados a partir de raízes de dentes humanos. Os canais foram alargados até a lima 35 e a sobreinstrumentação

feita 2mm além do forame. O comprimento dos tubos foi de 7 mm, estes foram irrigados com hipoclorito de sódio e EDTA, lavados em água destilada para posteriormente serem autoclavados. Foram então preenchidos com os materiais a serem testados e imediatamente implantados no tecido subcutâneo de 30 ratos. Para grupo controle, tubos de dentina vazios foram implantados em 10 animais adicionais. Os animais foram mortos após 7 e 30 dias, as peças foram removidas e preparadas para análise microscópica. Aos 7 dias, o grupo controle demonstrou uma camada de exsudato inflamatório com neutrófilos ao redor dos tubos implantados. Próximo a esta área, a população celular foi representada por fibroblastos jovens e células inflamatórias crônicas. Havia uma estrutura eosinofílica com um suave infiltrado neutrofílico nos tubos. No período de 30 dias, as amostras do grupo controle apresentaram aumento de tecido conjuntivo com poucas células inflamatórias crônicas no espaço do tubo. Além disso, os tubos foram circundados por uma fina cápsula fibrosa demonstrando uma reação inflamatória crônica suave, em 5 casos. Para os 3 cimentos avaliados os resultados foram semelhantes. Próximo às aberturas dos tubos foram observadas granulações Von Kossa positivas, birrefringentes à luz polarizada. Junto dessas granulações foi observado um tecido irregular na forma de ponte, também Von Kossa positivo. As paredes de dentina dos tubos exibiram uma estrutura altamente birrefringente à luz polarizada, no interior dos túbulos, formando uma camada em diferentes profundidades. É possível que os mecanismos de ação dos materiais estudados sejam similares entre si.

Holland et al. (2002a) estudaram a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de 60 ratos após implantação de tubos de dentina contendo os seguintes cimentos endodônticos: MTA, Sealapex, CRCS, Sealer 26 e Sealer Plus. Tubos de dentina foram preparados a partir de raízes de dentes humanos, irrigados com EDTA e

hipoclorito de sódio, lavados em água destilada e autoclavados. 10 animais receberam tubos de dentina vazios, que serviram como controle. Os tubos preenchidos com os cimentos foram implantados na região dorsal dos animais, os quais foram mortos após 7 e 30 dias. Os tubos juntamente com os tecidos adjacentes foram removidos e fixados em solução de formalina a 10% e pH 7,0. Os cortes não descalcificados foram examinados com luz polarizada e técnica de Von Kossa. Alguns cortes foram descalcificados com EDTA, antes de serem corados em H.E.. Aos 7 dias, o grupo controle demonstrou uma camada de exsudato inflamatório com neutrófilos ao redor dos tubos implantados. Próximo a esta área, a população celular foi representada por fibroblastos jovens e células inflamatórias crônicas. Os tubos de dentina foram preenchidos com uma massa eosinofílica contendo raros neutrófilos. Aos 30 dias após a implantação, as amostras do grupo controle apresentaram crescimento de tecido conjuntivo, contendo algumas células inflamatórias, preenchendo, em alguns casos, todo o espaço do tubo. Além disso, os tubos foram circundados por uma fina cápsula fibrosa demonstrando uma reação inflamatória crônica suave, em alguns casos. Para o MTA, o Sealapex, o Sealer 26 e o Sealer Plus os resultados foram semelhantes. Próximo às aberturas dos tubos foram observadas granulações Von Kossa positivas, birrefringentes à luz polarizada. Junto dessas granulações foi observado um tecido irregular na forma de ponte, também Von Kossa positivo. As paredes de dentina dos tubos exibiram uma estrutura altamente birrefringente à luz polarizada, no interior dos túbulos, formando uma camada em diferentes profundidades. Os resultados sugerem que entre os materiais testados, o CRCS é o que tem menor possibilidade de estimular deposição de tecido duro.

Holland et al. (2002b) investigaram a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos frente à implantação de tubos de dentina preenchidos com MTA branco (ProRoot). Os animais foram sacrificados após 7 e 30 dias. As peças não descalcificadas foram preparadas para análise histológica. Cortes teciduais de 10µm foram realizados empregando-se um micrótomo de tecido duro, que depois foram analisados com luz polarizada e técnica de Von Kossa para tecidos mineralizados. Os resultados observados foram os mesmos nos dois períodos experimentais, apresentando numerosas granulações birrefringentes à luz polarizada e uma estrutura irregular semelhante a uma ponte foi observada próximo ao material, ambos Von Kossa positivo. Foi observado também no interior dos túbulos dentinários uma camada de granulações birrefringentes a luz polarizada. Os resultados foram similares aos reportados para o MTA cinza, indicando que o mecanismo de ação do MTA branco e cinza são similares.

Gomes et al. (2008) examinaram histopatologicamente a reação do tecido conjuntivo de ratos à 2 cimentos à base de hidróxido de cálcio, Acroseal e Sealapex. Neste estudo foram utilizados 36 ratos machos albinos da linhagem Wistar pesando entre 250 a 280 gramas. Para a implantação dos cimentos no tecido subcutâneo dos ratos foram utilizados tubos de dentina. 24 tubos de dentina vazios serviram como controle, sendo estes implantados em 12 animais adicionais. Esses tubos foram preparados a partir de raízes de dentes humanos. Os canais radiculares foram alargados até a lima 35 e a sobreinstrumentação 2mm além do forame. Durante a ampliação, os canais foram irrigados com hipoclorito de sódio a 2,5% e seu comprimento foi padronizado em 7 mm, estes foram imersos em EDTA 17% por 3 minutos, lavados em água destilada e posteriormente autoclavados por 30 minutos a 134°. Os tubos esterilizados foram preenchidos com os cimentos, os quais foram

preparados de acordo com as orientações do fabricante. Os animais foram mortos após 7 e 30 dias e os espécimes preparados para análise histológica com hematoxilina-eosina , técnica de Von Kossa e luz polarizada. Os resultados foram analisados estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis. Ambos os materiais causaram reação inflamatória suave ou moderada aos 7 dias, porém essas reações diminuíram aos 30 dias com nenhuma diferença significativa em nenhum período. Mineralização do tecido subcutâneo dos ratos foi observada apenas com o Sealapex. Quanto ao grupo controle, aos 7 dias, o tecido conjuntivo estava infiltrado principalmente com linfócitos e macrófagos, porém no período de 30 dias, escassas células inflamatórias estavam presentes com a predominância de fibroblastos e fibras colágenas.

2.3-CÁPSULA DE COLÁGENO

Oliveira et al. (1999) avaliaram a biocompatibilidade de dois biomateriais preparados com osso cortical bovino, um desproteínizado a 100°C e outro a 1000°C, na forma de partículas. Essas partículas foram acondicionadas em cápsulas de colágeno e implantadas em subcutâneo de ratos. Cápsulas de colágeno vazias serviram como controle. O experimento utilizou 60 ratos albinos da linhagem wistar, machos adultos com 160 g. Os animais foram mortos ao final de 10, 20, 30 e 60 dias, os espécimes removidos e submetidos ao preparo histotécnico. As análises microscópicas mostraram uma reação granulomatosa tipo corpo estranho de baixa renovação celular, contendo macrófagos e células gigantes multinucleadas em contato com o material, semelhante à implantação subcutânea de osso autógeno ou

alógeno mineralizado. Ao final do período experimental não houve diferença significativa entre os materiais testados. No grupo controle, no período de 10 dias, foi observado áreas focais com grande celularidade, caracterizada por células volumosas contendo material no citoplasma, sugestivas de macrófagos contendo parte da cápsula de colágeno implantada. Aos 20 dias, este grupo controle já apresentava um infiltrado inflamatório menos intenso que no período anterior, com uma moderada proliferação de vasos sanguíneos e fibroblastos. Em algumas regiões notavam-se pequenos focos de macrófagos contendo material fagocitado sugestivo de cápsula de colágeno. No período de 30 dias, notou-se um maior fibrosamento além da presença de inúmeros capilares sanguíneos. O infiltrado inflamatório crônico era discreto, porém ainda existiam alguns focos contendo macrófagos. Aos 60 dias, havia focos de células inflamatórias crônicas na região subcutânea dos animais, o tecido de granulação era discreto, mas rico em vasos sanguíneos e fibroblastos e nos grupos experimentais havia ainda, vestígios de partículas da cápsula de colágeno.

Sicca et al. (2000) compararam a resposta celular em subcutâneo de ratos ao enxerto de osso cortical bovino desproteínizado a 100°C na forma microgranular (250-1000mm) e macrogranular (1000-2000). Esses grânulos foram acondicionados em cápsulas de colágeno. O grupo controle estava representado por cápsulas de colágeno vazias. Foram utilizados 60 ratos albinos da linhagem wistar, machos adultos com 160 g. Os animais foram mortos após 10, 20, 30 e 60 dias. As peças foram removidas e submetidas ao preparo histotécnico. A análise microscópica mostrou para ambos os materiais uma reação granulomatosa tipo corpo estranho de baixa renovação, contendo macrófagos e células gigantes multinucleadas em contato com o material. O osso cortical bovino desproteínizado a 100°C, quer macro

ou microgranular, promoveu resposta tecidual semelhante à descrita para implantação subcutânea de osso autógeno ou alógeno mineralizado. No grupo controle, no período de 10 dias, foi observado áreas focais com grande celularidade, caracterizada por células volumosas com material no citoplasma, sugestivas de macrófagos contendo fragmento da cápsula de colágeno implantada. Aos 20 dias, este grupo controle já apresentava um infiltrado inflamatório menos intenso que no período anterior, com uma moderada proliferação de vasos sanguíneos e fibroblastos. Em algumas regiões notavam-se pequenos focos com macrófagos contendo material fagocitado sugestivo de cápsula de colágeno. No período de 30 dias, notou-se um maior fibrosamento além da presença de inúmeros capilares sanguíneos. O infiltrado inflamatório crônico era discreto, porém existiam alguns focos contendo macrófagos como visto nos períodos anteriores. Aos 60 dias, havia focos de células inflamatórias crônicas na região subcutânea dos animais, porém o tecido de granulação era discreto e nos grupos experimentais, observou-se, ainda, pequenas partículas da cápsula de colágeno.

A resposta tecidual ao osso inorgânico bovino medular, implantado em subcutâneo de ratos, foi avaliada por análise subjetiva através de microscopia de luz por Zambuzzi et al. (2005). Quarenta ratos foram divididos em 2 grupos: controle (cápsulas vazias de colágeno) e teste (cápsulas de colágeno contendo 0,1g do biomaterial) e mortos 10, 20, 30 e 60 dias após a implantação. Histologicamente, aos 10 dias, observou-se infiltrado inflamatório crônico composto por macrófagos e células gigantes multinucleadas inflamatórias (CGMI). Neutrófilos, plasmócitos e linfócitos estavam presentes de maneira discreta, desaparecendo durante o processo de reparo tecidual. A porosidade do material foi preenchida pelo tecido conjuntivo reacional mostrando as CGMI. A fibrose foi mais intensa aos 60 dias e

evidentemente superior ao grupo controle. Entretanto, o material não causou reações adversas severas, não estimulando a resposta imunológica. Baseado nos resultados encontrados, o osso inorgânico bovino medular foi bem tolerado pelo tecido conjuntivo de rato. No grupo controle, no período de 10 dias, foi observado áreas focais com grande celularidade, caracterizada por células volumosas contendo material no citoplasma, sugestivas de macrófagos contendo partículas da cápsula de colágeno implantada. Aos 20 dias, este grupo controle já apresentava um infiltrado inflamatório menos intenso que no período anterior, com uma moderada proliferação de vasos sanguíneos e fibroblastos. Em algumas regiões notavam-se pequenos focos com macrófagos, contendo material fagocitado sugestivo de partículas de colágeno. No período de 30 dias, notou-se um maior fibrosamento, além da presença de inúmeros capilares sanguíneos. O infiltrado inflamatório crônico era discreto, porém existiam alguns focos contendo macrófagos como visto nos períodos anteriores. Aos 60 dias, havia focos de células inflamatórias crônicas na região subcutânea dos animais.

Zambuzzi et al. (2006) avaliaram a resposta tecidual induzida pelo osso inorgânico bovino medular macrogranular implantado em tecido subcutâneo de rato. Quarenta ratos foram divididos em 2 grupos: controle (cápsulas vazias de colágeno) e teste (cápsulas de colágeno contendo o material a ser testado) e mortos aos 10, 20, 30 e 60 dias após a implantação. Histologicamente, aos 10 dias, observou-se infiltrado inflamatório crônico rico em células gigantes multinucleadas e livre de linfócitos, similar ao enxerto mineralizado implantado em subcutâneo de ratos. Nos períodos posteriores, houve uma diminuição significativa de infiltrado inflamatório e um aumento de fibrose ao redor das partículas do enxerto. Concluíram que o material testado induziu um granuloma tipo corpo estranho com conseqüente fibrose

ao redor das partículas do enxerto, e ausência de resposta imune, sendo assim considerado biocompatível. No grupo controle, no período de 10 dias, foi observado áreas focais com grande celularidade, caracterizada por células volumosas contendo material no citoplasma, sugestivas de macrófagos contendo parte da cápsula de colágeno implantada. Aos 20 dias, este grupo controle já apresentava um infiltrado inflamatório menos intenso que no período anterior, com uma moderada proliferação de vasos sanguíneos e fibroblastos. Em algumas regiões notavam-se pequenos focos com macrófagos, contendo material fagocitado sugestivo de partículas de colágeno. No período de 30 dias, notou-se um maior fibrosamento além da presença de inúmeros capilares sanguíneos. O infiltrado inflamatório crônico era discreto, porém existiam alguns focos contendo macrófagos como visto nos períodos anteriores. Aos 60 dias, havia focos de células inflamatórias crônicas na região subcutânea dos animais, tecido de granulação discreto e feixes de fibras colágenas densos quanto no tecido original.

Garcia (2008) avaliou a resposta tecidual do tecido subcutâneo de ratos frente ao osso bovino medular desproteinizado ou inorgânico, cerâmica de hidroxiapatita associada ao fosfato beta tricálcico e o calcário dolomítico ou dolomita. Esses materiais foram acondicionados em cápsulas de colágeno. As cápsulas vazias serviram como controle. Foram utilizados 54 ratos albinos da linhagem Wistar machos, com peso corporal de 200 gramas, e 12 ratos a mais, para o grupo controle, 4 animais para cada período. Os animais foram mortos após os períodos de 30, 60 e 90 dias. Os resultados demonstraram que a hidroxiapatita cerâmica bifásica densa demonstrou biocompatibilidade, semelhante ao osso bovino medular desproteinizado. O calcário dolomítico ou dolomita provocou reação tecidual compatível com material tóxico. No grupo controle, aos 30 dias o exame

microscópico dos espécimes revelou reabsorção completa da cápsula implantada e tecido subcutâneo normal, não havendo vestígios da mesma e nem qualquer reação tecidual, sugestiva da presença de partículas de colágeno.

3 PROPOSIÇÃO

Comparar a reação do tecido subcutâneo de ratos frente à implantação de tubos de polietileno, bastões de dentina e cápsulas de colágeno.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1-ANIMAIS

Foram utilizados 54 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos jovens, com peso entre 200 e 300 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, mantidos em gaiolas plásticas coletivas, abrigando no máximo 4 animais por gaiola, identificadas conforme os grupos e os períodos experimentais, higienizadas, colocadas em ambiente arejado e iluminado naturalmente. Os animais receberam água *ad libitum* e alimentação constituída de ração comercial balanceada. Previamente ao início do experimento, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA – Protocolo nº 028/2007) e aprovado em 29/01/2008 (Anexo A).

4.2-ACONDICIONADORES AVALIADOS

Neste experimento utilizamos os seguintes condicionadores de materiais experimentais: tubos de polietileno, bastões de dentina e cápsulas de colágeno.

A) Tubos de polietileno

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

comprimento de 10,0mm (Figura 1), autoclavados por 30 minutos a 134°C. As extremidades foram vedadas com cones de guta-percha (Tanari – Tanariman Industrial Ltda. – Manacapuru-Amazonas-Brasil), no momento da implantação, para bloquear a invaginação de tecido neo-formado para o interior dos tubos de polietileno. Os cones de guta-percha utilizados foram os de nº 80, sendo sua ponta padronizada e a parte colorida removidas com uma tesoura, obtendo-se 10,0mm da parte mais calibrosa. Esses bastões de guta-percha foram desinfetados em hipoclorito de sódio a 1,0% (Farmácia Específica-Manupalação de Fórmulas, Bauru-SP-Brasil) por 1 minuto, neutralizados em soro fisiológico (soro fisiológico 0,9%) e secos em gaze esterilizada. No momento do experimento, esses cones foram facilmente inseridos no interior de cada um dos tubos de polietileno.

B) Bastões de dentina

Esses bastões foram preparados a partir de raízes de dentes bovinos. Esses dentes foram lavados em água corrente por 24 horas, para a remoção da solução de formalina a 10% (Merck KgaA – Germany), solução em que estavam imersos. Posteriormente, com um disco diamantado dupla face (KG Sorensen, São Paulo-SP-Brasil) a coroa foi removida e as raízes cortadas, deixando-as com um comprimento de 10mm, e com uma broca Endo-Z (Dentsply, Petrópolis-RJ-Brasil) foram moldadas até obter-se a forma de um bastão de 2,0mm de diâmetro (Figura 1). Esses bastões foram imersos em EDTA 17% (Biodinâmica, Ibiporã-PR-Brasil) por 3 minutos para a remoção de detritos, lavados em soro fisiológico, secos em gaze esterilizada e então autoclavados por 30 minutos a 134°C.

C) Cápsulas de colágeno

As cápsulas de colágeno foram cedidas pela farmácia *Específica-Manupalação de Fórmulas*, Bauru-SP-Brasil, já esterilizadas. Foram utilizadas as cápsulas de nº 3 incolor (Figura 1).

4.3-ANESTÉSICO

Foi usada uma associação de cloridrato de ketamina, solução anestésica, *Dopalen®* (Sespo Ind. e Comércio Ltda. Div. Vetbrands Saúde Animal, Jacareí-SP-Brasil) e cloridrato de xilazina, solução sedativa, analgésica e relaxante muscular, *Anasedan®* (Sespo Ind. e Comércio Ltda. Div. Vetbrands Saúde Animal, Jacareí-SP-Brasil), na dosagem de 0,05ml/100g de peso animal para a associação citada.

4.4-GRUPOS EXPERIMENTAIS

Tabela 1: Grupos, acondicionadores, períodos pós-operatórios e número de animais

GRUPOS	ACONDICIONADORES TESTADOS	PERÍODOS/número de animais		
		15 DIAS	30 DIAS	60 DIAS
I	Tubos de polietileno	6	6	6
II	Bastões de dentina	6	6	6
III	Cápsulas de colágeno	6	6	6

4.5-PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais foram anestesiados por via intramuscular na face posterior da pata traseira, com seringa descartável para insulina, inoculando as soluções de Dopalen® e Anasedan® associadas. Em seguida foram submetidos à tricotomia da região dorsal e enxaguada com gaze embebida em água para eliminar os resíduos dos pêlos. A anti-sepsia da região tricotomizada foi feita com gaze embebida em solução de iodopovidona (Rioquímica Indústria Farmacêutica Ltda., São José do Rio Preto-SP-Brasil) e a incisão foi executada no sentido longitudinal com uma lâmina de bisturi nº 15 (Eletromed - Comércio de Materiais Médicos Cirúrgicos, Manaus-Amazônia-Brasil) na região central do dorso de cada animal, numa extensão aproximadamente de 20,0mm (Figura 2). O tecido subcutâneo foi divulsionado com uma tesoura de ponta romba (Figura 3) e os acondicionadores foram implantados com uma pinça clínica. Cada animal recebeu 2 corpos de prova, do mesmo material, um do lado direito e o outro do lado esquerdo da incisão. As bordas da incisão foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon - Johnson&Johnson, Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos-SP-Brasil), montados em agulhas atraumáticas (Figura 4). Depois da implantação, os animais foram acompanhados até que se recuperassem da anestesia, sendo observados diariamente para verificação do comportamento, com a finalidade de evitar ocorrências que pudessem comprometer o experimento. Foram mantidos em gaiolas coletivas, identificadas de acordo com os materiais implantados naqueles animais até completarem os períodos experimentais.

4.6-OBTENÇÃO DAS PEÇAS

Decorridos os períodos experimentais os animais foram previamente anestesiados, tricotomizados na região dorsal, sendo essa região limpa com compressas de gaze umedecidas em soro fisiológico a 0,9% e mortos com uma dose da associação das soluções anestésica e sedativa, injetada no coração. Confirmada a morte do animal, a área do implante do tubo ou bastão foi localizada por palpação, e o tecido cutâneo e subcutâneo removidos em bloco com margem de segurança (Figura 5). No caso das cápsulas de colágeno, que não foi possível detectá-las por palpação e nem mesmo vê-las após rebatimento do tecido, devido ao fato de serem reabsorvíveis, tínhamos por parâmetro a incisão, pois havíamos posicionado as cápsulas de colágeno próximas à esta, numa distância aproximada de 20,0mm para cada lado. Os fragmentos teciduais ou peças dos 3 grupos experimentais foram removidos e estendidos sobre papel cartão e em seguida imersos em solução de formalina a 10%, tamponada (Merck KgaA – Germany), em recipientes unitários com identificação do animal, grupo e período e fixadas durante 7 dias.

Figura 1 – Tubos de polietileno (T), Bastões de dentina (B) e Cápsulas de colágeno (C)

Figura 2 – Incisão no dorso do animal

Figura 3 – Divulsão do tecido subcutâneo com tesoura ponta romba

Figura 4 – Sutura com fio de seda 4.0

Figura 5 - Tecidos subcutâneo e cutâneo removidos em bloco com o material implantado

4.7-PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO

Os tecidos, depois de fixados, foram lavados em água corrente durante 24 horas. Em seguida, eliminou-se o tecido adjacente em excesso, deixando a amostra com um formato retangular e tecido suficiente para a realização da avaliação microscópica. Foi feita a incisão longitudinalmente num dos lados do tubo com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 11, criando um espaço por onde se introduziu cuidadosamente uma sonda interproximal nº1 para remover os condicionadores sem dilacerar o tecido neo-formado, que os envolvia. Em seguida as peças foram imersas em álcool 70% durante um período de 24 horas. Decorrido este período foi realizada a desidratação das amostras e, posteriormente, a diafanização. Em seguida as peças foram incluídas em parafina, tomando cuidado de eliminar as bolhas de ar que poderiam se formar no interior do espaço que era ocupado pelo condicionador. Após a obtenção dos blocos de parafina, as peças foram cortadas em micrótomo (Leica – Jung RM2045 – Leica Instruments GmbH D-6907 – Alemanha) de modo semi-seriado com 5µm de espessura. Para cada espécime foram preparadas 3 lâminas, com 3 cortes longitudinais em cada lâmina, havendo intervalos de 50µm entre cada uma. Cada peça foi cortada até que se chegasse próximo da metade do espaço deixado pelo tubo, e então foram escolhidos os cortes mais representativos, observados em um microscópio óptico. Os cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H.E.).

4.8-FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.8.1-Análise descritiva

Descrição corrente das reações teciduais adjacentes à superfície lateral dos tubos de polietileno e dos bastões de dentina implantados. Entretanto, para a cápsula de colágeno, não houve formação de um tecido ao redor do material implantado por ser reabsorvível, desse modo a descrição foi efetuada em todo o tecido subcutâneo removido. A análise descritiva e as fotomicrografias foram realizadas no microscópio óptico (Leitz Aristoplan – Germany).

As fotomicrografias das reações teciduais estão dispostas de modo que a porção superior corresponde à superfície em contato com os bastões de dentina e tubos de polietileno.

4.8.2-Avaliação morfométrica

A avaliação morfométrica foi desenvolvida tomando por base alguns critérios morfológicos, como: fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e outros componentes como substância fundamental amorfa, artefatos de técnica e corpos estranhos. Foi realizada no tecido conjuntivo capsular reacional, dos espécimes representativos dos grupos I e II. Esta avaliação foi submetida à análise estatística.

Nos espécimes representados pelas cápsulas de colágeno (grupo III) a morfometria não foi executada pelo fato destas terem sido reabsorvidas, não

havendo, portanto, padronização para se realizar esta avaliação. Desse modo, os espécimes do grupo III foram submetidos apenas à análise descritiva, que utilizou os critérios determinados para a avaliação morfométrica.

A. Casualização dos campos microscópicos

De cada amostra foram obtidas 3 lâminas contendo 3 cortes semi-seriados cada uma, com intervalos de 50µm entre cada lâmina. De cada lâmina foi escolhido um corte histológico para ser avaliado, e deste corte foram analisados 10 campos, sendo 5 campos de cada lateral, totalizando assim 30 campos por espécime. A reação ocorrida nas extremidades não foi avaliada devido ao fato da guta-percha estar selando as aberturas dos tubos de polietileno. Para a escolha dos 10 campos microscópicos por corte, foi utilizado um esquema de casualização sistemática (Figura 6), segundo as indicações de Weibel (1969). Nesse esquema os campos microscópicos são escolhidos em intervalos regulares, de maneira que todas as regiões do corte histológico sejam representadas na mesma contagem.

B. Avaliação morfométrica da densidade de volume (V_{vi}) das fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e outros componentes

Esses parâmetros histológicos foram avaliados com uma objetiva de imersão de 100X e um graticulo de integração II Zeiss (Carl Zeiss, Inc., - Alemanha) colocado em uma ocular Kpl 8X, composta de 10 linhas paralelas e de 100 pontos numa área

quadrangular (Figura 7). A imagem do graticulo foi superposta, sucessivamente a 30 campos histológicos escolhidos por amostragem sistemática (WEIBEL, 1969) e anotados os números de pontos (P_i), que coincidiam com cada estrutura, ou seja, fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e outros componentes.

A densidade de volume (V_{vi}) foi determinada pela seguinte fórmula:

$V_{vi} = P_i/P$; onde P = número total de pontos.

Figura 6 - Esquema de casualização dos campos microscópicos, em cada lateral, por corte histológico

Figura 7 - Graticulo de integração II Zeiss sobre a imagem de um corte histológico

4.8.3-Análise estatística

A análise estatística dos valores obtidos para cada critério morfológico foi realizada utilizando o programa “Statistica 7.0” (StatSoft Inc., Tulsa, USA.). No confronto entre os materiais em cada período empregou-se o teste “t” de Student não pareado. Para a comparação global entre períodos de um mesmo material foi empregado o teste ANOVA e quando se evidenciou diferença significativa, as comparações individuais foram realizadas pelo teste de Tukey. Para todos os testes o nível de significância foi de 5% (0,05).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1-ANÁLISE DESCRITIVA

- PERÍODO 15 DIAS:

➤ GRUPO I – TUBO DE POLIETILENO

O exame microscópico dos espécimes deste grupo revelou a formação de tecido conjuntivo de aspecto capsular, envolvendo o tubo de polietileno implantado. Essa cápsula mostrou-se de modo geral organizada, com presença de feixes de fibras colágenas bem definidos, moderada quantidade de vasos sanguíneos, presença de fibroblastos em grande quantidade bem como fibrocitos dispostos ao longo das fibras colágenas. Na superfície da cápsula em contato com o tubo de polietileno, a população celular era mais acentuada, revelando fibroblastos, pequenos vasos sanguíneos e células inflamatórias do tipo macrofágicas mononucleadas dispostas na região mais periférica. Na porção mais externa da cápsula a população celular está diminuída predominando estruturas compatíveis com feixes de fibras colágenas (Figura 8).

➤ GRUPO II – BASTÃO DE DENTINA

A microscopia demonstrou a formação de um tecido conjuntivo de aspecto capsular envolvendo o bastão de dentina implantado. Apresentou-se rico em

elementos celulares como fibroblastos, fibrocitos e células endoteliais estruturando vasos sanguíneos. De permeio às estruturas celulares havia feixes de fibras colágenas bem definidas e presença moderada de células macrofágicas mononucleadas dispostas geralmente em contato com a superfície do material implantado (Figura 9).

➤ GRUPO III – CÁPSULA DE COLÁGENO

Os espécimes deste grupo revelaram tecido subcutâneo de aspecto reativo, formado por feixes de fibras colágenas bem definidas, presença de fibroblastos entremeados com fibrocitos, neo-formação vascular e presença de macrófagos mononucleados esparsos. Não foram detectados vestígios de colágeno implantado (Figura 10).

Figura 8: Tubo de polietileno, período de 15 dias. Fibras colágenas (★), vasos sanguíneos (↑), fibroblastos (▲), células inflamatórias do tipo macrofágicas mononucleadas (↑) e substância fundamental (▲)

Figura 9: Bastão de dentina, período de 15 dias. Fibroblastos (▲), fibras colágenas (★), vasos sanguíneos (↑), células macrofágicas mononucleadas (↑) e substância fundamental (▲)

Figura 10: Cápsula de colágeno, período de 15 dias. Fibras colágenas (★), fibroblastos (▲), vasos sanguíneos (↑), macrófagos mononucleados esparsos (↑) e substância fundamental (▲)

- PERÍODO 30 DIAS:**➤ GRUPO I – TUBO DE POLIETILENO**

Os espécimes representativos deste período exibiram uma estrutura capsular delgada, com presença marcante de feixes espessos de fibras colágenas, diminuição da população celular e de vasos sanguíneos. A presença de células estava caracterizada por fibroblastos e fibrocitos. O processo inflamatório apresentou-se reduzido, representado pela presença de macrófagos esparsos concentrados em geral na porção periférica, voltada para a superfície do tubo implantado (Figura 11).

➤ GRUPO II – BASTÃO DE DENTINA

A microscopia dos espécimes deste grupo revelou uma estrutura capsular mais delgada, rica em fibras colágenas, poucos vasos sanguíneos e população celular diminuída. As células presentes estavam representadas predominantemente por fibroblastos e a reação inflamatória estava ausente, entretanto, foi detectada a presença de células macrofágicas mononucleadas esparsas (Figura 12).

➤ GRUPO III – CÁPSULA DE COLÁGENO

A microscopia dos espécimes deste período revelou um tecido subcutâneo de aspecto denso rico em fibras colágenas, fibroblastos, fibrocitos, vasos sanguíneos e células macrofágicas mononucleadas esparsas. Não foi detectado vestígios do material implantado (Figura 13).

Figura 11: Tubo de polietileno, período de 30 dias. Feixes de fibras colágenas (★), fibroblastos (▲), vasos sanguíneos (↑), macrófagos (↑) e substância fundamental (▲)

Figura 12: Bastão de dentina, período de 30 dias. Fibras colágenas (★), fibroblastos (▲), vasos sanguíneos (↑), célula macrófaga mononucleada (↑) e substância fundamental (▲)

Figura 13: Cápsula de colágeno, período de 30 dias. Fibras colágenas (★), fibroblastos (▲), vaso sanguíneo (➡), célula macrofágica mononucleada (➡) e substância fundamental (▲)

- PERÍODO 60 DIAS:**➤ GRUPO I – TUBO DE POLIETILENO**

A microscopia dos espécimes deste grupo revelou uma estrutura tecidual de forma capsular bem delgada com feixe de fibras colágenas compactos. A população celular bem como os vasos sanguíneos apresentava-se diminuídos e as células macrofágicas eram escassas (Figura 14).

➤ GRUPO II – BASTÃO DE DENTINA

A microscopia demonstrou nos espécimes deste grupo estrutura capsular bem definida caracterizada pela presença de feixes de fibras colágenas compactos. No geral, a população celular estava diminuída bem como os vasos sanguíneos. As células presentes estavam representadas por fibroblastos e fibrocitos (Figura 15).

➤ GRUPO III – CÁPSULA DE COLÁGENO

A maioria dos espécimes deste período revelou tecido com características de tecido subcutâneo normal. Diminuição de fibras colágenas, da população celular fibroblástica e fibrocítica e, destaque da substância fundamental (Figura 16).

Figura 14: Tubo de polietileno, período de 60 dias. Feixes de colágeno compactos (★) e fibroblastos (▲)

Figura 15: Bastão de dentina, período de 60 dias. Feixes de colágeno compactos (★), fibroblastos (▲) e vaso sanguíneo (↑)

Figura 16: Cápsula de colágeno, período de 60 dias. Feixes de fibras colágenas (★), fibroblastos (▲), vaso sanguíneo (↑) e substância fundamental (▲)

5.2-AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA DENSIDADE DE VOLUME (%) DE FIBRAS COLÁGENAS, FIBROBLASTOS, CÉLULAS INFLAMATÓRIAS, VASOS SANGUÍNEOS E DE OUTROS COMPONENTES ENCONTRADOS NO TECIDO CONJUNTIVO ADJACENTE AO MATERIAL IMPLANTADO

Os dados obtidos para a densidade de volume (%) de fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e de outros componentes encontrados no tecido conjuntivo reacional dos espécimes dos grupos I e II, nos diferentes períodos experimentais, encontram-se dispostos nos Apêndices A, B, C, D, E e F (valores individuais) e, os valores médios e o desvio padrão encontram-se na tabela 2 e representados nos gráficos 1, 2, 3, 4 e 5.

Tabela 2: Valores médios e desvio padrão da densidade de volume (%) de fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos, células inflamatórias e de outros componentes encontrados no tecido conjuntivo adjacente à superfície do material implantado

	15 dias		30 dias		60 dias	
Tubo de polietileno-Grupo I						
Fibras Colágenas	66,18	±4,00	83,28	±3,73	88,19	±1,95
Fibroblastos	10,81	±2,31	6,13	±1,07	5,41	±0,64
Vasos Sanguíneos	1,76	±1,26	1,12	±0,69	0,97	±0,56
Cel. Inflamatórias	2,95	±1,91	1,95	±0,72	0,94	±0,22
Outros	18,30	±2,52	7,52	±3,31	4,49	±1,80
Bastão de dentina-Grupo II						
Fibras Colágenas	75,52	±2,19	83,80	±2,32	87,86	±2,52
Fibroblastos	8,05	±1,90	7,15	±0,81	7,07	±1,09
Vasos Sanguíneos	1,97	±0,42	1,34	±0,84	0,58	±0,32
Cel. Inflamatórias	2,02	±0,59	0,96	±0,75	0,49	±0,42
Outros	12,44	±1,63	6,75	±1,57	4,00	±1,67

Gráfico 1 – Representação gráfica dos valores médios da densidade de volume (%) das fibras colágenas

Gráfico 2 – Representação gráfica dos valores médios da densidade de volume (%) dos fibroblastos

Gráfico 3 – Representação gráfica dos valores médios da densidade de volume (%) dos vasos sanguíneos

Gráfico 4 – Representação gráfica dos valores médios da densidade de volume (%) das células inflamatórias

Gráfico 5 – Representação gráfica dos valores médios da densidade de volume (%) de outros componentes

5.3-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Resultados do teste “t” de Student aplicado para a comparação entre os grupos I e II nos períodos experimentais, para cada um dos critérios morfológicos estabelecidos (Tabelas 3, 4 e 5).

Tabela 3: Teste “t” de Student, comparando os grupos I e II, no período de 15 dias

15 dias			
	T. polietileno-Grupo I	B. dentina-Grupo II	p*
Fibras Colágenas	66,18	75,52	0,000 (s)
Fibroblastos	10,81	8,05	0,047 (s)
Vasos Sanguíneos	1,76	1,97	0,706 (ns)
Cél. Inflamatórias	2,95	2,02	0,281 (ns)
Outros	18,30	12,44	0,001 (s)

*p<0,05

s= diferença estatisticamente significativa

ns= diferença estatisticamente não significativa

Tabela 4: Teste “t” de Student, comparando os grupos I e II, no período de 30 dias

30 dias			
	T. polietileno-Grupo I	B. dentina-Grupo II	p*
Fibras Colágenas	83,28	83,8	0,774 (ns)
Fibroblastos	6,13	7,15	0,093 (ns)
Vasos Sanguíneos	1,12	1,34	0,640 (ns)
Cél. Inflamatórias	1,95	0,96	0,042 (s)
Outros	7,52	6,75	0,615 (ns)

*p<0,05

s= diferença estatisticamente significativa

ns= diferença estatisticamente não significativa

Tabela 5: Teste “t” de Student, comparando os grupos I e II, no período de 60 dias

	60 dias		
	T. polietileno-Grupo I	B. dentina-Grupo II	p*
Fibras Colágenas	88,19	87,86	0,812 (ns)
Fibroblastos	5,41	7,07	0,009 (s)
Vasos Sanguíneos	0,97	0,58	0,170 (ns)
Cél. Inflamatórias	0,94	0,49	0,042 (s)
Outros	4,49	4,00	0,632 (ns)

*p<0,05

s= diferença estatisticamente significativa

ns= diferença estatisticamente não significativa

Aos 15 dias, as fibras colágenas apresentaram diferença significativa entre os 2 grupos avaliados, apresentando-se em maior quantidade no grupo do bastão de dentina ($p=0,000$). Aos 30 e 60 dias não houve diferença significativa.

A quantidade de fibroblastos aos 15 dias foi maior no grupo do tubo de polietileno, sendo essa diferença significativa ($p=0,047$). Aos 30 e 60 dias, a quantidade de fibroblastos foi maior no grupo do bastão de dentina, apresentando diferença significativa apenas no período de 60 dias ($p=0,009$). Para os vasos sanguíneos não houve diferença significativa em nenhum dos períodos.

As células inflamatórias apresentaram-se em menor quantidade no grupo II (bastão de dentina) em todos os períodos experimentais, sendo significativa aos 30 e 60 dias ($p=0,042$ e $p=0,042$).

A densidade de volume dos outros componentes encontrados no tecido conjuntivo reacional foi maior para o tubo de polietileno em todos os períodos, significativa apenas aos 15 dias ($p=0,001$).

Resultados do teste ANOVA aplicado para a comparação global entre períodos de um mesmo material, para cada um dos critérios morfológicos estabelecidos e quando se evidenciou diferença significativa, foi realizado o teste de Tukey (Tabela 6).

Tabela 6: Teste ANOVA. Comparação entre os períodos experimentais nos grupos I e II e teste de Tukey para as diferenças significantes

Grupos	Critério de densidade	ANOVA Valor de p	Tukey p<0,05
Tubo de polietileno Grupo I	Fibras Colágenas	0,000 (s)	15X30; 15X60
	Fibroblastos	0,000 (s)	15X30; 15X60
	Vasos Sanguíneos	0,289 (ns)	
	Cél. Inflamatórias	0,033 (s)	15X60
	Outros	0,000 (s)	15X30; 15X60
Bastão de dentina Grupo II	Fibras Colágenas	0,000 (s)	15X30; 15X60; 30X60
	Fibroblastos	0,398 (ns)	
	Vasos Sanguíneos	0,003 (s)	15X60
	Cél. Inflamatórias	0,002 (s)	15X30; 15X60
	Outros	0,000 (s)	15X30; 15X60; 30X60

s= diferença estatisticamente significativa

ns= diferença estatisticamente não significativa

A comparação entre os períodos de experimentação de 15, 30 e 60 dias no grupo I (tubo de polietileno) resultou em diferença significativa para os critérios fibras colágenas, fibroblastos e outros, sendo essa diferença entre 15 e 30 dias e 15 e 60 dias para os 3 critérios. Para o critério células inflamatórias a diferença significativa foi apenas entre os períodos de 15 e 60 dias, e para os vasos sanguíneos não houve diferença significativa entre os períodos.

No grupo II (bastão de dentina), as fibras colágenas e outros componentes apresentaram diferença significativa entre todos os períodos. As células inflamatórias demonstraram diferença nos períodos de 15 e 30 dias e 15 e 60 dias, já os vasos sanguíneos apenas entre 15 e 60 dias. Para os fibroblastos não houve diferença significativa em nenhum dos períodos.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1-DA METODOLOGIA

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

A reprodução do rato em biotérios permite a eliminação de fatores individuais, como deficiência imune, ou estarem afetados por alguma doença, além de facilitar a obtenção do número de amostras necessárias. Esse animal tem um metabolismo mais acelerado, permitindo a obtenção de resultados num curto período de tempo (RODRIGUEZ SOSA, 2004).

Para o presente estudo foram selecionados ratos machos devido às variações no ciclo hormonal das fêmeas, o que poderia interferir nos resultados. Os animais

tiveram a mesma origem, Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, e foram padronizados quanto à saúde, idade e peso corporal.

Para a implantação de pastas ou cimentos em tecido subcutâneo de ratos, é necessário a utilização de condicionadores, veículos especiais que permitam um controle de sua forma e tamanho, conforme sugeriu Torneck (1966). Essa metodologia simula uma condição clínica de extravasamento de material endodôntico para o periodonto apical. Segundo a literatura, os implantes dos materiais endodônticos em tecidos podem ser realizados em tubos de polietileno (MAGRO, *et al.*, 1987; GORDUYSUS; ETIKAN; GOKOZ, 1998; YALTIRIK, *et al.*, 2004; CINTRA, *et al.*, 2006; MORAIS, *et al.*, 2006; SUMER, *et al.*, 2006; MORI, *et al.*, 2009), de teflon (OLSSON; SLIWKOWSKI; LANGELAND, 1981; ECONOMIDES, *et al.*, 1995; KOLOKOURIS, *et al.*, 1996; 1998), em tubos de silicone rígidos (ZMENER; GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1990), em tubos de dentina (SOUZA, *et al.*, 1977; ZANONI, *et al.*, 1988; HOLLAND, *et al.*, 1999; 2001; 2002a; 2002b), e recentemente, tem sido utilizada cápsulas de colágeno para determinados materiais (OLIVEIRA, *et al.*, 1999; SICCA, *et al.*, 2000; ZAMBUZZI, *et al.*, 2005; 2006; GARCIA, 2008)

As normas da FDI (STANFORD, 1980; STANLEY, 1992; ISO, 1997) recomendam período curto, 48 horas, para avaliação dos efeitos da incisão e do procedimento operatório. Para avaliar a reação do tecido conjuntivo, em contato com os materiais experimentais, recomendam períodos de 14 a 84 dias. A ADA (1972; 1982) sugere períodos experimentais que podem variar entre 7-10, 21-35 e 60-80 dias. Observamos que na literatura não existe um consenso entre os autores quanto aos tempos de avaliação. Torneck (1966; 1967) e Phillips (1967) utilizaram um período de 60 dias, Holland et al. (1999; 2001; 2002a; 2002b) optaram por períodos

de 7 e 30 dias, enquanto outros empregaram períodos que variam de 7 a 180 dias (OLSSON; SLIWKOWSKI; LANGELAND, 1981; ORSTAVICK, 1988; ZMENER; GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1990; ECONOMIDES, *et al.*, 1995; KOLOKOURIS, *et al.*, 1996; KOLOKOURIS, *et al.*, 1998). Optamos pelos períodos de 15, 30 e 60 dias, pois são os mais próximos sugeridos pela ADA (1972; 1982).

6.1.1-Dos condicionadores empregados

A implantação de materiais acondicionados em tubos, em tecido subcutâneo de pequenos animais é altamente reconhecida como método para avaliação, simulando uma condição clínica. Os implantes de materiais endodônticos podem ser realizados em tubos de polietileno, teflon, silicone, dentina e em cápsulas de colágeno, já que todos são bem tolerados pelo organismo dos animais. Os tubos de polietileno na implantação subcutânea em ratos, foram primeiramente avaliados por Torneck (1966; 1967), que observou mínima ou nenhuma reação tecidual, indicando a aceitabilidade do material para avaliação de materiais endodônticos. Segundo Makkes *et al.* (1977), após duas semanas da implantação, os tubos de polietileno apresentaram alguns sinais de inflamação no tecido circunjacente, sendo que essa reação desapareceu após três semanas. Esses autores justificam o uso dos tubos de polietileno por serem veículos sólidos, de fácil manipulação e de implantação, não apresentando reação no tecido circunjacente, pois são quimicamente estáveis e não sofrem influência de substâncias que possam ser acondicionados em seu interior.

Posteriormente, outros autores utilizaram também os tubos de polietileno, onde foi observada a ausência de inflamação frente ao material (MAGRO, *et al.*, 1987; GORDUYSUS; ETIKAN; GOKOZ, 1998; YALTIRIK, *et al.*, 2004; CINTRA, *et al.*, 2006; MORAIS, *et al.*, 2006; SUMER, *et al.*, 2006; MORI, *et al.*, 2009). Economides (1995), Kolokouris (1996; 1998) e Olsson, Sliwkiwski e Langeland (1981) utilizaram tubos de teflon; Zmener, Guglielmotti e Cabrini (1990) implantaram tubos de silicone rígidos. Holland *et al.* (1999; 2001; 2002a; 2002b) empregaram tubos de dentina preparados a partir de raízes de dentes humanos, para avaliação do MTA e cimento Portland em tecido subcutâneos de ratos. Os tubos de dentina foram utilizados em comparação aos tubos de polietileno e teflon, para poder observar a ação dos materiais nas paredes de dentina, aproximando-se assim do que realmente ocorria no canal radicular. Para os tubos de dentina vazios, que serviram como controle, observaram que decorridos os períodos experimentais, a inflamação foi diminuindo, demonstrando assim a biocompatibilidade desses acondicionadores.

Oliveira *et al.* (1999), Sicca *et al.* (2000), Zambuzzi *et al.* (2005; 2006) fizeram uso de cápsulas de colágeno como acondicionadores de partículas de osso bovino. Observaram, aos 30 dias, reabsorção da cápsula e discreto infiltrado inflamatório com alguns focos de macrófagos, exibindo vacúolos citoplasmáticos, contendo vestígios de colágeno e, aos 60 dias, notaram ainda focos persistentes de reação inflamatória crônica. Garcia (2008) também fez uso de cápsulas de colágeno em ratos, entretanto, aos 30 dias, o exame microscópio dos espécimes revelou reabsorção completa da cápsula implantada e tecido subcutâneo normal.

O propósito de implantar tubos de polietileno, bastões de dentina e cápsulas de colágeno foi comparar a reação tecidual provocada por tais acondicionadores,

considerando que os mesmos são biocompatíveis, mas não há ainda na literatura trabalhos comparando esses materiais para avaliar qual deles causaria menor irritação aos tecidos. A cápsula de colágeno tem seu uso restrito, pelo fato de ser dissolvida e reabsorvida, sua reação tecidual foi descrita, mas não mensurada. A cápsula de colágeno é utilizada apenas para determinados materiais como, por exemplo, para a implantação de partículas de osso bovino, pois como esse material não é fluido e não sofre presa permanece no formato que foi colocado na cápsula de colágeno, já nos casos de cimentos e pastas, estes escoariam para todo o tecido conjuntivo após a dissolução do colágeno, não havendo um limite para avaliação do material testado.

Optamos pelo bastão de dentina proveniente de raízes de dentes bovinos, diferentemente dos estudos de Holland et al. (1999; 2001; 2002a; 2002b), nos quais os tubos de dentina foram preparados a partir de raízes de dentes humanos extraídos. A estrutura dentinária de dentes bovinos se presta, perfeitamente a diversos experimentos envolvendo materiais endodônticos (BURROW, *et al.*, 1994; REEVES, *et al.*, 1995; CAMARGO, *et al.*, 2007). Além da similaridade com os dentes humanos, há a facilidade em obtê-los, pois, atualmente, com a implantação da filosofia preventiva, as exodontias estão diminuindo.

A guta-percha foi utilizada para selamento das extremidades dos tubos de polietileno e não foi usada como controle, sendo seu objetivo tornar os tubos de polietileno em bastões, obtendo-se assim uma padronização na metodologia, já que os outros materiais avaliados eram neste formato. Esse selamento teve a finalidade, também, de impedir a invaginação de tecido conjuntivo neo-formado para o interior do tubo. A escolha da guta-percha para este objetivo foi devido ao fato, desta ser um material também biocompatível (HUNTER, 1957; HOLLAND, *et al.*, 1975;

LEONARDO, *et al.*, 1990; TAVARES; SOARES; SILVEIRA, 1994; MEJÍA; GARCIA, 1998) e um dos materiais utilizados como controle em testes de biocompatibilidade (BORTOLUZZI, 2005; MORAES, 2006; MAGRO-KATO, 2007; ORTIZ-OROPEZA, 2007; MORI, *et al.*, 2009). A guta-percha foi desinfetada com hipoclorito de sódio a 1% por 1 minuto de acordo com trabalhos que demonstram a efetividade dessa solução para desinfecção de tais cones por este período (CARDOSO, *et al.*, 1999; BORTOLO, 2006). Em nosso estudo, optamos pela manipulação do hipoclorito de sódio em farmácia de manipulação, devido ao fato dos achados de Pécora *et al.* (1997), demonstrarem que soluções de hipoclorito de sódio a 5% sofreram degradação pelo tempo, isto é, perda do cloro ativo.

6.2-DOS RESULTADOS

Os tubos de polietileno (grupo I) e bastões de dentina (grupo II) foram envolvidos por tecido conjuntivo neoformado, desenvolvendo uma estrutura capsular, enquanto que as cápsulas de colágeno foram reabsorvidas, não havendo condições para a formação capsular. A tabela 2 e gráficos 1, 2, 3, 4 e 5 demonstram que nos grupos I e II ocorreu, no decorrer dos períodos experimentais, processo de fibrose caracterizado pela diminuição gradativa das células inflamatórias, dos vasos sanguíneos, dos fibroblastos, e outros componentes, principalmente, da substância fundamental e aumento das fibras colágenas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

No grupo III (cápsulas de colágeno) foi observado, conforme a microscopia descritiva, aos 15 dias, tecido subcutâneo reativo, caracterizado pela exuberância de

feixes de fibras colágenas; aos 30 dias a imagem era semelhante ao período anterior e aos 60 dias havia diminuição de fibras colágenas, da população fibroblástica e aumento da substância fundamental, caracterizando retorno à morfologia normal. Essa resposta tecidual confronta os resultados obtidos por Oliveira et al. (1999), Sicca et al. (2000) e Zambuzzi et al. (2005; 2006) que fizeram uso de cápsulas de colágeno como acondicionadores de partículas de osso bovino e no período de 10 e 20 dias observaram áreas focais com grande celularidade, caracterizada por células volumosas, contendo material no citoplasma, sugestivas de macrófagos contendo resíduos da cápsula de colágeno implantada. Aos 30 dias verificaram discreto infiltrado inflamatório focal, formado por macrófagos com vacúolos citoplasmáticos, contendo material, compatível com resíduos da referida cápsula implantada, e aos 60 dias, focos de reação inflamatória persistiam. Os resultados obtidos por Garcia (2008), que também fez uso de cápsulas de colágeno em tecido subcutâneo de ratos, revelaram, aos 30 dias, reabsorção completa da cápsula implantada e tecido subcutâneo normal, corroborando com os achados deste experimento.

Os resultados dos critérios morfológicos estabelecidos para os grupos I e II, submetidos ao teste “t” de Student, revelaram aos 15 dias, densidade de volume das fibras colágenas maior, de modo significativo, para o grupo II (75,52) em relação ao grupo I (66,18). Os valores da densidade de volume de fibroblastos (10,81) e de outros componentes (18,30) do grupo I foram mais elevados, de modo significativo, que os valores do grupo II. As diferenças observadas nos critérios células inflamatórias e vasos sanguíneos foram insignificantes (Tabela 3). Aos 30 e 60 dias, os valores obtidos para os referidos critérios demonstraram alterações morfológicas importantes. As densidades encontradas para as fibras colágenas, vasos

sanguíneos e outros componentes não apresentaram diferenças significantes entre os grupos I e II, entretanto, os fibroblastos, aos 60 dias, apresentaram a densidade de volume maior para o grupo II, com diferença significativa ($p=0,009$). O critério células inflamatórias com resultado significativo para os períodos de 30 e 60 dias, apresentou menor densidade de volume de células inflamatórias para o grupo II (Tabela 4 e 5)

Os valores para densidade de células inflamatórias, aos 15, 30 e 60 dias, foram sempre maiores no grupo I (tubo de polietileno) quando comparado ao grupo II (bastão de dentina), com diferença significativa aos 30 e 60 dias (Tabelas 4 e 5). A persistência de reação inflamatória mais acentuada frente ao polietileno pode estar relacionada à característica de sua composição, exercendo, possivelmente, maior quimiotaxia para macrófagos. Tal fato não guarda relação com reação imunológica, pois o polietileno não possui estrutura antigênica para provocar o seu desenvolvimento e, por outro lado, a sua biocompatibilidade já está consagrada (MAGRO, *et al.*, 1987; GORDUYSUS; ETIKAN; GOKOZ, 1998; YALTIRIK, *et al.*, 2004; CINTRA, *et al.*, 2006; MORAIS, *et al.*, 2006; SUMER, *et al.*, 2006; MORI, *et al.*, 2009). Os bastões de dentina bovina, que tem um componente orgânico, poderiam provocar uma resposta imune, mas esse evento não ocorreu em nosso estudo, estando de acordo com os achados de Horsted, Fejerskov e Johannesen (1980), que também esterilizaram os tubos de dentina. Apesar da persistência do infiltrado macrofágico, a presença dessas células nos espécimes estudados foi discreta, em todos os períodos avaliados, não interferindo na produção de fibras colágenas, que aumentou gradativamente, até aos 60 dias (Gráfico 1) e com diferenças significantes entre os períodos estudados (Tabela 6).

A comparação entre os períodos experimentais, nos grupos I e II, pelo Teste de ANOVA (Tabela 6), demonstra diferenças significantes para a maioria dos critérios morfológicos adotados, exceto para vasos sanguíneos no grupo I e para fibroblastos no grupo II. A aplicação do teste de Tukey (Tabela 6) revelou que todas as diferenças significantes, em ambos os grupos, envolviam os períodos inicial (15 dias) e final (60 dias). Elegendo a produção de fibras colágenas como elemento, que traduz reparo ou isolamento de um corpo estranho pela fibrose, os valores de densidade foram significantes entre os períodos 15x30; 15x60 (grupo I) e 15x30; 15x60 e 30x60 (grupo II), e associando o gráfico 1, é possível afirmar que os tubos de polietileno e os bastões de dentina tiveram um comportamento semelhante, não provocando reação tóxica.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a metodologia empregada neste experimento permitiram observar que:

- A persistência da reação inflamatória de baixa intensidade com predominância no grupo I (tubo de polietileno), quando comparada ao grupo II, apresentando diferença significativa aos 30 e 60 dias, não interferiu na produção de fibras colágenas.

- As cápsulas de colágeno (grupo III) foram reabsorvidas, não ocorrendo persistência de focos de reação inflamatória.

E concluir que:

- O tubo de polietileno e o bastão de dentina bovina provocaram reações teciduais semelhantes, demonstrando, aos 60 dias, um comportamento de reparo.

- As cápsulas de colágeno não interferiram na recomposição morfológica do tecido subcutâneo.

Referências

REFERÊNCIAS

American Dental Association - Council on Dental Materials and Devices of the American Dental Association. J Amer Dent Assoc. 1972;84:375-95.

American National Standards/ American Dental Association. Document nº41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. New York, ANSI/ADA. 1982.

Bang G. Induction of heterotopic bone formation by demineralized dentin in guinea pigs: antigenicity of the dentin matrix. J Oral Pathol. 1972;1(4):172-85.

Bortolo MV. Avaliação da desinfecção de cones de gutta-percha com hipoclorito de sódio, clorexidina e óleo a base de mamona [monografia]. Bauru (SP): Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – HRAC – USP; 2006.

Bortoluzzi EA. Avaliação da reação do tecido subcutâneo de ratos à implantação dos cimentos MTA e Portland brancos acrescidos de radiopacificadores. 2005. 175 p. - Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

Boulger EP. Reaction of rat tissue to implanted root ends. J Amer Dent Assoc. 1931;18:988-1008.

Burrow MF, Tagami J, Negishi T, Nikaido T, Hosoda H. Early tensile bond strengths of several enamel and dentin bonding systems. J Dent Res. 1994;73(2):522-8.

Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. J Endod. 2007;33(4):422-6.

Canova GC. Influência da membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada no processo de reparo após pulpotomia em dentes de cães: análise microscópica e radiográfica. 2003. 74 p. - Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.

Cardoso CL, Kotaka CR, Redmerski R, Guilhermetti M, Quieroz AF. Rapid decontamination of gutta-percha cones with sodium hypochlorite. J. Endod. 1999;25:498-501.

Cintra LT, Moraes IG, Estrada BP, Gomes JEF, Bramante CM, Garcia RB, et al. Evaluation of the tissue response to MTA and MBPC: Microscopic analysis of implants in alveolar bone of rats. *J Endod*. 2006;32(6):556-9.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins-Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Economides N, Kotsaki-Kovatsi VP, Pouloupoulos A, Kolokuris I, Rozos G, Shore R. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. *J Endod*. 1995;21(3):122-7.

Garcia RB. Implantação de osso bovino desproteínizado, hidroxiapatita-beta TCP e calcário dolomítico em tecido subcutâneo de ratos. Análise microscópica descritiva, quantitativa e comparativa das reações teciduais. 2008. 229 p. - (Livre-docência) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo., Bauru, 2008.

Gomes JEF, Bernabe PF, Nery MJ, Otoboni JAF, Dezan EJ, Moraes Costa MM, et al. Reaction of rat connective tissue to a new calcium hydroxide-based sealer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(2):71-6.

Gorduysus MO, Etikan I, Gokoz 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.

Gosain AK, Song L, Riordan P, Amarante MT, Nagy PG, Wilson CR, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109(2):619-30.

Gosain AK, Riordan PA, Song L, Amarante MT, Kalantarian B, Nagy PG, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part II. Bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects. *Plast Reconstr Surg*. 2004;114(5):1155-63.

Hedrich HJ. History, strains and models. In: Krinke, G.L. *The Laboratory rat*. London: Academic Press; 2000. p.3-16.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Mello W. Resposta tecidual à implantação de diferentes marcas de cones de guta-percha. *Rev Fac Odontol Araçatuba*. 1975;4(1):81-9.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni JAF, Bernabe PF, Dezan EJ. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*. 1999;25(3):161-6.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco IMJ, Bernabe PF, Otoboni JAF, et al. 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.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabe FE, Otoboni JAF, Dezan EJ, et al. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod*. 2002a;28(3):173-6.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco IMJ, Bernabe PF, Otoboni JAF, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J*. 2002b;13(1):23-6.

Horsted P, Fejerskov O, Johannesen G. A model for experimental endodontics by transplanting human dental roots subcutaneously to rats. *Scand J Dent Res*. 1980;88(5):412-7.

Hunter HA. The effect of gutta-percha, silver points, and Rickert's root sealer on bone healing. *J Canad Dent Ass*. 1957;23(6):385-8.

ISO. International Organization for Standardization. ISO 7405: dentistry – preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials. Genève, ISO. 1997.

Kolokouris I, Beltes P, Economides N, Vlemmas I. Experimental study of the biocompatibility of a new glass-ionomer root canal sealer (Ketac-Endo). *J Endod*. 1996;22(8):395-8.

Kolokouris 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.

Langeland K, Guttuso J, Langeland LK, Tobon G. Methods in the study of biologic responses to endodontic materials. *Oral Surg*. 1969;27(4):522-42.

Langeland K, Olsson B, Pascon EA. Biological evaluation of Hydron. J Endod. 1981;7(5):196-204.

Laschke MW, Witt K, Pohlemann T, Menger MD. Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2007;82(2):494-505.

Leonardo MR, Utrilla LS, Rothier A, Leonardo RT, Consolaro A. Comparison of subcutaneous connective tissue responses among three different formulations of gutta-percha used in thermatic techniques. Int Endod J. 1990;23(4):211-7.

Maeda ST. Avaliação microscópica da resposta tecidual de cavidades cirúrgicas em fêmures de coelho preenchidas com sulfato de cálcio. 2005. 97 p. - Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

Magro-Kato MM. Avaliação microscópica da implantação, em subcutâneo de ratos, do agregado trióxido mineral-CPM e do clínquer do cimento Portlando branco puro e acrescido de 2% e 5 % de sulfato de cálcio e determinação de seus tempos de presa. 2007. 241 p. - Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

Magro OF, Carvalho ACP, Martins AL, Câmara PRP. Reações do tecido conjuntivo à pomada de confei, própolis e mel – estudo histológico em ratos. Rev Bras Odont. 1987;44(5):44-8.

Makkes PC, Van Velzen SKT, Wesselink PR, Greeve PCM. Polyethylene tubes as a model for the root canal. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1977;44(2):293-300.

Mejía AMR, Garcia RB. Avaliação microscópica da resposta tecidual à implantação de cones de gutta-percha coloridos nos tecidos conjuntivos subcutâneo e intradérmico de ratos. Rev Fac Odontol Bauru. 1998;6(3):1-8.

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. 2006. 195 p. - Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2006.

Morais CA, Bernardineli N, Garcia RB, Duarte MA, Guerisoli DM. Evaluation of tissue response to MTA and Portland cement with iodoform. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;102(3):417-21.

Mori GG, de Moraes IG, Nunes DC, Castilho LR, Poi WR, Capaldi ML. Biocompatibility evaluation of alendronate paste in rat's subcutaneous tissue. *Dent Traumatol.* 2009;25(2):209-12.

Morris ML. The implantation of human dentin and cementum into the subcutaneous tissues of the rat. *Periodontics.* 1967;5(3):113-22.

Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, et al. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. *Rev Fac Odontol Bauru.* 1999;7(3-4):85-93.

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

Orstavick DM, I. A. 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%. 2007. 219 p. - Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

Pécora JD, Guerisoli DMZ, Silva RS, Vansan LP. Shelf-life of % sodium hypochlorite solutions. *Braz Endod J.* 1997;2:43-5.

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

Pollick S, Shors EC, Holmes RE, Kraut RA. Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53(8):915-22.

Reeves GW, Fitchie JG, Hembree JH, Jr., Puckett AD. Microleakage of new dentin bonding systems using human and bovine teeth. *Oper Dent.* 1995;20(6):230-5.

Rodriguez Sosa SA. Reação histopatológica do tecido conjuntivo do dorso de ratos irradiado com laser de CO2 ou de Er:YAG. 2004. 98 p. - Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

Rumpel E, Wolf E, Kauschke E, Bienengraber V, Bayerlein T, Gedrange T, et al. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. *Folia Morphol (Warsz)*. 2006;65(1):43-8.

Schwartz Z, Weesner T, van Dijk S, Cochran DL, Mellonig JT, Lohmann CH, et al. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol*. 2000;71(8):1258-69.

Schwarz F, Herten M, Ferrari D, Wieland M, Schmitz L, Engelhardt E, et al. Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxyapatite + beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen): an immunohistochemical study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007;36(12):1198-206.

Sicca CM, Oliveira RC, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. *Rev Fac Odontol Bauru*. 2000;8(1-2):1-10.

Souza V, Holland R, Mello W, Nery MJ. Reaction of rat connective tissue to the implant of calcium hydroxide pastes. *Rev Fac Odontol Araçatuba*. 1977;6(1-2):69-79.

Stanford JW. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Endod J*. 1980;30(2):140-88.

Stanley HR. Biological evaluation of dental material. *Int Dent J*. 1992;42(1).

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):1094-6.

Tavares T, Soares IJ, Silveira NL. Reaction of rat subcutaneous tissue to implants of gutta-percha for endodontic use. *Endod Dent Traumatol*. 1994;10(4):174-8.

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

Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. II. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1967;24(5):674-83.

Weibel ER. Stereological principles of morphometry in electron microscopic cytology. Int Rev Cytol. 1969;26:235-302.

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.

Zambuzzi WF, Oliveira RC, Alanis D, Menezes R, Letra A, Cestari TM, et al. Microscopic Analysis of Porous Microgranular Bovine Anorganic Bone Implanted in Rat Subcutaneous Tissue. J Appl Oral Sci. 2005;13(4):382-6.

Zambuzzi WF, Oliveira RC, Pereira FL, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM. Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. Braz Dent J. 2006;17(4):274-8.

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

Zmener O, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Tissue response to an experimental calcium hydroxide-based endodontic sealer: a quantitative study in subcutaneous connective tissue of the rat. Endod Dent Traumatol. 1990;6(2):66-72.

Apêndice

APÊNDICE A

Tubo de polietileno 15 dias: Valores da densidade de volume (%) por animal

Rato	Fibras	Fibroblastos	Vasos	Cel. Inflam.	Outros
1	64,98	13,47	0,86	2,89	17,80
2	69,54	12,78	0,93	1,86	14,89
3	65,95	12,40	1,26	3,04	17,35
4	59,15	8,35	3,94	6,22	22,34
5	69,97	8,85	0,95	0,45	19,78
6	67,50	9,00	2,64	3,22	17,64

APÊNDICE B

Tubo de polietileno 30 dias: Valores da densidade de volume (%) por animal

Rato	Fibras	Fibroblastos	Vasos	Cel. Inflam.	Outros
1	85,66	6,65	0,12	1,66	5,91
2	86,58	6,00	1,93	0,96	4,53
3	86,28	5,60	0,54	1,93	5,65
4	83,04	7,17	1,34	2,88	5,57
5	81,00	4,33	1,72	1,59	11,36
6	77,07	7,05	1,08	2,67	12,13

APÊNDICE C

Tubo de polietileno 60 dias: Valores da densidade de volume (%) por animal

Rato	Fibras	Fibroblastos	Vasos	Cel. Inflam.	Outros
1	86,33	6,06	1,60	1,32	4,69
2	90,68	5,64	0,85	0,71	2,12
3	85,97	4,89	0,60	0,94	7,60
4	89,10	4,56	0,66	0,96	4,72
5	89,81	5,16	0,38	1,02	3,63
6	87,20	6,15	1,72	0,72	4,21

APÊNDICE D

Bastão de dentina 15 dias: Valores da densidade de volume (%) por animal

Rato	Fibras	Fibroblastos	Vasos	Cel. Inflam.	Outros
1	72,82	11,15	2,62	1,01	12,40
2	78,59	7,98	1,43	2,53	9,47
3	75,28	6,18	2,24	1,99	14,31
4	76,29	6,89	1,85	1,72	13,25
5	76,88	6,71	1,99	2,25	12,17
6	73,32	9,39	1,69	2,58	13,02

APÊNDICE E

Bastão de dentina 30 dias: Valores da densidade de volume (%) por animal

Rato	Fibras	Fibroblastos	Vasos	Cel. Inflam.	Outros
1	82,64	7,35	2,03	0,28	7,70
2	79,89	7,57	2,41	0,80	9,33
3	84,28	8,07	0,59	1,43	5,63
4	86,35	6,03	0,38	2,26	4,98
5	83,93	7,62	1,77	0,50	6,18
6	85,69	6,27	0,86	0,51	6,67

APÊNDICE F

Bastão de dentina 60 dias: Valores da densidade de volume (%) por animal

Rato	Fibras	Fibroblastos	Vasos	Cel. Inflam.	Outros
1	86,01	7,18	0,52	0,21	6,08
2	83,84	8,35	0,29	1,34	6,18
3	89,67	7,11	0,33	0,28	2,61
4	88,06	7,50	0,67	0,44	3,33
5	88,93	7,23	0,49	0,30	3,05
6	90,67	5,05	1,17	0,36	2,75

Anexo

ANEXO A

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)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Fone: (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. N° 028/2007

Bauru 29 de janeiro de 2008.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **"Análise da reação tecidual à implantação de tubos de polietileno, tubos de dentina, cápsula de colágeno e bastão de guta-percha. Estudo microscópico em tecido subcutâneo de ratos. Avaliação de um modelo experimental"**, de autoria de Melina Vieira Bortolo, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator aprovando o projeto foi aceito *"ad referendum"* desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Roberto Brandão Garcia

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários