Paloma Gagliardi Minotti

**Avaliação microscópica da reação tecidual em subcutâneo
de rato frente a cimentos Portland contendo diferentes
concentrações de arsênico**

Bauru
2011

Paloma Gagliardi Minotti

Avaliação microscópica da reação tecidual em subcutâneo de rato frente a cimentos Portland contendo diferentes concentrações de arsênico

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

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Versão Corrigida

Bauru
2011

Minotti, Paloma Gagliardi

M666a Avaliação microscópica da reação tecidual em subcutâneo de rato frente a cimentos Portland contendo diferentes concentrações de arsênico. / Paloma Gagliardi Minotti.-- Bauru, 2011.

132 p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:_____

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 024/2009
Data: 18 de setembro de 2009

DADOS CURRICULARES

PALOMA GAGLIARDI MINOTTI

03 de Março de 1983	Nascimento em Itamarajú, Bahia, Brasil.
Filiação	Dejair Minotti Maria Teresa Gagliardi Minotti
2003 - 2006	Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo – Bauru/SP.
2007	Atualização em Odontopediatria – Faculdade de Odontologia de Araraquara. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP- Araraquara/SP.
2008	Aperfeiçoamento em Endodontia – CPO/Uningá – Bauru/SP
2008 - 2010	Especialização em Endodontia – Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – HRAC/USP – Bauru/SP.
2010	Aperfeiçoamento em Endodontia – Associação Paulista dos Cirurgiões-Dentistas (APCD) - BAURU/SP
2009 - 2011	Pós-Graduação, nível de Mestrado em Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração em Endodontia, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo – Bauru/SP.
Associações	SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, Brasil.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Dejair e Maria Teresa, pelo amor incondicional e pela paciência. Vocês são para mim um exemplo de garra, superação e dedicação. Nunca mediram esforços para a minha formação e sempre fizeram o possível e o impossível na minha vida, acreditando e respeitando minhas decisões, e nunca deixando que as dificuldades acabassem com os meus sonhos. Eu sou muito privilegiada e abençoada por Deus por ter me proporcionado nessa vida vocês como meus pais. Vocês são minha luz. Obrigada por tudo, por sempre me amarem e estarem ao meu lado. Amo muito vocês e sou imensamente grata.

“ Pai, Mãe...

Razões da minha vida, minha força, minha inspiração

Luz do meu caminho, que me guia e me dá direção

Abraço que ampara e acalma meu coração...

Vocês são as batidas do meu coração

A letra, melodia da minha canção...”

(Fábio Viana/Renato Barros)

Ao meu noivo, Fernando, por todo o apoio desde o início do mestrado. Nunca hesitou em me ajudar, sendo minha companhia não só nos momentos de alegria, mas também nas madrugadas corrigindo seminários, digitando tabelas, editando fotos e agüentando minhas crises “eu não vou conseguirrrr!” Obrigada por todas as palavras de otimismo, amor, incentivo e principalmente pela paciência. Com certeza minha vida fica mais fácil com você ao meu lado, descomplicando o que eu insisto em complicar. Você é muito especial!! Amo muito você!!

“Eu quero ser ao teu lado
Encontro inesperado
O arrepio de um beijo bom
Eu quero ser sua paz a melodia capaz
De fazer você dançar...

...Eu quero ser pra você
Braços abertos a te envolver
E a cada novo sorriso teu
Serei feliz por amar você...”

(Paula Fernandes)

Ao meu irmão Angelo, pelo exemplo de bondade, honestidade e otimismo. Você é uma alma iluminada que veio nos ensinar o significado da vida e de nossos atos. Muito obrigada pelo amor e amizade. Te admiro muito. Eu te amo para sempre!!!

“Há pessoas que transformam o Sol numa
simples mancha amarela, mas há também as que fazem de uma simples mancha
amarela o próprio Sol” (Picasso).

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Deus

Por guiar meus passos...

Às vezes esqueço de agradecer...

às vezes não sei como agradecer...me faltam palavras.....

Obrigada por tudo...

...pela Vida,

pela Saúde,

pela Família,

pelo Trabalho,

pelos Amigos,

pela Alegria,

pela Natureza...

...enfim... por TUDO !!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu professor e orientador Dr. Clovis Monteiro Bramante. Admiro-te muito desde o nosso primeiro contato na minha graduação, pela sua inteligência, habilidade, bondade e compreensão. Agradeço o ensinamento constante, o entusiasmo diário, a amizade, o carinho e a orientação tranquila. Obrigada pela confiança depositada em mim, e apesar das adversidades nunca deixou de me prestar um apoio incondicional. Obrigada por ter aceitado ser meu orientador, mesmo sabendo desse meu lado tão sensível que chega a dar trabalho. Atrás desse professor sério, existe uma pessoa doce e amiga!

AGRADECIMENTOS

Aos meus sogros, Gerson e Elenice, por terem me acolhido como filha, sempre se preocupando e cuidando de mim. Sou muito feliz e me sinto abençoada por ter vocês na minha vida. Muito Obrigada por todo o apoio e amor. Amo vocês.

Ao meu querido avô Angelo! Apesar da distância, não deixo de pensar em você!

A tia Rô, minha segunda mãe, muito obrigada pelo apoio e amor incondicional! Te amo!

A Letícia, pelo carinho, amizade, amor e pela alegria contagiante. Não vejo minha família sem você.

Aos meus cunhados, Samara, Estevam, Soraya e Fábio pelo amor e carinho que sempre me trataram, obrigada pela amizade. Muito obrigada Estevam pela disponibilidade e ajuda ao longo desses anos.

As minhas primas irmãs, Núria e Nina, pelo carinho e amizade! Mesmo distantes vou sempre amar vocês. Obrigada pelos bons momentos passados.

Sem dúvida, agradeço a todos vocês, minha família, todas as palavras são poucas para expressar o que sinto por todos vocês. Por isso vos dedico uma frase de Fernando Pessoa: *“Amo como ama o amor. Não conheço nenhuma outra razão para amar senão amar. Que queres que te diga, além de que te amo, se o que quero dizer-te é que te amo?”*.

Um agradecimento especial ao Professor Dr. Roberto Brandão. Admiro-te pelo profissionalismo, integridade e doçura dos seus gestos. Muito Obrigada por tudo! Seus ensinamentos na execução da parte cirúrgica e sua grande ajuda na análise morfométrica e fotos, foram fundamentais para a execução desse trabalho.

Ao professor Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte. Sua amizade para mim tem um significado muito importante. Você me estendeu a mão e me reergueu no momento que mais precisei. Sua inteligência e dinamismo são admiráveis. Muito obrigada pela amizade, palavras de carinho, pela confiança depositada em mim. Muito obrigada por tudo.

Ao Professor Dr.IVALDO Gomes de Moraes, pelas palavras de amparo e por ser essa pessoa tão família. Obrigada pelos ensinamentos e orientações ao longo destes anos. Admiro-te.

Ao Professor Dr. Norberti Bernardineli, pelas sempre simpáticas e generosas palavras ao longo destes anos. Obrigada pelos ensinamentos e orientações. Tenho grande admiração por você.

A Professora Dra. Flávia Bombarda Andrade pela amizade. Sua doçura e humildade me encantam. Apesar do pouco tempo de convivência, já aprendi muitas coisas com você. Você é um grande exemplo a ser seguido.

Ao querido amigo Edmauro, pela amabilidade sempre presente, pela amizade, bondade e dedicação. Mesmo passando por momentos difíceis, nunca deixou de sorrir e acolher as pessoas. Obrigada pela amizade e carinho. Te adoro.

A querida Dona Neide, pelos ensinamentos de vida e pela generosidade com os pacientes. Sinto muitas saudades de você.

A querida Suelly, pelas tardes engraçadas que passamos juntas. Sempre de bem com a vida. Muito Obrigada.

Aos amigos do mestrado Aldo, Bruno, Clarissa, Elaine, Marcelo, Marina, Raquel e Thaís, pelo aprendizado, amizade, carinho, atenção, convivência e bons momentos vividos. Em especial ao Bruno, Marina e Raquel pela ajuda na execução da parte prática desse trabalho, e a amiga Clarissa pelo apoio constante.

Ao amigo de doutorado Ronald Ordinola-Zapata. Sua disposição em ajudar e sua grande adoração pela ciência faz de você uma pessoa brilhante. Obrigada pela preocupação e tempo dedicado.

A querida Edninha, pela amizade, lealdade, carinho, conselhos, risadas e tempo dedicado. Adorei muito tê-la em minha vida.

Ao Professor Dr. Celso Kenji, pela oportunidade de realizar o curso de especialização no Centrinho. Obrigada pelos ensinamentos, pela amizade, pelo carinho, pela confiança e compreensão nos anos de convivência. Obrigada pelo apoio na realização do mestrado.

A Professora Dra. Fernanda Gomes de Moraes, um exemplo de disponibilidade e atenção. Obrigada pela amizade e tempo dedicado.

A Professora Dra. Renata Pardini Hussne pela amizade e amabilidade. Você é meu espelho. Sinto saudades.

A todos os professores e funcionários da disciplina de histologia, por toda atenção que recebi e, principalmente, às queridas Dani Santi Ceolin, Pat De Sá Germino e Tânia Mary Cestari pelas orientações, ajuda e tempo dedicado. Vocês foram fundamentais para a execução desse trabalho.

Ao Professor Dr. Gerson Francisco de Assis, pela orientação dada para a avaliação morfométrica das lâminas histológicas deste experimento. Obrigada por sempre estar disposto a esclarecer minhas dúvidas.

Ao Professor Dr. Rumio Taga, por ter aceitado a realização da parte laboratorial deste estudo nas instalações da disciplina de Histologia.

Aos queridos colegas de laboratório Bruna Bighetti e Ricardo Arantes, pelas palavras de apoio e companhia na contagem interminável de células.

Ao meus queridos amigos, Natalino e Mariana pelas palavras de carinho. Sempre estou distante, mas sempre estou pensando em vocês.

A querida amiga Marcela Borgo, uma pessoa linda e cheia de vida.

Ao querido amigo JárCio pela amizade e conselhos.

Ao Professor Dr. Heitor Marques Honório pelo tempo, dedicação e orientações na análise estatística.

Aos funcionários do Biotério da FOB-USP, Luiz Carlos da Silva, Erasmo Gonçalves da Silva, Elias Francisco e Richard Simões, pela disponibilidade, atenção e paciência durante os procedimentos laboratoriais e cuidados com os animais utilizados neste trabalho.

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

A todos os funcionários da FOB-USP que sempre me acolheram com um sorriso no rosto, em especial a D. Cleide pela alegria e amizade.

A todos os funcionários da Biblioteca e Documentação "Prof. Dr. Antônio Gabriel Atta", da FOB-USP, pela ajuda em todo o momento, e em especial ao Salvador pela confiança e disponibilidade.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, através do atual diretor, Prof. Dr. José Carlos Pereira e à Comissão de Pós-Graduação pelo apoio à pesquisa.

Ao CNPq, pelo suporte Financeiro.

RESUMO

O MTA (Agregado Trióxido Mineral) tem sido utilizado na endodontia com diferentes finalidades terapêuticas. Essencialmente ele é constituído pelo cimento Portland acrescido de um radiopacificador. Entre seus componentes, é destacada a presença do arsênico, o qual sofre variação de concentração em função da origem do calcário. A dúvida é que se diferentes concentrações de arsênico representam alguma influência na sua biocompatibilidade. O objetivo deste estudo foi avaliar, microscopicamente, a reação tecidual em subcutâneo de ratos frente a cimentos Portland contendo diferentes concentrações de arsênico. Foram utilizados 36 ratos Wistar albinos, distribuídos em 4 grupos experimentais segundo o material empregado perfazendo um total de 6 implantes por período (15, 30 e 60 dias). A lateral dos tubos serviram como grupo controle. Após 15, 30 e 60 dias, os animais foram mortos e os espécimes foram preparados histotecnica para análise microscópica. Os dados da avaliação morfométrica foram submetidos à análise de variância a dois critérios (ANOVA) e teste de Tukey para a comparação ($p < 0,05$). Os resultados mostraram uma maior densidade de volume de células inflamatórias aos 15 dias, com redução dessa densidade com o passar do tempo para todos os materiais. Os resultados da análise descritiva mostraram inflamação crônica induzida pelos materiais, com intensidade de leve a moderada, e organização de uma cápsula fibrosa ao redor de todos os espécimes e em todos os períodos. Os cimentos analisados produziram respostas inflamatórias semelhantes, mesmo apresentando quantidades diferentes de arsênico na composição, apenas com diferença estatisticamente significativa entre o cimento Portland cinza Votoran e os demais cimentos nos três períodos estudados.

Palavras-chave: Endodontia. Teste de materiais. Agregado trióxido mineral. Arsênico.

ABSTRACT

Microscopic evaluation of the tissue reaction in subcutaneous of rats to Portland cements containing different arsenic concentrations.

The MTA (Mineral Trioxide Aggregate) has been used in Endodontics for different therapeutic purposes. Essentially, it is composed of Portland cement with addition of a radiopacifier. Its components include arsenic, whose concentration is variable according to the origin of the calcareous. There is doubt whether different arsenic concentrations might influence its biocompatibility. This microscopic study evaluated the reaction of subcutaneous tissue of rats to Portland cements containing different arsenic concentrations. The study was conducted on 36 albinus Wistar rats, divided in 12 animals for each study group. Each animal received two implants of polyethylene tubes, completely filled with the test cements, and the lateral aspect of the tubes was taken as control group. The animals were killed after 15, 30 and 60 days and the specimens were submitted to histotechnical preparation for microscopic analysis. Data of the morphometric analysis were submitted to two-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test for comparison ($p < 0.05$). The results evidenced greater density of volume of inflammatory cells at 15 days, which was reduced with time for all materials. The results of this descriptive analysis demonstrated chronic inflammation induced by the materials, of mild to moderate intensity, and organization of a fibrous capsule around all specimens and in all periods. The cements induced similar tissue responses, despite the different arsenic concentrations in their composition.

Key words: Endodontics. Material test. Mineral trioxide aggregate. Arsenic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- MTA Angelus® cinza, embalagem contendo 1 frasco com 1 grama de pó e recipiente plástico com água destilada esterilizada.....	68
Figura 2	- Cimento Portland branco Irajazinho.....	68
Figura 3	- Cimento Portland cinza Minetti.....	68
Figura 4	- Cimento Portland cinza Votoran.....	68
Figura 5	- Região dorsal do rato com tricotomia realizada.	72
Figura 6	- Anti-sepsia da região dorsal com solução de iodopovidona.....	72
Figura 7	- Incisão na região mediana da região dorsal.....	72
Figura 8	- Trocarte introduzido entre o tecido subcutâneo e o tecido muscular, onde foi depositado o tubo de polietileno preenchido com o cimento.	72
Figura 9	- Sutura.....	72
Figura 10	- Remoção do tecido circunjacente aos tubos de polietileno.....	72
Figura 11	- Esquema de casualização dos campos microscópicos.	74
Figura 12	- Graticulo de integração Il Zeis sobre a imagem de um corte histológico.	75
Figura 13	- Estrutura capsular do tubo de polietileno implantado (X2,5).	79
Figura 14A	- Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo MTA Angelus® cinza aos 15 dias (X40).....	83
Figura 14B	- Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo Cimento Portland branco Irajazinho aos 15 dias (X40)	83
Figura 14C	- Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo Cimento Portland cinza Minetti aos 15 dias (X40).....	83

Figura 14D - Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo Cimento Portland cinza Votoran aos 15 dias (X40)	83
Figura 14E - Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo grupo controle aos 15 dias (X40)	83
Figura 15A - Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo MTA Angelus® cinza aos 30 dias (X40).....	87
Figura 15B - Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo Cimento Portland branco Irajazinho aos 30 dias (X40)	87
Figura 15C - Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo Cimento Portland cinza Minetti aos 30 dias (X40).....	87
Figura 15D - Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo Cimento Portland cinza Votoran aos 30 dias (X40)	87
Figura 15E - Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo grupo controle aos 30 dias (X40)	87
Figura 16A - Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo MTA Angelus® cinza aos 60 dias (X40).....	91
Figura 16B - Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo Cimento Portland branco Irajazinho aos 60 dias (X40)	91
Figura 16C - Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo Cimento Portland cinza Minetti aos 60 dias (X40).....	91
Figura 16D - Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo Cimento Portland cinza Votoran aos 60 dias (X40)	91
Figura 16E - Aspectos microscópicos da reação tecidual produzida pelo grupo controle aos 60 dias (X40)	91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Densidade de volume (%) das células inflamatórias presentes no tecido conjuntivo capsular reacional adjacente à superfície dos materiais implantados.....	98
Gráfico 2 - Densidade de volume (%) dos fibroblastos presentes no tecido conjuntivo capsular reacional adjacente à superfície dos materiais implantados	98
Gráfico 3 - Densidade de volume (%) das fibras colágenas presentes no tecido conjuntivo capsular reacional adjacente à superfície dos materiais implantados.....	98
Gráfico 4 - Densidade de volume (%) dos vasos sanguíneos presentes no tecido conjuntivo capsular reacional adjacente à superfície dos materiais implantados.....	99
Gráfico 5 - Densidade de volume (%) do material presente no tecido conjuntivo capsular reacional adjacente à superfície dos materiais implantados	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos, cimentos e períodos experimentais	69
Tabela 2 - Média e desvio padrão da densidade de volume (%) de células inflamatórias, fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos, material e de outras estruturas encontradas no tecido conjuntivo capsular reacional adjacente à superfície dos materiais implantados nos três períodos de avaliação.	94
Tabela 3 - Comparação entre os grupos no período de 15 dias quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria	95
Tabela 4 - Comparação entre os grupos no período de 30 dias quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria	95
Tabela 5 - Comparação entre os grupos no período de 60 dias quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria	96
Tabela 6 - Comparação entre os períodos para o grupo 1 (MTA Angelus® cinza) quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria	96
Tabela 7 - Comparação entre os períodos para o grupo 2 (Cimento Portland Irajazinho branco) quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria	96
Tabela 8 - Comparação entre os períodos para o grupo 3 (Cimento Portland Minetti cinza) quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria	97
Tabela 9 - Comparação entre os períodos para o grupo 4 (Cimento Portland Votoran cinza) quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria	97
Tabela 10 - Comparação entre os períodos para o grupo Controle quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria	97

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

MTA	- Mineral trioxide aggregate
CP	- Cimento Portland
FDA	- Food and Drugs Administration
%	- Porcentagem
®	- Registro
ISO	- International Organization for Standardization
Kg	- quilograma
mg	- Miligrama
mg/Kg	- miligrama por quilograma
µm	- micrometro
mm	- Milímetro
cm	- centímetro
p:	- nível de significância
°C	- grau centígrado ou Celsius
pH	- Potencial hidrogeniônico
FOB	- Faculdade de Odontologia de Bauru
USP	- Universidade de São Paulo
Nº	- Número
CEEPA	- Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais.
X	- Fator de aumento
cm	- centímetro
+	- soma
As	- Arsênico
As III	- Arsênico trivalente
As IV	- Arsênico pentavalente
	- Maior que
DL ₅₀	- Dose letal média
x	- multiplicar
ppm	- Partes por milhão
Ca(OH) ₂	- Hidróxido de Cálcio
h	- hora
Ltda	- Limitada
IRM	- Material restaurador intermediário
PVPI	- Polivinil Pirrolidona iodo
H.E.	- Hematoxilina e eosina
EBA	- Ácido etoxybenzóico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 CAPACIDADE SELADORA.....	34
2.2 BIOCOMPATIBILIDADE.....	37
2.2.1. TESTES <i>IN VITRO</i>	37
2.3 TESTES <i>IN VIVO</i>	42
2.3.1. IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA	42
2.4 USOS CLÍNICOS	49
2.4.1. CAPEADORES PULPARES	49
2.4.2. PERFURAÇÕES	51
2.5 ARSÊNICO.....	53
2.5.1 TOXICIDADE	55
2.5.2 ARSÊNICO NA ENDODONTIA.....	56
3 PROPOSIÇÃO	61
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 MATERIAIS	67
4.1.1. CIMENTOS	67
4.1.2. TUBOS DE POLIETILENO.....	68
4.1.3. ANESTESIA	69
4.1.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS	69
4.2 MÉTODOS	70
4.2.1. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	70
4.2.2. OBTENÇÃO DAS PEÇAS.....	71
4.2.3. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	73
4.2.3.1. ANÁLISE DESCRITIVA.....	73
4.2.3.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA	73
4.2.3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	75

5 RESULTADOS.....	77
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA.....	79
5.2 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA.....	93
6 DISCUSSÃO	101
6.1 DA METODOLOGIA.....	103
6.2 DOS RESULTADOS	105
7 CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS.....	115
ANEXOS	129

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Na Endodontia, para que um material seja considerado ideal, é necessário que possua como propriedades, um bom selamento marginal, insolubilidade frente aos fluidos tissulares, radiopacidade, biocompatibilidade, entre outras. Por muito tempo, em cirurgias parendodônticas, mais precisamente em obturações retrógradas, foram utilizados diversos materiais que não possuíam propriedades físico-químicas e biológicas satisfatórias. Dentre muitos materiais, o amálgama e os cimentos à base de óxido de zinco e eugenol foram os mais utilizados para esse fim até pouco tempo. Com o decorrer dos anos, constatou-se que esses materiais apresentavam algumas desvantagens, tais como infiltração marginal, sensibilidade à umidade e irritante aos tecidos vitais. A partir disso, iniciou-se uma busca incessante por novas técnicas e novos materiais a fim de alcançar os critérios biológicos e colaborar com o processo de reparo dos tecidos periapicais.

Nas cirurgias parendodônticas é necessário considerar o emprego de materiais que sejam biocompatíveis, que não provoquem necrose tecidual e que sejam aceitos pelos tecidos (BERNABÉ; HOLLAND 2004), pois estarão definitivamente em contato com os tecidos periapicais.

Assim, na Universidade de Loma Linda, Califórnia, LEE; MONSEF; TORABINEJAD (1993) desenvolveram um novo cimento denominado Agregado Trióxido Mineral (MTA), com o intuito de selar as comunicações entre o canal radicular e o periodonto. O MTA é composto por partículas hidrofílicas finas de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico e óxido de silicato, que são responsáveis pelas propriedades físicas e químicas, e o óxido de bismuto que lhe confere radiopacidade. (TORABINEJAD et al., 1995c).

Antes de ser lançado comercialmente como ProRoot MTA®, em 1999, pela empresa Dentsply & Tulsa Dental, Tulsa-Oklahoma, EUA, o MTA foi avaliado e aprovado para uso em humanos em 1998 pela U.S. Food and Drugs Administration (FDA). Assim, o MTA passou a ser utilizado em inúmeros procedimentos clínicos, como proteção pulpar direta (ABEDI, 1996; FARACO-JÚNIOR, 2001) pulpotomias (SOARES, 1996; MENEZES et al. 2004), reabsorções internas e externas

(SCHWARTZ et al., 1999, MIN et al., 2007), no tratamento de dentes com rizogênese incompleta (SHABAHANG et al., 1999; SIMON et al. 2007), em dentes com reabsorção apical e lesão periapical (BRAMANTE; BORTOLUZZI; BROON, 2004), no reparo de fraturas dentárias (SCHWARTZ et al., 1999), em obturações dos canais radiculares (HOLLAND et al. 1999c; HOLLAND et al., 2001c), como material retrobturador (TORABINEJAD et al., 1994) e no tratamento de perfurações dentais (ABEDI; INGLE; 1995; PITT FORD et al., 1995; WELDON et al. 2002; FERRIS, BAUMGARTNER, 2004; HARDY 2004, JUÁREZ-BROON 2006), demonstrando resultados satisfatórios.

No entanto, o fabricante mantinha em sigilo sua fórmula. Inúmeras pesquisas começaram a ser desenvolvidas no intuito de descobrir sua composição. Os pesquisadores WUCHERPFENNING; GREEN (1999) relataram que o MTA apresentava similaridade ao cimento Portland tanto macro como microscopicamente, pela análise de difração de raios X, comportamento semelhante em cultura de células osteoblastos MG-63 e formação de dentina reparadora quando utilizados como capeador pulpar direto em dentes de ratos, apresentando dessa forma comportamento biológico similar. ESTRELA et al. (2000), corroboram os achados dos autores acima, concluindo que o MTA e o cimento Portland contém os mesmos elementos químicos, com exceção do óxido de bismuto. Em 2001, HOLLAND et al., analisando tubos de dentina preenchidos com MTA ProRoot®, cimento Portland e hidróxido de cálcio implantados em tecido subcutâneo de ratos, concluíram que os mecanismos de ação dos três materiais eram similares.

Devido à realização de inúmeros estudos pela comunidade científica salientando a semelhança do MTA ao Cimento Portland, a Dentsply/Tulsa, em 2001, revelou a composição do MTA como sendo 75% de cimento Portland, acrescido de 20% de óxido de bismuto e 5% de sulfato de cálcio dihidratado.

Nessas condições, sabendo que a composição do MTA era basicamente o cimento Portland, a empresa Angelus – Soluções em Odontologia, da cidade de Londrina-Paraná, Brasil, em 2001, introduziu no mercado odontológico brasileiro o MTA-Angelus®. Esse cimento possui 80% de cimento Portland e 20% de óxido de bismuto.

Diversos estudos, tanto *in vivo* como *in vitro*, foram realizados comparando o MTA ao cimento Portland, avaliando e verificando reações teciduais similares quando utilizados em dentes de cães nos casos de pulpotomias (HOLLAND et al., 2001b; MENEZES et al., 2004), obturações dos canais radiculares (HOLLAND et al. 2001c), retrobturações (BERNABÉ; HOLLAND, 2004); em tecido subcutâneo de ratos (HOLLAND et al., 2001a; MORAES et al., 2001; TRINDADE; OLIVEIRA; FIGUEIREDO, 2003), quando implantados em mandíbulas de cobaias (SAIDON et al., 2002) e no selamento de perfurações (DE-DEUS et al., 2006; JUÁREZ BROON et al., 2006). Resultados similares também foram encontrados em cultura de células (SAFAVI; NICHOLS 2000; SAIDON et al., 2003; DE-DEUS et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005; SIPERT et al., 2005; RIBEIRO et al., 2006; TANOMARU FILHO et al., 2007).

O cimento Portland origina-se do calcário e argila moídos, e sua fabricação baseia-se em três etapas fundamentais: 1- moagem e mistura da matéria-prima como calcário e aquecimento da mistura a 1400°C em forno rotativo. Esse processo é denominado calcinação e produz mudanças físicas e químicas na matéria-prima; 2- produção do clínquer, pela fusão incipiente do material formando pequenas bolas (clínquer); 3-moagem do clínquer após resfriamento e mistura com gesso (sulfato de cálcio). O sulfato de cálcio é adicionado ao clínquer para retardar o tempo de presa e melhorar as condições de trabalho do material. A produção do clínquer é o núcleo do processo da fabricação do cimento, sendo a etapa mais complexa e crítica em termos de qualidade e custo. As matérias-primas são abundantemente encontradas em jazidas de diversas partes do planeta, sendo de 80% a 95% de calcário, 5% a 20% de argila e pequenas quantidades de minério de ferro. O clínquer é o principal item na composição do cimento Portland, tendo como principais compostos químicos: 45-75% silicato tricálcico, 7-35% silicato dicálcico, 0-13% aluminato tricálcico, 0-18% ferroaluminato tetracálcico. Estes compostos apresentam acentuada característica de ligante hidráulico e estão diretamente relacionados com a resistência mecânica do material após a hidratação.

Entretanto, segundo Hughes (2002), o cimento Portland pode conter alguns metais pesados e contaminantes. Entre esses metais pesados inclui o arsênico, cromo e chumbo que são incorporados no cimento durante a sua produção, a partir da substituição de combustíveis primários por combustíveis alternativos para reduzir

os custos, que normalmente são resíduos, como matéria-prima inorgânica que pode conter diferentes concentrações de metais pesados. Ultimamente, tem havido uma preocupação especial em relação à presença de arsênico nesse material. O arsênico é um metalóide encontrado na água, ar e solo em ambas as formas, orgânica e inorgânica, e em diferentes estágios de oxidação. Os estágios trivalente e pentavalente de oxidação são muito tóxicos. A toxicidade do arsênico atinge o fígado, o rim, sistema nervoso periférico, podendo causar também problemas dermatológicos e desordens digestivas, glandulares, sanguíneas e respiratórias (HUGHES, 2002).

De acordo com as normas da ISO 9917-1, intitulada *cimentos à base de água – Parte 1: pó/líquido cimentos ácido-base* (2003), um material só pode ser utilizado em procedimentos odontológicos, quando não contém mais do que 2 mg de arsênico por Kg do material. DUARTE et al. (2005), avaliaram a liberação de arsênico em dois cimentos Portland cinza, um cimento Portland branco, MTA Angelus® e MTA ProRoot®. Os resultados mostraram que todos os materiais testados apresentaram níveis de arsênico bem abaixo do limite padronizado pela ISO 9917-1. Como esses autores estudaram a liberação, mas não a presença de arsênico na composição do material, não houve resposta se os níveis de arsênico desses materiais estão dentro dos limites padronizados.

BRAMANTE et al. (2008) estudando a presença de arsênico em cimentos à base de MTA (CPM, CPM Sealer, MTA-Obtura, MTA experimental), MTA-Angelus branco, MTA-Angelus cinza, MTA ProRoot, cimento Portland branco e cinza, constataram que a presença de arsênico era superior àquela padronizada, ou seja, acima de 2 mg/Kg em todos os cimentos, exceto para o MTA-Obtura (0.39 mg/Kg), MTA-Angelus branco (1.03 mg/Kg) e o CP branco (0.52mg/KG).

Alega-se que o ProRoot MTA® (Dentsply & Tulsa Dental, Tulsa-Oklahoma, EUA) é fabricado sob condições de limpeza e segrega condições que garante ser livre de contaminantes. Os compostos utilizados na sua fabricação são certificados por sua pureza e ausência de metais pesados. Em relação ao MTA Angelus®, não existem dados sobre sua fabricação (SCHEMBRI et al., 2010). Partindo do pressuposto de que, o cimento Portland é uma opção viável quando comparado ao MTA, devido a sua similaridade físico-química, biológica e seu baixo custo; e que um

dos maiores obstáculos para o seu uso clínico é a presença de metais pesados como o arsênico, e como as normas da ISO especificam somente os limites para o teor de arsênico total e não para o liberado; e levando em consideração a existência de pouquíssimos trabalhos na literatura científica sobre o assunto, é oportuno analisar, microscopicamente, a resposta em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, frente a cimentos Portland contendo diferentes concentrações de arsênico.

2 *REVISÃO DE* *LITERATURA*

2 REVISÃO DE LITERATURA

O êxito de uma cirurgia parendodôntica está diretamente relacionado com a qualidade do selamento apical, bem como das propriedades físico-químicas e biológicas do cimento a ser empregado no retropreparo. Para que um material retrobturador seja considerado ideal, é necessário que ele possua alguns requisitos, como: biocompatibilidade, aderência e adaptação as paredes dentinárias, prevenção à infiltração de microrganismos e seus produtos, insolubilidade frente aos fluídos tissulares, estabilidade dimensional e radiopacidade.

Na Universidade de Loma Linda, LEE; MONSEF; TORABINEJAD (1993) desenvolveram um material, com o intuito de selar as comunicações entre o sistema de canais radiculares e a superfície externa do dente, denominado agregado trióxido mineral (MTA). Os principais componentes presentes no MTA, de acordo com os autores, são o silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico, óxido de silicato e outros óxidos minerais responsáveis pelas propriedades químicas e físicas do agregado. O pó consiste de finas partículas hidrofílicas que tomam presa na presença de umidade. A hidratação desse pó resulta em uma estrutura gel coloidal que se solidifica em um período inferior a quatro horas e apresenta resistência a compressão semelhante ao amálgama. As características desse material dependem do tamanho das partículas, da proporção pó/líquido, temperatura e presença de água.

TORABINEJAD et al. (1995c), utilizando espectrômetro por energia dispersiva de raios X, revelaram que o MTA apresenta duas fases: a primeira, como uma estrutura cristalina composta essencialmente de óxido de cálcio (87% de cálcio e 2,47% de sílica) e a segunda, como uma estrutura amorfa de aparência granular essencialmente de fosfato de cálcio (49% de fosfato, 33% de cálcio, 6% de sílica, 2% de carbono e 2% de cloreto). Em relação ao pH, o MTA apresentou inicialmente, após a manipulação, valor de 10.2 que após 3 horas elevou-se para 12.5. Em relação à radiopacidade, o MTA apresentou valor de 7,17mm do equivalente à espessura de alumínio e tempo de presa longo (2 horas e 45 minutos). Segundo os autores, o material retrobturador deve endurecer tão logo seja inserido na retrocavidade sem apresentar contração significativa. Essa condição permite

estabilidade dimensional do material após sua inserção, e menos tempo de contato entre o material ainda não endurecido e os tecidos vitais. No entanto, quanto mais rápido o material tomar presa, mais ele contrai favorecendo a infiltração. Esse fenômeno pode explicar porque o MTA apresentou significativamente menos infiltração de corantes e de bactérias nos estudos de infiltração. O MTA apresenta resistência a compressão de 40.0 MPa, sendo que após 21 dias esse valor aumenta para 67.3 MPa. Nos resultados desse estudo, o MTA mostrou que possui propriedades físicas adequadas para ser utilizado como material retrobturador.

WUCHERPFENNING; GREEN (1999) mostraram que o MTA possui características e propriedades semelhantes ao cimento Portland (CP) utilizado na construção civil. Ambos são constituídos principalmente por cálcio, fosfato e sílica e mostraram-se idênticos na análise macroscópica, microscópica e na difração por raios X. O MTA e o cimento Portland mostraram biocompatibilidade em cultura de células osteoblastos-like e em contato com tecido pulpar de dentes de ratos. Ambos os materiais permitiram a formação de uma matriz mineralizada e deposição de dentina reparadora. Esses relatos preliminares indicaram a boa aceitabilidade do cimento Portland.

ESTRELA et al. (2000) analisaram a composição química do MTA e cimento Portland por meio da espectrofotometria de fluorescência. Segundo os autores, o cimento Portland é composto de CaO , SiO_2 e numa menor proporção de Al_2O_3 , MgO , SO_3 , Fe_2O_3 , K_2O . Os elementos presentes no MTA são os mesmos do cimento Portland, com exceção do óxido de bismuto presente apenas no MTA. Apesar da semelhança entre ambos, o cimento Portland pode conter algumas impurezas, dependendo de onde o mineral foi extraído, que podem afetar tanto a sua cristalização ou provocar algum tipo de reação.

Após um tempo, o fabricante do MTA ProRoot modificou as informações contidas no MSDS (Material Safety Data Sheet), admitindo que o material apresenta em sua composição, 75% de cimento Portland, 20% de óxido de bismuto e 5% de sulfato de cálcio di-hidratado (BERNABÉ; HOLLAND, 2004). Isto instigou e levou os pesquisadores a realizarem estudos sobre as propriedades físico-químicas e biológicas comparando esses dois materiais.

GUARIENTI; OSINAGA; FIGUEIREDO (2002) também constataram que o cimento Portland possui a mesma estrutura microscópica do MTA, com exceção do óxido de bismuto presente apenas no MTA. Os principais constituintes do MTA foram encontrados no cimento Portland, apenas com pequenas diferenças em suas quantidades, sendo que nas amostras do cimento Portland constatou-se a presença de Molibdênio.

DEAL et al. (2002) encontraram os mesmos elementos químicos, por meio de espectroscopia de energia dispersiva, para o ProRoot®, cimento Portland e um MTA de presa rápida, inclusive a presença do bismuto em diferentes proporções nos três materiais. Também encontraram valores de pH semelhantes entre os três materiais, sendo em torno de 11.7 após a manipulação.

FUNTEAS; WALLACE; FOCHTMAN (2002) não encontraram a presença do óxido de bismuto no Cimento Portland, utilizando espectrômetro por inducibilidade de plasma acoplado. Constataram a presença de 14 elementos químicos tanto para o cimento Portland como para o MTA sem diferença quantitativa.

O MTA é comercializado em duas formas: cinza e branco. Inicialmente foi introduzido no mercado o MTA cinza, mas devido ao seu potencial de manchamento (GLICKMAN, 2000), foi desenvolvida a forma branca, que contém menor quantidade de óxido de ferro, alumínio e magnésio em relação à forma cinza. Esse mesmo fato foi observado por ASGARY et al. (2005) por meio de microanálise eletrônica. Diferenças na concentração de óxido de ferro parecem ser o principal responsável pela variação na cor. Os autores também mostraram por meio de microscopia eletrônica de varredura, que ambas as formas do cimento Portland possuem uma mistura complexa de fases minerais, com partículas visíveis de óxido de bismuto. O tamanho dos cristais observados para o cimento Portland cinza foram maiores do que aquelas observadas para a forma branca.

O MTA cinza é basicamente composto de silicato dicálcico e silicato tricálcico, enquanto o MTA branco é principalmente composto por silicato tricálcico e óxido de bismuto, como relatado por CAMILLERI et al. (2005) por meio de difração de raios X. Na análise por meio de microscópio eletrônico de varredura, os autores constataram para o MTA branco, uma superfície contendo pequenas partículas irregulares, intercaladas com partículas alongadas em forma de agulhas. O MTA cinza

apresentou pequenas partículas intercaladas com partículas maiores e alongadas, e o cimento Portland apresentou superfície similar ao MTA cinza, exceto a ausência de partículas lisas alongadas. Tanto o MTA como o cimento Portland, apresentou superfície lisa, sendo que a presença de cristais foi constatada apenas após a presa desses cimentos. O ProRoot® branco apresentou picos de cálcio, oxigênio, silício e bismuto, enquanto que no cinza, além desses constituintes, observaram picos de ferro e alumínio. Concluíram que entre o ProRoot® cinza e branco as diferenças ocorrem mais com relação a quantidade de ferro e alumínio.

DAMMASCHKE et al. (2005), atribuíram as características mecânicas e biológicas do MTA branco a homogeneidade das partículas e a superfície morfológica do material. Relataram quantidade de enxofre três vezes maior na superfície do MTA endurecido do que na forma de pó. Os autores acreditam que essa camada de enxofre altera o mecanismo de hidratação do MTA, prolongando seu tempo de presa, não sendo uma característica adequada.

ASGARY et al. (2006) não constataram no MTA cinza e branco a presença de fósforo, um dos maiores constituintes citados na formulação original. Constataram pela energia dispersiva de raios X que os maiores componentes como o cálcio, sílica e bismuto, são semelhantes em ambos os materiais. Com relação aos menores elementos como o alumínio, magnésio e particularmente o ferro, estão consideravelmente em menor quantidade no MTA branco, que pode estar relacionado à diferença de cor. Verificaram que o tamanho das partículas do MTA branco foi menor do que as encontradas no MTA cinza.

ISLAN, CHNG, YAP (2006a) compararam os constituintes do MTA ProRoot® cinza, MTA ProRoot® branco, cimento Portland cinza e cimento Portland branco empregando difratômetro de raios X. Observaram que os principais constituintes foram o silicato tricálcico, aluminato tricálcico, silicato de cálcio e aluminoferrita tetracálcico em todos os materiais, com presença adicional de óxido de bismuto no ProRoot® cinza e branco. Concluíram que os quatros cimentos apresentaram constituintes semelhantes, podendo o cimento Portland ser empregado para o desenvolvimento e mudanças no MTA, buscando melhorar suas características físicas e expandir seu campo de aplicação clínica.

SONG et al. (2006) analisaram a composição química e a estrutura cristalina do cimento Portland, MTA ProRoot® cinza, MTA ProRoot® branco, e MTA Angelus® cinza. Empregaram o método de difração por raios X para identificar e caracterizar a fase cristalina, e o método de espectrometria por energia dispersiva de raios X para determinar a composição química dos materiais. Ao exame do pó e do material após a presa, constataram que a estrutura cristalina e a composição química dos dois MTA foram semelhantes, exceto para a presença de ferro no MTA cinza. Ambos foram compostos principalmente de óxido de bismuto e óxido de silicato de cálcio, sendo que o MTA Angelus® apresentou menor quantidade de óxido de bismuto do que o ProRoot® MTA. O cimento Portland apresentou basicamente em sua composição, o óxido de silicato de cálcio e ausência do óxido de bismuto. Não houve diferenças entre o pó e a estrutura cristalina do cimento pós-presa em alguns dos materiais testados. O cimento Portland diferiu do MTA devido à ausência de bismuto e presença de íons potássio. O MTA cinza apresentou consideravelmente maior quantidade de íons ferro em relação ao MTA branco.

OLIVEIRA et al. (2007) verificaram, por meio de espectroscopia de energia dispersiva, que o cimento Portland e o MTA apresentavam componentes similares, exceto para óxido de bismuto presente apenas no MTA ProRoot® e MTA Angelus®. Concluíram que o cimento Portland pode ser um possível material para o uso clínico em substituição ao MTA.

KOMABAYASHI; SPÄNGBERG (2008) avaliaram o tamanho e distribuição das partículas do ProRoot® MTA, MTA Angelus® cinza e branco e cimento Portland por meio de um analisador de partículas. Observaram que o MTA ProRoot® apresentou menor quantidade de partículas grandes em relação ao MTA Angelus®, que por sua vez, contém um maior número de partículas pequenas quando comparado ao ProRoot® MTA. O MTA branco apresentou partículas menores, com uma menor variação de distribuição de tamanho que o MTA cinza.

HWANG et al. (2009), compararam a composição química e a radiopacidade do cimento Portland contendo óxido de bismuto (cimento experimental) com aquelas do cimento Portland e MTA. Para análise da composição química empregaram a microscopia eletrônica de varredura e energia dispersiva de raios X. Os resultados mostraram que os materiais apresentaram constituição similar, sendo que em

relação às partículas, observaram que estas eram maiores e mais irregulares no cimento Portland e no cimento Portland experimental. Concluíram que o cimento experimental pode ser empregado como substituto ao MTA.

ASGARY et al. (2009) avaliaram a composição química e as características superficiais de um novo material, cimento Portland e MTA quando empregados em obturação retrógrada. A maioria dos componentes do MTA e do cimento Portland são os mesmos, com exceção do óxido de bismuto. A maior diferença foi observada em relação ao ferro quando se comparou o MTA cinza e o cimento Portland com o MTA Branco.

2.1 CAPACIDADE SELADORA

O material retrobturador deve propiciar um selamento apical que iniba o ingresso de bactérias e seus subprodutos dos tecidos perirradiculares para o sistema de canais radiculares, sendo de grande importância a qualidade do selamento.

TORABINEJAD; WATSON; PITT FORD (1993) utilizaram a Rodamina B fluorescente (corante) e microscópio confocal para avaliar a capacidade seladora do amálgama, Super EBA e MTA como materiais retrobturadores. A análise dos dados mostrou que o MTA infiltrou significativamente menos e apresentou uma menor tendência ao extravasamento quando comparado ao amálgama e ao Super EBA. Essa superioridade do MTA pode ser explicada por suas características hidrofílicas, em que a umidade ao redor dos tecidos age como um ativador da reação química, não representando um problema a sua utilização em ambientes úmidos. Os autores também observaram que o extravasamento não afetou a capacidade seladora do MTA, pois o pó absorve a umidade ao seu redor, necessitando de uma menor força de condensação, entretanto, deve ser considerada a injúria tecidual do extravasamento durante o reparo.

Clinicamente é inevitável a contaminação do retropreparo e do material retrobturador pela umidade e sangue presentes no meio cirúrgico, podendo influenciar negativamente nas propriedades físicas do cimento empregado, e consequentemente comprometer o selamento marginal, favorecendo dessa maneira

a infiltração. Em um estudo realizado por TORABINEJAD et al. (1994), em que compararam a infiltração marginal, com ausência e presença de sangue em cavidades apicais preenchidas com amálgama, IRM, Super EBA e MTA, mostraram que a presença de sangue ou umidade não afetaram a capacidade seladora do MTA. Entretanto, o IRM, Super EBA e o amálgama falharam no selamento.

TORABINEJAD et al. (1995a) utilizando a técnica de infiltração bacteriana, estudaram o tempo necessário para a penetração da bactéria *Staphylococcus epidermidis* em 3mm de espessura de retrobturações. O amálgama, Super EBA e IRM sofreram infiltração a partir do sexto dia e o MTA não mostrou infiltração durante todo o período experimental (90 dias). Os autores consideraram que a capacidade seladora do MTA é devida a sua natureza hidrofílica e sua ligeira expansão quando da sua presa em ambiente úmido.

Resultados semelhantes foram encontrados por FISCHER; ARENS; MILLER (1998), em que utilizaram a mesma metodologia do estudo anterior, variando apenas os materiais (com exceção do MTA) e a espécie bacteriana (*Serratia marcescens*). Eles relataram a superioridade do MTA quando utilizado como material retrobturador, em relação aos outros materiais, frente à infiltração bacteriana. A análise dos dados indicou que o MTA foi o material mais efetivo contra a penetração de *S. marcescens*.

Utilizando técnica de filtração de fluido, BATES; CARNES; DEL RIO (1996), mensuraram a microinfiltração do MTA, Super EBA e amálgama quando utilizados como materiais retrobturadores em molares humanos extraídos. Eles relataram que o MTA e o Super EBA proporcionaram um melhor selamento em relação ao amálgama durante as duas primeiras semanas, mas subsequentemente não existiu diferenças significantes na infiltração.

NAKATA et al. (1998) avaliaram o comportamento do MTA e do amálgama em perfurações de furca realizadas em molares humanos extraídos, e submetidos ao teste de infiltração bacteriana contendo infusão BHI como cultura para a bactéria *Fusobacterium nucleatum*. Algumas amostras seladas com amálgama infiltraram e não ocorreu infiltração em nenhuma amostra selada com o MTA. O MTA mostrou comportamento significamente superior ao amálgama na prevenção a infiltração do *Fusobacterium nucleatum*.

Utilizando a mesma técnica, WU et al. (1998) estudaram a capacidade de selamento do MTA, amálgama, Super EBA e de dois cimentos de ionômero de vidro (Fuji II and Hi Dense) em raízes de dentes bovinos nos períodos de 24 horas, 3, 6 e 12 meses. Durante os três primeiros meses, a porcentagem de infiltração aumentou notavelmente para o amálgama e para o Super EBA, sendo que após esse período houve redução na infiltração desses materiais. No período de 24 horas, o MTA apresentou maior infiltração em relação aos outros materiais, mas essa infiltração diminuiu com o tempo. Os autores acreditam que essa infiltração inicial do MTA em 24 horas, foi devida a descoloração do corante azul de metileno a 1%, podendo levar a alterações na interpretação dos dados de infiltração

SCHEERER, STEIMAN, COHEN (2001), utilizando a mesma metodologia de TORABINEJAD et al. (1995), variando apenas os materiais (com exceção do MTA) e a espécie bacteriana (*Prevotella nigrescens*), relataram a superioridade do MTA quando utilizado como material retrobturador frente a infiltração bacteriana. O MTA foi o material mais efetivo contra a penetração da *Prevotella nigrescens*. O Super EBA também preveniu a infiltração bacteriana. De acordo com os autores, isso pode ser atribuído ao fato de que a *Prevotella nigrescens* é aproximadamente seis vezes maior do que o *Staphylococcus epidermidis* e *Serratia marcescens*, dificultando sua infiltração.

WELDON et al. (2002) ao compararem a capacidade seladora do MTA e Super EBA em perfurações de furca, e a combinação do MTA no local da perfuração e o Super-EBA sobre o MTA, em molares humanos extraídos, também relataram a superioridade do super-EBA em relação ao MTA no período de 24 horas. A integridade do selamento foi avaliada inicialmente em 30 minutos para o Super EBA e para a combinação dos materiais, e de 4 horas para o MTA. Os autores concluíram que o MTA requer um período mínimo de quatro horas para propiciar um selamento adequado.

A maior infiltração do MTA no período de 24 horas também foi relatado por HARDY et al. (2004), ao compararem por meio de filtração de fluido a capacidade seladora entre o MTA, o adesivo One-Up Bond e a associação de ambos em perfurações de furca de molares humanos extraídos. De acordo com os resultados, as amostras seladas somente com o MTA, infiltraram significativamente mais do que

as seladas com o adesivo e as seladas com a combinação de ambos, sendo que no período de trinta dias, os três materiais apresentaram comportamento semelhante.

Utilizando metodologia semelhante ao estudo de NAKATA et al. 1998, FERRIS; BAUMGARTNER (2004) avaliaram a capacidade do MTA cinza e do MTA branco em selar perfurações de furca, confeccionadas no centro do assoalho de molares humanos extraídos. As avaliações da infiltração bacteriana chegaram aos 60 dias, e os resultados mostraram que não existiu diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos de MTA, na prevenção da infiltração da *Fusobacterium nucleatum*, quando utilizados como seladores de perfuração de furca.

Apesar da facilidade de execução, os estudos de infiltração apresentam uma série de desvantagens, como o tamanho molecular das partículas do corante que é menor quando comparado ao das bactérias; medem o grau de infiltração em um plano tornando impossível avaliar a infiltração total; quando comparado as condições clínicas, esses estudos são estáticos e não refletem a interação dinâmica entre o sistema de canais radiculares e os tecidos periapicais.

2.2 BIOCOMPATIBILIDADE

2.2.1. TESTES *IN VITRO*

Para determinar a biocompatibilidade dos materiais dentários, várias técnicas são sugeridas, entre elas, os testes *in vitro* de citotoxicidade em células. Esse ensaio *in vitro* é um método simples, rápido e barato, que fornece indicações quanto aos materiais que devem ser descartados e quais devem ser submetidos a mais testes. Isso porque, os materiais retrobturadores ficam em íntimo contato com os tecidos perirradiculares e assim, é importante que sejam biocompatíveis.

Um dos testes de citotoxicidade *in vitro* mais utilizado é o da marcação radioativa das células em cultura. Após a morte celular, a liberação dos marcadores radioativos, os quais normalmente se aderem a diversos constituintes protéicos das células, possibilita a quantificação do dano celular provocado pelo material experimental. Outro teste de citotoxicidade frequentemente utilizado é o método do

Filtro de Millipore. Essa metodologia recomenda a utilização de células epiteliais humanas (HeLa) ou de fibroblastos de rato (L929) (COSTA, 2001).

Utilizando esse protocolo, TORABINEJAD et al. (1995), avaliaram *in vitro* a citotoxicidade do MTA, amálgama, Super EBA e IRM em cultura de fibroblastos L929 de camundongos e métodos de cobertura com agar e liberação de radiocromo. A análise estatística revelou diferença significativa entre a toxicidade dos materiais estudados, tanto antes como após a reação de presa em ambas as técnicas empregadas, sendo que na cobertura com agar, o amálgama foi significativamente menos tóxico que os demais materiais testados, ficando o MTA em segundo lugar. Após 24 horas de incubação das células fibroblásticas L929 marcadas com radiocromo, o MTA foi o material menos tóxico, seguido pelo amálgama, Super EBA e IRM.

Outra metodologia para avaliar a citotoxicidade dos materiais odontológicos é baseada na contagem do número de células antes e após contato com os materiais em teste, avaliação do metabolismo celular, o halo de inibição em torno dos corpos de prova e a morfologia das células em microscopia eletrônica de varredura (COSTA, 2001). Utilizando essa metodologia, KOH et al. (1997) investigaram a resposta celular ao MTA, analisando a citomorfologia dos osteoblastos na presença deste material, bem como a produção de citocinas. Os resultados mostraram crescimento celular na superfície do MTA a partir de seis horas, que aumentou até 144 horas, ao contrário do grupo controle (sem MTA) e do outro material estudado (polimetilmetacrilato), que produziram quantidades não detectáveis de células. Os ensaios de ELISA mostraram níveis aumentados de todas as interleucinas (IL-1 α , IL-1 β e IL6) na presença do MTA, enquanto que sem a presença do MTA, produziram um conteúdo insignificante de citocinas. Houve o aumento na produção de osteocalcina na presença do MTA.

As citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular secretadas como resultado de estimulação celular e consideradas extremamente potentes, pois interagem com receptores celulares, modificando a síntese do RNA celular e de proteínas, e também no comportamento celular. As citocinas regulam os aspectos da biologia óssea, incluindo a atividade celular dos osteoclastos e osteoblastos (KOH et al., 1997). As interleucinas (IL) IL-1 α , IL6, IL-8, IL-11 e fator estimulador de

colônia de macrófagos (M-CSF) são as principais citocinas envolvidas na remodelação óssea.

Os resultados da microscopia eletrônica de varredura do estudo de KOH et al. (1998), mostraram que as células em contato com o MTA de um a três dias, apresentaram-se normais com aparência achatada e aderidas ao cimento, indicando biocompatibilidade. As células controle cresceram em confluência, e as células na presença do IRM eram arredondadas e esparsas, indicando toxicidade. O teste ELISA revelou níveis elevados de interleucinas, em todos os períodos de tempo do experimento, na presença do MTA. Em contraste, quando as células cresceram na ausência do MTA e na presença do IRM, os níveis de interleucinas foram indetectáveis. Os autores concluíram que o MTA age como um substrato biológico para as células ósseas, e estimula a produção de interleucinas.

O MTA também não mostrou ser tóxico no estudo desenvolvido por OSORIO et al. (1998), também utilizando cultura de fibroblastos L929 de camundongos e fibroblastos gengivais humanos, para avaliarem a citotoxicidade de alguns materiais obturadores e, de materiais utilizados em obturações retrógradas, como o amálgama, o MTA, Super EBA, Gallium GF2 e Ketac Silver. O amálgama, Super EBA e o Ketac Silver mostraram elevada toxicidade.

O fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) apresenta importante função no desenvolvimento e na maturação dos osteoclastos para locais de reabsorção, e é secretado por osteoblastos saudáveis, e não requer a ativação de osteoblastos ao contrário de outras citocinas estudadas (MITCHELL et al. 1999).

MITCHELL et al. (1999) utilizando metodologia semelhante a de KOH et al. (1997, 1998), avaliaram a biocompatibilidade do MTA, de três materiais utilizados como enxerto ósseo sintético e do cimento de hidróxido de cálcio (Dycal), variando apenas o tipo celular (células de osteossarcoma MG-63, que possuem propriedades fisiológicas e adesivas semelhantes as dos osteoblastos). Os resultados mostraram adequado crescimento celular sobre as variações do MTA, com muitas áreas completamente recobertas por células após o período de 2 dias. A expressão da IL-6 advinda das células foi apenas evidente na presença do MTA e de um dos materiais de enxerto ósseo, e a IL-8 foi expressa em altas concentrações somente na presença do MTA. Não houve expressão de IL-1 α e IL-11 em nenhum material, e a

produção de M-CSF foi alta para todos os materiais. Os autores ressaltam que é incerto o processo pelo qual os osteoblastos são ativados pelo MTA. A solubilidade do MTA é mínima, mas pode ser possível que ocorra alguma pequena diluição do material e, conseqüentemente, estímulo dos osteoblastos na síntese de IL-6 e IL-8. Outra possibilidade é que a microestrutura cristalina do MTA possa fornecer o estímulo necessário para a adesão celular, crescimento e expressão das citocinas. Concluíram que as variações do MTA são biocompatíveis e apropriadas para muitas aplicações odontológicas, onde existe contato entre o material e os tecidos vivos.

Resultados contrários ao de TORABINEJAD et al. (1995) foram encontrados por KEISER; JOHNSON; TIPTON (2000), ao avaliarem a citotoxicidade do MTA, amálgama e Super EBA em cultura de células de fibroblastos, obtidos a partir do ligamento periodontal de terceiros molares extraídos. No grupo dos materiais recém-manipulados, o MTA mostrou-se menos tóxico e o amálgama o mais tóxico. No grupo dos materiais utilizados após 24 horas de manipulação, o amálgama apresentou-se menos tóxico e o MTA ficou em segundo lugar.

A adesão, difusão, propagação ou expansão de células sobre a superfície de um material representa a fase inicial da função celular. A persistência de células circulares ou arredondadas com pouca ou nenhuma difusão sugere que a superfície do material pode ser tóxica. ZHU et al. (2000), também observaram por meio de microscopia eletrônica de varredura, crescimento celular favorável sobre o MTA em comparação ao IRM e o amálgama. Os osteoblastos fixaram-se e propagaram-se sobre o MTA formando uma monocamada de células.

CAICEDO; BECERRA, BONILLA (2000) avaliaram os efeitos citotóxicos pela viabilidade celular por meio de microscópio de luz, e as mudanças na morfologia celular VERO 76® por meio de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), do MTA ProRoot® e outros materiais à base de hidróxido de cálcio. Após os períodos de observação, os resultados mostraram marcante citotoxicidade para o ProRoot® MTA e para a pasta Calasept®. O ProRoot® apresentou aumento da confluência celular em cada período observado.

O MTA também apresenta a capacidade de produzir matriz mineralizada pelos cementoblastos (THOMSON et al., 2001). Nesse estudo, o MTA foi preparado e colocado em contato com os cementoblastos pelos períodos de 7 e 12 dias. Para

detectar a expressão de osteocalcina utilizou-se microscópio confocal e anticorpos policlonais específicos para essa proteína. Os resultados mostraram que em ambos os períodos houve a formação de osteocalcina.

Seguindo a mesma metodologia de KOH et al. (1997, 1998), variando apenas o tipo celular (M-CSF), HAGLUND et al. (2003), relataram que o MTA causou lise celular e desnaturação de proteínas quando recém-manipulado e durante a reação de presa. Segundo os autores, isso ocorre devido ao seu pH alcalino logo no início da sua manipulação. Após tomado presa, o MTA mostrou biocompatibilidade, sem nenhum efeito na morfologia celular e impacto limitado no crescimento celular. Em contraste aos estudos dos autores citados acima, não houve efeito dos materiais retrobturadores (MTA, IRM, Amálgama e Retroblast) na liberação de citocinas. Os autores acreditam que essa diferença possa ser devido ao tipo celular utilizado em cada estudo.

A biocompatibilidade do MTA também foi relatada no estudo de KOULAOUZIDOU et al. (2005) ao analisarem o seu efeito antiproliferativo em comparação a outros materiais, utilizando três diferentes culturas de células nos períodos de 12, 24 e 48 horas. O efeito antiproliferativo do MTA foi maior após 48 horas do que após 24 horas de exposição nos meios de cultura, indicando um prolongado efeito tempo-dependente do MTA.

2.3 TESTES *IN VIVO*

2.3.1. IMPLANTAÇÃO SUBCUTÂNEA

A avaliação do potencial citotóxico dos materiais utilizados no tratamento dos canais radiculares é bastante oportuna, pois alguns deles podem causar injúria tecidual impedindo ou mesmo retardando o processo de reparo. Dos cinco testes “secundários” atualmente recomendados (irritação da membrana mucosa, toxicidade dérmica por exposição repetida, implantação subcutânea, implantação em tecido ósseo e sensibilização) para a avaliação das propriedades biológicas dos materiais, o teste de implantação dos materiais em tecido conjuntivo subcutâneo de animais é o mais amplamente utilizado.

TORNECK (1966) foi o primeiro pesquisador a introduzir tubos de polietileno em pesquisas de implantação subcutânea. Ele avaliou a reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos frente à implantação de tubos de polietileno, relacionando a reação do tecido com o diâmetro e o comprimento dos tubos. Os resultados mostraram a formação de uma cápsula fibrosa envolvendo os implantes, rica em fibroblastos e fibras colágenas. Segundo o autor, a ausência de inflamação no tecido conjuntivo capsular indica a aceitabilidade do material, um dos objetivos do teste. O diâmetro e o comprimento do tubo parecem influenciar no reparo.

Ao implantar tubos de polietileno vazios de diferentes diâmetros e comprimentos, PHILLIPS (1967) constatou a formação, ao redor dos tubos, de uma cápsula fibrosa rica em fibroblastos e fibras colágenas, pequena reação inflamatória com poucas células plasmáticas e monócitos nas extremidades dos tubos. Verificou também uma maior invaginação de tecido conjuntivo nos tubos menores e de maior diâmetro.

No mesmo ano, TORNECK (1967), utilizou tubos de polietileno de vários comprimentos e diâmetros, contendo fragmentos de músculos contaminados, e comparou com a reação de tubos de polietileno com os mesmos fragmentos musculares, porém esterilizados. Os resultados indicaram que o prognóstico do reparo, foi menos favorável frente ao lume preenchido com os debris musculares

contaminados. O reparo dos tubos preenchidos contaminados ou não foi menos favorável do que quando o tubo estava esterilizado.

LANGELAND et al. (1969), ao estudarem métodos para avaliar as respostas biológicas frente aos materiais endodônticos, concluíram que o teste de implantação em tecido conjuntivo apresentaram um valor limitado, devido à impossibilidade de avaliá-lo na dentina e osso alveolar. Sugeriram que o teste da implantação deve ser apenas de caráter preliminar e de curta duração, e que os testes em dentes devem ser realizados para avaliações decisivas.

OLSSON; SLIWKOWSKI; LANGELAND (1981) avaliaram a biocompatibilidade de vários materiais endodônticos, a fim de enquadrá-los em níveis de toxicidade. Utilizaram tubos de teflon preenchidos com os materiais em teste. A localização do material, o estado dos tecidos nas extremidades do tubo, a ocorrência e a localização de tecido necrótico e fibroso, os tipos de células inflamatórias e as trocas vasculares foram observadas e registradas. A reação tecidual foi classificada como suave, moderada e severa. Os autores concluíram que o teste foi válido e adequado para a avaliação qualitativa dos materiais endodônticos, porém a classificação de biocompatibilidade dos materiais só pode ser considerada entre os materiais com grande diferença de toxicidade.

ZANONI et al. (1988), compararam a resposta do tecido subcutâneo de ratos, frente ao implante de tubos de polietileno e de dentina preenchidos com cimento obturador. Os resultados mostraram que os tubos de dentina de menor espaço vazio apresentaram melhor evolução por colagenização.

HOLLAND et al. (1999a) estudaram em tecido subcutâneo de ratos, tubos de dentina preenchidos com MTA cinza e hidróxido de cálcio quimicamente puro, nos períodos de sete e trinta dias. Os resultados mostraram que os dois materiais testados apresentaram formação de tecido mineralizado e mecanismo de ação semelhante. No período de sete dias, os materiais apresentaram numerosas granulações birrefringentes à luz polarizada, indicativo de tecido mineralizado. Adjacente a essas granulações, observaram tecido conjuntivo com reação inflamatória, sendo de leve a moderada no grupo do Ca(OH)_2 e leve no grupo do MTA. Aos 30 dias, o processo inflamatório apresentou-se leve para ambos os grupos.

O MTA e o Super EBA foram considerados materiais biocompatíveis, osteocondutores e não osteoindutores por MORETTON et al. (2000). Os resultados mostraram que, os implantes subcutâneos de MTA induziram reação inflamatória inicialmente severa, com infiltrado inflamatório predominantemente macrofágico e linfocitário, que se amenizaram a partir dos trinta dias. Para o Super EBA foi observado processo inflamatório, que se tornou discreto a partir dos trinta dias. Não ocorreu osteogênese para ambos os materiais nos implantes subcutâneos, indicando que os materiais não foram osteoindutores. As reações teciduais aos implantes intraósseos, para ambos os materiais, foram menos intensas do que para os implantes subcutâneos. Ocorreu osteogênese associada a esses implantes intraósseos, indicando que ambos os materiais são osteocondutores.

O primeiro estudo a avaliar a reação tecidual do cimento Portland em subcutâneo de ratos, foi realizado por HOLLAND et al. (2001). Eles utilizaram tubos de dentina preenchidos com hidróxido de cálcio, MTA e cimento Portland. Após sete dias, os três materiais provocaram uma inflamação de leve a moderada, que aos trinta dias foi considerada discreta com a presença de algumas células gigantes. Os resultados observados com o MTA e cimento Portland foram similares ao hidróxido de cálcio nos dois períodos, com a presença de granulações positivas para Von kossa e birrefringentes para luz polarizada, embora em menor quantidade em relação ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Diante dos resultados, os autores concluíram que o mecanismo de ação desses três materiais são semelhantes, embora o MTA e o cimento Portland não apresentem hidróxido de cálcio em suas composições, mas possuem óxido de cálcio que ao reagir com o fluido tecidual produz o hidróxido de cálcio.

HOLLAND et al. (2002) utilizando a mesma metodologia de Holland et al. (1999a), avaliaram a resposta tecidual do MTA ProRoot® branco, concluindo que o MTA branco e o MTA cinza apresentam mecanismo de ação similar.

A reação do tecido conjuntivo subcutâneo frente ao MTA e ao amálgama foi avaliada por YALTIRIK et al. (2004) nos períodos de 7, 15, 30, 60 e 90 dias. O MTA apresentou a partir do período de trinta dias, fina cápsula fibrosa e áreas de calcificação distrófica. Aos noventa dias o processo inflamatório estava ausente e havia áreas de calcificação, mostrando a biocompatibilidade do MTA. O amálgama,

ao contrário do MTA, não apresentou áreas necróticas e focos de calcificação, indicativo da não indução de tecido mineralizado por esse material.

KOWALSKI et al., em 2004, realizaram um estudo semelhante ao anteriormente citado. Analisaram a resposta tecidual do tecido subcutâneo de ratos frente a implantes de tubos de polietileno preenchidos com MTA. O MTA Ângelus® e o MTA ProRoot® apresentaram resultados semelhantes nos períodos de 7 e 60 dias. A reação inflamatória apresentou-se leve no período de 7 dias e ausente no período mais longo. Houve presença abundante de fibras colágenas em ambos os materiais, demonstrando que ambas as marcas comerciais de MTA induzem reação tecidual semelhante e satisfatória.

SHAHI et al. (2006), encontraram diferenças na biocompatibilidade do MTA branco, MTA cinza e o amálgama. Após os períodos de 3 e 7 dias, o amálgama produziu uma resposta inflamatória severa quando comparada aos dois tipos de MTA. Após o período de 3 dias, a resposta inflamatória ao redor dos tubos contendo MTA cinza foi mais severa do que ao do MTA branco, mas após uma semana a situação inverteu-se. Os autores acreditam que o aumento na severidade da inflamação ao redor do MTA branco, pode indicar uma liberação gradual de hidróxido de cálcio pelo contato do material com a umidade ao redor. Já para o MTA cinza, a indução do processo inflamatório apresentou-se diferente, que segundo os autores, pode ser atribuída a diferença na composição e reação química entre esses dois tipos de materiais. O óxido de ferro presente no MTA cinza pode induzir uma reação inflamatória nos três primeiros dias, diminuindo após uma semana a quantidade desse óxido e, conseqüentemente, a reação inflamatória. Por fim, os autores sugeriram mais pesquisas para respaldar essas teorias.

MORAIS et al. (2006) avaliaram a biocompatibilidade do MTA ProRoot® e do Cimento Portland acrescido de 20% do radiopacificador Iodofórmio. Após uma semana, os espécimes do grupo CP+Iodofórmio apresentaram menor reação inflamatória em comparação ao MTA, levando os autores a acreditarem que a incorporação do iodofórmio pode ser a razão para isso. Após trinta dias, o MTA apresentou áreas basofílicas sugestivas de calcificação distrófica, e no período de 60 dias verificou-se a persistência de reação inflamatória moderada para o MTA e para o CP, porém para esse último, a cápsula fibrosa mostrou-se mais organizada.

As reações do MTA no estudo SUMER et al. (2006) foram semelhantes aos estudos de MORETTON et al. (2000) e YALTIRIK et al. (2004). Inicialmente, o MTA ocasionou uma resposta inflamatória severa, que diminuiu nos períodos de trinta e sessenta dias. Segundo os autores, essa inflamação inicialmente severa pode ser atribuída a vários fatores como alto pH, alta temperatura durante a presa e a produção de citocinas inflamatórias. Os materiais amálgama, IRM, MTA e MTA + clorexidina, exibiram processo inflamatório leve nos períodos de 30 e 60 dias, caracterizado pela formação de cápsula fibrosa ao redor dos tubos contendo os materiais, indicando que eles foram bem tolerados. Embora a adição da clorexidina tenha reforçado significativamente a eficácia antimicrobiana do MTA e mostrou-se biocompatível, os autores pontuam quanto à necessidade de mais pesquisas antes da introdução na prática clínica.

Não houve diferenças significantes no grau de inflamação entre o MTA branco e cinza no estudo de VOSOUGHHOSSEINI et al. (2008). Os materiais exibiram reação inflamatória severa no período de 7 dias, sendo que nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias o processo inflamatório apresentou-se leve. De acordo com os autores, a resposta inflamatória severa inicial, tanto do MTA branco como do cinza, pode ser causada pela produção do hidróxido de cálcio como produto da reação do MTA com a água. Posteriormente, o hidróxido de cálcio reagiria com o fluido tecidual produzindo cristais de hidroxiapatita cobrindo a superfície do MTA, diminuindo dessa maneira a inflamação. Esse estudo mostrou que ambos os tipos de MTA produzem resposta inflamatória similar a curto e longo prazo.

COUTINHO-FILHO et al. (2008) não encontraram diferenças na reação tecidual entre o MTA, Cimento Portland e Cimento Portland + Óxido de bismuto. Ocorreu resposta inflamatória aguda no período de 7 dias para todos os materiais e para o grupo controle (tubo vazio), sugerindo que a reação inflamatória inicial resultou do procedimento cirúrgico. No período de 60 dias, os eventos celulares e resposta inflamatória foram similares para todos os materiais, e a adição do óxido de bismuto não interferiu na biocompatibilidade do cimento Portland.

O cimento Endo CPM Sealer® é composto por 50% de MTA. GOMES FILHO et al. (2009a) avaliaram a resposta desse cimento, do MTA Angelus® e Sealapex® em subcutâneo de ratos. Eles observaram que a reação inflamatória foi moderada

para esses materiais sem diferenças significantes entre os grupos no período de 7 dias. O MTA Angelus® apresentou aos 15, 30, 60 e 90 dias, infiltrado inflamatório leve com formação de uma fina cápsula fibrosa. Os resultados observados com o Endo CPM Sealer foram similares ao MTA Angelus®. O Sealapex apresentou infiltrado inflamatório crônico até os 30 dias, sendo que nos períodos de 60 e 90 dias não houve diferenças significantes entre os grupos. Os grupos do MTA Angelus® e Endo CPM® exibiram áreas Von Kossa positiva e estruturas birrefringentes mostrando que esses materiais estimularam a formação de tecido mineralizado em tecido subcutâneo de rato via carbonato de cálcio pela reação entre o óxido de cálcio presente nos materiais e o dióxido de carbono dos tecidos adjacentes.

Buscando melhorar as propriedades físicas do MTA, foi desenvolvido o CER (cimento endodôntico rápido) composto por cimento Portland, sulfato de bário e um emulsificador. Avaliando suas propriedades biológicas em subcutâneo de ratos, GOMES FILHO et al. (2009b) encontraram resultados semelhantes entre esse cimento e o MTA. Ambos os materiais apresentaram infiltrado inflamatório crônico moderado em 7 dias, sendo que aos 30 e 60 dias houve redução da intensidade inflamatória. Foi observada a presença de uma fina cápsula fibrosa, áreas Von Kossa positivo e áreas birrefringentes sob luz polarizada, mostrando que esses materiais estimulam a formação de tecido mineralizado.

CINTRA et al. (2010) avaliaram a reação tecidual do MTA ProRoot® em tecido subcutâneo e alveolar de ratos. No período de 7 dias, constataram uma camada superficial de espessura irregular e necrose por coagulação em ambos os sítios de implantação. Aos 30 dias, o tecido subcutâneo apresentou tecido de granulação bem organizado, mostrando infiltrado inflamatório leve, com presença de fibroblastos jovens e poucos macrófagos e linfócitos. Nos alvéolos, os autores observaram áreas basofílicas irregulares subjacentes ao material, sugerindo que com o decorrer do tempo o local pode tornar-se uma matriz para a mineralização.

Assim como nos estudos de YALTIRIK et al. (2004), SHAHI et al. (2006) e VOSOUGHHOSSEINI et al. (2008), SHAHI et al. (2010) encontraram infiltrado inflamatório crônico classificado como severo para o MTA branco, MTA cinza, cimento Portland branco e cimento Portland cinza nos períodos de 7 e 15 dias, ocorrendo uma redução da resposta inflamatória com o passar do tempo. A partir do

período de 30 dias, observou-se ausência de células inflamatórias para os dois tipos de MTA. Para o cimento Portland branco, ocorreu um aumento na intensidade inflamatória no intervalo de 60 dias, sendo o mesmo observado para o cimento Portland cinza no período de 90 dias. Os autores acreditam que esse fenômeno pode ser atribuído a diferenças na superfície química entre o MTA ProRoot® e o cimento Portland após a reação de presa. O ProRoot®, após a presa, apresenta baixo conteúdo de potássio e enxofre e alto conteúdo de cálcio na sua superfície, quando comparado aos diferentes tipos de cimento Portland. Outro fator é a presença do arsênico e chumbo no gesso utilizado no processamento do cimento. Assim, os autores concluíram que os dois tipos de MTA foram mais biocompatíveis do que os cimentos Portland branco e cinza, e sugeriram a necessidade de mais estudos entre os materiais.

SCARPARO et al. (2010) encontraram resultados semelhantes a GOMES FILHO et al. (2009) ao avaliarem as reações teciduais do MTA, Endo CPM® e AH Plus®. Esses materiais apresentaram propriedades biológicas superiores ao AH Plus®, formação de cápsula fibrosa e a presença de poucas células inflamatórias. A presença marcante de células gigantes multinucleadas inicialmente para esses dois materiais reduziram com o tempo. O cimento AH Plus® apresentou infiltrado inflamatório crônico intenso após o período de 30 dias.

REYES-CARMONA et al. (2010) investigaram a sinalização molecular no processo inflamatório e a capacidade de biomineralização do MTA ProRoot®. O MTA induziu a liberação de citocinas pró-inflamatórias e ambiente de reparo. O processo de biomineralização ocorreu simultaneamente com a resposta inflamatória aguda. Os autores sugeriram que quando o MTA é implantado, uma série de fatores bioquímicos e reações biofísicas ocorre na interface dentina-MTA-tecido. Subsequentemente, isso ativa os eventos celulares e teciduais no processo inflamatório e de biomineralização, e culmina na formação de uma camada de apatita-like, que permite a integração do biomaterial no meio.

PARIROKH et al. (2011) analisaram a reposta do MTA branco, MTA cinza e um novo cimento endodôntico denominado CEM em subcutâneo de rato. Aos 7 dias, os autores não encontraram diferenças na extensão e severidade do processo inflamatório entre os materiais. No período de 30 dias, dos três materiais testados, o

CEM apresentou fina cápsula fibrosa e o MTA cinza apresentou menor reação inflamatória. Aos 60 dias, não houve diferenças entre os materiais em relação à espessura da cápsula fibrosa e severidade da inflamação. Necrose e calcificação distrófica foram observadas nas amostras dos dois tipos de MTA. Os autores sugeriram que a necrose ocorre como uma reação inicial ao alto pH do material recém manipulado, a alta temperatura durante a reação de presa e a produção de citocinas.

O MTA cinza apresentou processo inflamatório de moderado a severo, com presença de reação de corpo estranho e leve necrose por liquefação no estudo de HAMMAD et al. (2011). Entretanto, a intensidade da inflamação tornou-se leve após 30 dias, e no período de 60 dias o quadro de necrose estava ausente.

2.4 USOS CLÍNICOS

Desde a sua introdução na endodontia e graças aos bons resultados nos testes de propriedades físicas, químicas e biológicas, o MTA passou a ser empregado em diferentes situações clínicas a saber:

2.4.1. CAPEADORES PULPARES

PITT FORD et al. (1996), compararam a resposta da polpa dental de macacos frente ao capeamento pulpar direto realizado com MTA e Dycal (hidróxido de cálcio). As cavidades do grupo do Dycal foram restauradas com amálgama, e as cavidades do grupo do MTA foram totalmente preenchidas por esse material. Os resultados mostraram a formação de ponte de dentina espessa adjacente ao material, com túbulos dentinários e ausência de inclusão de tecidos moles em todos os espécimes capeados com MTA, sendo que somente em um caso, inflamação pulpar foi observada. Em contraste, a maioria das polpas capeadas com Dycal apresentava inflamação severa. Os autores acreditam que essa ocorrência deve-se, provavelmente, à infiltração na interface amálgama/dente levando a diluição do Dycal. O comportamento satisfatório do MTA quando utilizado como capeador pulpar direto, é provavelmente resultado de suas propriedades físico-químicas adequadas,

como a sua lenta reação de presa que faz com que a sua contração seja pequena e pela solubilidade que é praticamente nula.

ABEDI et al. (1996) também encontraram maior formação de ponte de tecido mineralizado e menor taxa de infiltração no grupo do MTA comparado ao grupo do hidróxido de cálcio, quando utilizados como capeadores pulparem em dentes de cães e macacos.

Em contraste com os estudos anteriores, MYERS et al. (1996), não encontraram diferenças significantes entre o MTA e o Dycal em capeamentos pulparem diretos em dentes de cães de acordo com os critérios adotados. Os autores concluíram que tanto o MTA como o Dycal apresentaram bom desempenho como materiais capeadores, foram biocompatíveis ao tecido pulpar e estimularam a deposição de dentina nas pequenas exposições.

SOARES (1996), também não encontrou diferenças significantes entre o MTA e hidróxido de cálcio em pulpotomias realizadas em dentes de cães. A autora observou formação de barreira de tecido mineralizado em 91,66% dos dentes tratados com hidróxido de cálcio e em 96,43% dos casos em que o MTA foi utilizado.

JUNN et al., (1998) avaliaram a quantidade de dentina formada ao realizarem capeamentos pulparem diretos com MTA e hidróxido de cálcio em dentes de cães. As polpas capeadas com MTA exibiram menor inflamação e formação de ponte de dentina na maior parte dos espécimes quando comparado ao grupo do hidróxido de cálcio.

FARACO JÚNIOR; HOLLAND (2001) ao analisarem histomorfologicamente a resposta da polpa de dentes de cães submetida ao capeamento com MTA e cimento de hidróxido de cálcio (Dycal) concluíram que o MTA foi superior ao cimento de hidróxido de cálcio como capeador pulpar, acreditando que isso provavelmente seja devido às boas propriedades do MTA como sua capacidade seladora, biocompatibilidade, alcalinidade, entre outras. Todos os espécimes capeados com MTA mostraram formação de pontes de tecido mineralizado do tipo tubular e ausência de infiltrado inflamatório e microorganismos. Com o Dycal, foram constatadas pontes de tecido mineralizado em uma pequena quantia dos

espécimes, sendo que a maioria dos espécimes apresentou processo inflamatório crônico.

AEINEHCHI et al. (2003), embasados cientificamente nos resultados satisfatórios do MTA quando utilizado como capeador pulpar em animais, compararam o MTA (ProRoot®) e o hidróxido de cálcio (Dycal®) no capeamento pulpar em terceiros molares de humanos. Os resultados mostraram menor taxa de infiltração, hiperemia e necrose, como também maior espessura da ponte de dentina e maior frequência de formação de camada odontoblástica com o MTA do que com o hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que o MTA foi superior ao hidróxido de cálcio como capeador de polpas de dentes de humanos e sugeriram que pesquisas com maior número de amostras e maior tempo de controle devem ser realizadas.

MENEZES et al. (2004) avaliaram a resposta da polpa de dentes de cães após pulpotomia e proteção pulpar direta com MTA Ângelus®, MTA ProRoot®, e dois cimentos Portland. Os resultados mostraram que os quatro materiais testados provocaram reações teciduais semelhantes, como a manutenção da vitalidade pulpar e formação de ponte de tecido mineralizado.

2.4.2. PERFURAÇÕES

As perfurações são a segunda maior causa de fracasso endodôntico e representam 9,6% de todos os casos de insucesso (Ingle 1961). Quando o diagnóstico e o tratamento não são corretos, perfurações de furca constituem complicações do tratamento endodôntico, resultando em problemas periodontais com possível perda do elemento dental. A adaptação do material utilizado à cavidade da perfuração é fator importante para o sucesso, uma vez que seu extravasamento pode levar ao prejuízo no reparo de tecidos periodontais adjacentes. Estudos experimentais do tratamento de perfurações de furca produziram resultados decepcionantes com a utilização de materiais como o amálgama, Cavit, guta-percha, hidroxiapatita entre outros (EL DEEB et al., 1982).

HONG et al. (1994) e PITT FORD et al. (1995) avaliaram a resposta biológica do tecido perirradicular de perfurações de furca intencionais, em pré-molares de cães seladas com MTA e amálgama, e observaram resposta favorável ao selamento

com o MTA. Para o estudo, ambos utilizaram a mesma metodologia, apenas variando o tamanho da amostra e o período de execução. Metade dos dentes foi selada imediatamente com MTA e amálgama, e na outra metade, as perfurações foram contaminadas com saliva e mantidas abertas ao meio bucal por semanas, para posteriormente serem seladas com amálgama e MTA. Os resultados em ambos os trabalhos mostraram que o grupo imediatamente selado com o amálgama apresentou inflamação de moderada a severa, enquanto que no grupo do MTA os espécimes foram livres de inflamação, sendo que no estudo de Pitt Ford et al., ocorreu a neoformação de cemento em torno do excesso do material em cinco de seis dentes selados com MTA. Todas as perfurações contaminadas e seladas com o amálgama mostraram áreas de inflamação severa. Os autores concluíram que o MTA foi mais conveniente que o amálgama para o reparo das perfurações, principalmente quando estas foram seladas imediatamente.

Seguindo o mesmo modelo de estudo, HOLLAND et al. (2001d) estudaram o processo de cicatrização após 30 e 180 dias em perfurações laterais de furca seladas com MTA e Sealapex®. As perfurações seladas com o MTA não apresentaram inflamação e houve deposição de cemento sobre o material na maioria dos espécimes. Os espécimes selados com Sealapex® exibiram inflamação crônica e deposição de cemento somente em três casos. Houve 7 casos de sobreobturação com o MTA e quinze com o Sealapex®. De acordo com os autores, o menor número de sobreobturação com o MTA pode estar relacionado com sua maior resistência ao escoamento em relação ao Sealapex®. Considerando que os melhores resultados foram obtidos quando não houve a sobreobturação, salientaram a importância de se utilizar procedimentos que mantenham o material no local adequado. Os autores concluíram que o MTA exibiu melhores resultados do que o Sealapex®.

YILDIRIM et al. (2005) investigaram a resposta histológica frente ao MTA e Super EBA em perfurações de furca em pré-molares e molares de dentes de cães. Relataram que o MTA apresentou menor processo inflamatório do que o Super EBA, sendo que para o grupo do MTA foi visto no primeiro mês uma inflamação suave, que diminuiu aos 3 meses, não sendo detectada aos 6 meses. Observaram também, ao final de 6 meses, que todos os espécimes mostraram neoformação cementária. Para o Super EBA, os espécimes apresentaram inicialmente processo

inflamatório moderado, tornando-se severo em alguns espécimes ao final dos seis meses. Nos espécimes em que não houve inflamação, foi observado reparo com tecido conjuntivo. Os autores concluíram que o MTA é um material biocompatível tendo boa indicação para perfurações de furca.

Resultados similares aos relatados por PITT FORD et al. (1995) foram encontrados por HOLLAND et al. (2007) ao avaliarem o processo de reparo em perfurações laterais contaminadas e não contaminadas seladas com MTA. As perfurações laterais contaminadas e seladas apresentaram o pior reparo, sendo que as perfurações não contaminadas mostraram melhor reparo, exibindo selamento parcial ou completo de tecido mineralizado. Eles também avaliaram perfurações contaminadas e preenchidas com hidróxido de cálcio por 14 dias e posteriormente seladas com MTA. Observaram que nesse grupo, o selamento temporário com hidróxido de cálcio não influenciou positivamente no reparo, pois a atividade bacteriana do hidróxido de cálcio é dose-dependente, sendo, portanto, o período de 14 dias insuficiente para alcalinizar o meio e impedir a proliferação bacteriana.

2.5 DA PRESENÇA DO ARSÊNICO

O arsênio ou arsênico é um elemento químico de símbolo As com número atômico 33 (33 prótons e 33 elétrons) e massa atômica 75u. É classificado como um semi-metal (metalóide) encontrado no grupo 15 da Classificação Periódica dos Elementos e foi descoberto em 1250 por Albertus Magnus.

É um cristal encontrado em abundância na crosta terrestre, na água do mar e no corpo humano. Desde o seu isolamento, em 1250 por Albertus Magnus, este elemento tem sido um ponto controverso na história humana. É utilizado em vários campos, como na medicina, agricultura, pecuária, indústria e metalurgia.

Na crosta terrestre, a concentração média de arsênico em rochas sedimentares é de 2mg/Kg, sendo que na maioria das rochas varia de 0,5 a 2,5 mg/Kg, embora concentrações maiores foram encontradas em sedimentos argilosos e fosforitos, sendo que alguns sedimentos marinhos podem conter até 3.000 mg/Kg de arsênico. Em rochas sedimentares, o arsênico poder estar co-precipitado com hidróxidos de ferro e sulfetos. Os minérios de ferro e de manganês são ricos em

arsênico. Este metalóide ocorre naturalmente em mais de 200 diferentes formas minerais, dos quais aproximadamente 60% são arseniatos, 20% são sulfetos e os 20% restantes incluem arsenetos, arsenitos, óxidos, silicatos e arsênio elementar (As). Porém, somente algumas dessas formas são comumente encontrados em quantidades significativas.

Os níveis de arsênio nos solos variam consideravelmente entre as regiões geográficas. Está presente nos solos em concentrações mais elevadas do que nas rochas. Solos contaminados geralmente contêm 10-40 mg/kg de arsênio, com concentrações mais baixas em solos arenosos e os derivados de granitos, enquanto que as maiores concentrações são encontrados em solos aluviais e orgânicos. Os principais fatores que influenciam a concentração desse elemento no solo, são a origem da rocha, o potencial de oxi-redução, o clima e os componentes orgânicos e inorgânicos, sendo que a origem da rocha é o fator mais importante.

O arsênio ocorre frequentemente na forma pentavalente (AsV- arseniato) e trivalente (AsIII - arsenito). Sob condições oxidantes, em ambientes aeróbios, arseniatos (AsV) são as espécies estáveis e são fortemente adsorvidos em argilas, óxidos/ hidróxidos de ferro e manganês e matéria orgânica. Sob condições redutoras, os arsenitos (AsIII) são predominantes. Em solos ricos em ferro, o arsênio precipita como arsenato férrico. Assim essas formas de arsênio dependem do tipo e quantidades dos componentes adsorvidos no solo, pH e o potencial de oxi-redução.

As propriedades físicas, químicas e biológicas dependem da forma química em que o elemento está presente. Assim, a medida da concentração total de arsênio não indica os verdadeiros níveis de cada espécie individualmente. A variação na toxicidade, o transporte e a biodisponibilidade são dependentes das formas químicas na qual o arsênio está presente.

2.5.1 TOXICIDADE

O arsênico é facilmente absorvido tanto oralmente quanto por inalação, sendo a extensão da absorção dependente da solubilidade do composto. A exposição crônica ao arsênico inorgânico pode dar origem a vários efeitos para a saúde, incluindo efeitos sobre o trato gastrointestinal, trato respiratório, pele, fígado, sistema cardiovascular, sistema hematopoiético, sistema nervoso, conduzindo a várias doenças tais como: conjuntivite, hiperqueratose, hiperpigmentação, doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso central e vascular periférico, câncer de pele e gangrena nos membros.

A ordem decrescente de toxicidade dos compostos de arsênico, segundo BURGUERA, et al., (1991), é a seguinte: arsina > arsenito (AsIII) > arseniato (AsV) > ácidos alquil-arsênicos > compostos de arsênio > arsênio elementar. O Arsênio (III) e (V) são as espécies mais tóxicas, sendo o arsênico trivalente (arsenito) sessenta vezes mais tóxico do que a forma oxidada pentavalente (arseniato). O arsênico inorgânico solúvel é mais tóxico que a forma orgânica. A dose letal média (DL₅₀) administrada oralmente varia entre 2 e 3 mg/Kg para As (III), 20 mg/Kg para o arsenato de cálcio, 600 mg/Kg para arsenato de sódio (MANDAL;SUZUKI 2002).

A toxicidade também depende de outros fatores, tais como estado físico, solução, tamanho das partículas, taxa de absorção nas células, taxa de eliminação e, naturalmente, a predisposição do paciente.

O modo mais comum da toxicidade de um elemento é a inativação de sistemas enzimáticos, que serve como catalisador biológico. O As (V) não reage diretamente com os locais ativos das enzimas. É primeiro reduzido a As (III) antes de exercer seu efeito tóxico. A ligação do As (III) aos grupos não essenciais de sulfidril nas células pode representar uma importante rota para a desintoxicação de arsênico. O As (III) interfere com as enzimas por ligação aos grupos SH e OH, especialmente quando há dois grupos de SH da enzima (MANDAL;SUZUKI 2002).

As enzimas, que geram energia celular no ciclo do ácido cítrico são afetadas negativamente. A ação inibitória é baseado na inativação do piruvato desidrogenase por complexação com As (III), impedindo a geração de trifosfato de adenosina (ATP). Na presença de As (III), dois átomos de hidrogênio dos grupos tiólicos são

substituídos, ligando-se com uma molécula de enxofre, formando o complexo diidrolipolarsenite quelato, impedindo a reoxidação do grupo diidrolipol e, conseqüentemente, bloqueando as atividades enzimáticas (MANDAL;SUZUKI 2002).

Como resultado, a quantidade de piruvato no sangue aumenta, a produção de energia é reduzida, causando os danos celulares. A forte ligação entre As (III) e o enxofre podem ser a razão pela qual o arsênico se acumula na queratina presente nos cabelos, tecidos e unhas. Embora o As (III) seja considerado a forma mais tóxica do elemento, o As (V) pode ser expressivo pela competição com o fosfato. O As (V) desacopla a fosforilação oxidativa (a fosforilação oxidativa é o processo pelo qual o ATP é produzido), enquanto ao mesmo tempo, Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADPH) é oxidado. O As V interrompe esse processo, produzindo um éster arseniato de ADP, que é instável e submetido a hidrólise não enzimática. Este processo foi denominado como arsenólise. Assim, o metabolismo energético é inibido, sendo produzido glicose-6-arseniato ao invés de glicose-6-fosfato (MANDAL;SUZUKI 2002).

O As V também pode substituir o fósforo no DNA, inibindo o mecanismo de reparo. Essa inibição pode levar a mutações em sítios genéticos ou um aumento da proliferação celular, podendo causar mutações. Tal ação pode explicar o efeito carcinogênico do arsênico. No entanto, até agora não há nenhuma evidência direta que o As V seja incorporado ao DNA (MANDAL;SUZUKI 2002).

2.5.2 ARSÊNICO NA ENDODONTIA

Na endodontia, há relatos na literatura que mostram a presença e liberação de arsênico nos cimentos, como o agregado trióxido mineral (MTA) e o cimento Portland, que é o principal constituinte do MTA. O conteúdo de metais pesados, como arsênico, chumbo e cromo no cimento Portland cinza é principalmente causado pelo processo de queima por meio do carvão mineral. O cimento Portland branco é fabricado a partir de matérias-primas mais puras, como por exemplo, a caulinita com baixo teor de ferro, apresentando dessa forma menor quantidade de metais pesados em sua composição (STEFFEN; VAN WAES, 2009). De acordo com as normas da ISO 9917-1, um material só pode ser utilizado em procedimentos

odontológicos, quando não contém mais do que 2 mg de arsênico por Kg do material.

Na endodontia DUARTE et al. (2005) estudaram a liberação de arsênico dos cimentos MTA ProRoot®, MTA Angelus®, cimento Portland cinza, cimento Portland branco por meio do espectrofotômetro de absorção atômica. Os resultados mostraram que os níveis de arsênico liberados foram similares para todos os materiais, e que os níveis de liberação de arsênico foram baixos. Os valores mais altos foram observados para o cimento Portland cinza, com valores de 0.007 ppm após 3h, e os outros materiais mostraram níveis de 0.002 ppm. Todos esses valores estavam abaixo dos níveis preconizados pelo ISO 9917-1.

BRAMANTE et al. (2008), quantificaram a presença de arsênico em cimentos à base de MTA (CPM, CPM Sealer, MTA-Obtura, MTA experimental), MTA Angelus cinza e branco, MTA ProRoot e cimentos Portland branco e cinza, por meio de um espectrofotômetro de absorção atômica, para verificarem se estes obedeciam o limite recomendado pela ISO 9917-1 para cimentos à base de água. Os autores concluíram que todos os materiais testados apresentam arsênico na composição, com valores acima e abaixo da norma ISO 9917-1. A forma do arsênico não foi analisada nem a toxicidade do arsênico. Somente o MTA-Obtura, MTA Ângelus® branco e cimento Portland branco apresentaram níveis de arsênico abaixo do limite aceito pela ISO. Os autores enfatizaram que o alto conteúdo de arsênico não necessariamente indica uma maior liberação, pois o material (MTA cinza/cimento Portland cinza) contém sais férricos em sua composição que estabilizam o arsênico. Isso pode explicar porque a liberação de arsênico foi mínima no estudo de Duarte et al. (2005). O MTA é utilizado em pequenas quantidades (menos de um grama) em procedimentos clínicos endodônticos; considerando que a dose letal média para o As (III) administrado oralmente é de 2-3mg/Kg do peso corporal, a dose tóxica para um indivíduo com 70 Kg está em torno de 140-210 mg, sendo consideravelmente acima do presente no cimento Portland ou MTA utilizado nas retrobturações. Os autores ainda alertam quanto à necessidade de pesquisas para investigar se a standardização da ISO 9917-1 é aplicada aos vários cimentos utilizados como materiais retrobturadores.

DE-DEUS et al. (2009) determinaram a quantidade de arsênico em algumas marcas comerciais do MTA e cimento Portland. As formas de arsênico As (III), As (V), ácido dimetilarsênico, foram separados por líquido cromatográfico de alta-performance (HPLC). Observaram que somente o As III pode ser detectado. A quantidade mínima de arsênico foi detectada em amostras do MTA ProRoot® branco (3.3×10^{-4}) e o máximo em amostras do MTA Bio Angelus® (8.6×10^{-4}). No MTA Angelus® cinza, MTA ProRoot® cinza, e cimento Portland, não foram detectados qualquer traço de arsênico. A análise dos dados mostrou que não houve diferença entre os cimentos Portland e MTA quanto à liberação de arsênico, e a quantidade total liberada para todos os cimentos testados está bem abaixo daquela considerada perigosa. Para os autores, como no corpo humano o envenenamento por arsênico inorgânico é letal para as doses orais acima de 60mg/Kg de massa corporal ou 60 ppm, os baixos valores de arsênico presentes nos cimentos testados não podem ser vistos como um empecilho para seu emprego clínico.

Além do teor de arsênico, DAMMASCHKE et al. (2005) relataram que o cimento Portland pode conter outros metais pesados, tais como o manganês e o estrôncio, podendo induzir a reações inflamatórias ou alérgicas.

CHANG et al. (2010) avaliaram os níveis de dez metais pesados, como, arsênico, bismuto, cádmio, cromo, cobre, ferro, chumbo, manganês, níquel e zinco no cimento Portland branco e cinza e no MTA branco e cinza. O arsênico foi detectado nos quatro cimentos, sendo que a concentração mais alta foi detectada no cimento Portland cinza (25.01 mg/kg), e a mais baixa no MTA cinza (2.16. mg/kg). O MTA branco apresentou conteúdos inferiores ou semelhantes ao cimento Portland branco em relação a nove metais, inclusive o arsênico. Segundo os autores, é improvável que a liberação desses metais pesados pelo cimento Portland apresentem algum risco à saúde, pois esses metais também estão presentes em uma dieta normal, sendo necessária a ingestão de grandes quantidades para desencadear problemas de saúde.

SCHEMBRI et al., (2010) encontraram altos valores de cromo liberado em relação ao arsênico e chumbo, tanto no conteúdo total quanto no liberado pelos materiais MTA ProRoot®, MTA Angelus®, cimento Portland cinza e cimento Portland branco. O cimento Portland cinza apresentou a maior quantidade total desses

metais; o cimento Portland branco e ambos MTA apresentaram valores inferiores para todos os íons metálicos liberados. A liberação do arsênico, cromo e chumbo, após o período de 15 a 30 dias ficou abaixo dos limites de detecção, indicando que a maior liberação ocorre nos 15 dias iniciais de hidratação. Clinicamente, isto é importante porque indica que os problemas a longo prazo da liberação contínua de íons metálicos nos fluidos corporais são escassos. O cimento Portland e o MTA apresentaram evidências da presença de metais pesados tanto na forma solúvel como na forma liberada. Nesse estudo, o MTA apresentou níveis de arsênico superiores aos limites especificados pelas normas internacionais.

MATSUNAGA et al. (2010), analisaram a liberação de arsênico pelo MTA branco e cinza por meio de espectrofotômetro de absorção atômica e encontraram valores abaixo do preconizado, relatando que não há nenhum problema no que diz respeito à saúde do paciente, em relação ao nível de As III liberado após a aplicação do MTA no tratamento endodôntico.

3 *P*ROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar, microscopicamente, a resposta do tecido subcutâneo de ratos frente à implantação de tubos de polietileno contendo agregado trióxido mineral (MTA) e cimentos Portland com diferentes concentrações de arsênico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1. ANIMAIS

Para a realização deste estudo, foram utilizados 36 ratos machos da linhagem Wistar (*Rathus norvegicus*) adultos jovens, com 2 meses de idade e peso entre 250 e 300 gramas, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, e mantidos em gaiolas abrigando no máximo 05 animais e identificadas conforme os grupos e os períodos experimentais. Os animais receberam água e alimentação constituída de ração comercial balanceada. Previamente ao início do experimento, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Animais (CEEPA – Protocolo nº 024/20 09) e aprovado em 2009 (anexo).

4.1.2. CIMENTOS

Foi utilizado o MTA Angelus® cinza e três cimentos Portland, sendo das marcas comerciais: Minetti (Argentina), Votoran (Brasil), Irajazinho (Brasil).

Os cimentos selecionados foram analisados no laboratório Hidrocepe – Serviços de Qualidade Ltda. (Belo Horizonte/MG) que quantificou os níveis de arsênico, a saber:

- Minetti: 18,46 mg/Kg.
- Votoran: 10,73 mg/Kg.
- MTA: 5,91 mg/Kg.
- Irajazinho: 0,69 mg/Kg.

Os cimentos foram pesados e manipulados empregando a proporção pó/líquido de 1g/0,35mL de água destilada.

Figura 1 – MTA Angelus® cinza. Embalagem contendo 1 frasco com 1 grama de pó e recipiente plástico com água destilada esterilizada.

Figura 2 – Cimento Portland branco Irajazinho

Figura 3 – Cimento Portland cinza Minetti.

Figura 4 – Cimento Portland Votoran

4.1.3. TUBOS DE POLIETILENO

Foram utilizados 72 tubos de polietileno com 1,5mm de diâmetro interno, 2,0mm de diâmetro externo e 10,0mm de comprimento, os quais foram esterilizados em óxido de etileno (ACECIL – Central de esterilização Comércio e Indústria Ltda., Campinas, SP, Brasil).

4.1.4. ANESTESIA

Os animais foram anestesiados empregando solução à base de Cloridrato de Xilazina (Calmium® - Agener União, União Química, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e solução à base de Cloridrato de Ketamina (Dopalen® - Vetbrands do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil). Essas substâncias foram associadas na proporção de 1 para 1 e empregadas na concentração de 0,1mL da solução para cada 100 gramas de peso do animal.

4.1.5. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 36 ratos Wistar albinos, distribuídos em 4 grupos experimentais segundo o material empregado perfazendo um total de 6 implantes por período (15, 30 e 60 dias). A lateral dos tubos serviram como grupo controle.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos, cimentos e períodos experimentais.

GRUPOS	CIMENTOS	PERÍODOS					
		15 dias		30 dias		60 dias	
1	MTA Angelus®	06 ratos	06 implantes	06 ratos	06 implantes	06 ratos	06 implantes
2	CP Irajazinho		06 implantes		06 implantes		06 implantes
3	CP Mineti	06 ratos	06 implantes	06 ratos	06 implantes	06 ratos	06 implantes
4	CP Votoran		06 implantes		06 implantes		06 implantes
		12 Ratos		12 Ratos		12 Ratos	

4.2 MÉTODOS

4.2.1. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Após a anestesia foi realizada a tricotomia do dorso dos animais (figura 5) e anti-sepsia desta região com solução de iodopovidona (Rioquímica Indústria Farmacêutica Ltda., São José do Rio Preto, SP, Brasil) (figura 6). Os cimentos foram preparados e inseridos nos tubos de polietileno por meio de condensadores endodônticos (Maillefer, Ballaigues, Suíça), preenchendo todo o espaço e observando-se o total selamento das extremidades do tubo.

Foi realizada uma incisão longitudinal na região mediana do dorso de cada animal (figura 7) com lâmina de bisturi nº15 (Embra mac – Empresa Brasileira de Materiais Cirúrgicos Ltda., Itajaí, SC, Brasil) com uma extensão de aproximadamente 15mm. Os tubos de polietileno preenchidos com os cimentos foram posicionados dentro da ponta de um Trocarte, e esse foi introduzido com movimentos de cateterismo com leve pressão, divulsionando os tecidos até atingir uma profundidade de 18mm, onde o tubo foi depositado (figura 8). Nessa fase, cuidado foi tomado para não perfurar e dilacerar os tecidos. Dessa forma, foram obtidas duas lojas cirúrgicas laterais as incisões, tomando-se o cuidado de realizar os implantes não paralelos à linha de incisão para evitar sua expulsão ou mobilidade. Cada rato recebeu dois tubos contendo cimentos diferentes, um do lado direito e o outro do lado esquerdo, obedecendo a uma ordem de colocação que foi previamente estabelecida e anotada em uma ficha apropriada. As bordas das incisões foram suturadas (figura 9) com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Produtos Profissionais Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil). Os animais foram acompanhados até a recuperação da anestesia e foram observados diariamente para a verificação do comportamento, a fim de evitar ocorrências que poderiam comprometer o experimento. Para a identificação dos animais foram realizados marcações por meio de perfurações na orelha de acordo com o método universal com a ajuda de um perfurador de Aniston. Cada grupo de 5 animais permaneceu em gaiolas coletivas até completar os períodos de observação (15, 30 e 60 dias).

4.2.2. OBTENÇÃO DAS PEÇAS

Decorridos os períodos experimentais os animais foram anestesiados e mortos por meio de sobredose anestésica. Realizou-se a tricotomia da região dorsal e os tubos implantados foram localizados pela palpação sendo realizado uma incisão longitudinal com 15mm de comprimento no dorso e a área foi dissecada com lâmina de bisturi nº 15 (Embramac – Empresa Brasileira de Materiais Cirúrgicos Ltda., Itajaí, SC, Brasil) abrangendo suficiente tecido normal circunjacente. A peça contendo tecido cutâneo – corpo de prova - tecido subcutâneo (figura 10), foi distendida em papel cartão e fixada em solução de formol a 10% tamponado em frascos plásticos unitários contendo a identificação do animal, grupo e período experimental correspondentes.

Após a fixação, as peças foram recortadas com navalha para a remoção do excesso de tecido. Os tubos de polietileno foram removidos realizando-se uma incisão firme e única em uma das laterais do mesmo a fim de se evitar dilacerações do tecido. Com o auxílio de uma pinça clínica, desprende-se o tecido em volta do tubo com especial atenção às extremidades, colocando-se a ponta da sonda por baixo do tubo puxando-o para fora. Para a desidratação, as peças foram armazenadas em álcool 70% por um período de 2 dias e em seguida foram submetidas a 3 banhos com álcool absoluto. Para a diafanização dos tecidos, as peças foram armazenadas em Xilol. A inclusão das peças em parafina foi realizada manualmente. Cortes microscópicos semi-seriados de 6µm de espessura foram obtidos em micrótomo Leica (Leica – Jung RM2045 – Leica Instruments GmbH D – 6907, Alemanha) no sentido longitudinal do tubo, para poder coletar em uma mesma lâmina a lateral que serviu como controle e a extremidade do cimento experimental. Os cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (H.E.).

Figura 5 – Tricotomia da região dorsal.

Figura 6 – Anti-sepsia da região dorsal com solução de iodopovidona.

Figura 7 – Incisão na região mediana da dorsal.

Figura 8 – Trocarte introduzido entre o tecido cutâneo e o tecido muscular, onde foi depositado o tubo de polietileno preenchido com o cimento.

Figura 9 – Sutura.

Figura 10 – Remoção do tecido circunjacente aos tubos de polietileno.

4.2.3. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.2.3.1. ANÁLISE DESCRITIVA

A avaliação das respostas do tecido conjuntivo em contato com os materiais testados foi realizada de forma descritiva, quantitativa subjetiva, considerando o infiltrado inflamatório e os fenômenos correlatos, reparo e as características dos materiais remanescentes. A leitura das lâminas foi realizada por meio de um microscópio óptico (Leitz Aristoplan – Germany) (5x e 40x).

4.2.3.2. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Para a execução desta análise foram pontuados alguns critérios, como fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos, células inflamatórias e de outras estruturas como substância fundamental amorfa e corpos estranhos, presentes no tecido conjuntivo capsular reacional.

A. Casualização dos campos microscópicos

Foi utilizado o método estereológico para a casualização dos campos. Este método é baseado em princípios geométricos estatísticos, derivados da probabilidade em que imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidam com um sistema-teste apropriado. Deste modo, o ponto central deste método está na casualização das amostras, ou seja, a escolha das amostras do tecido a serem confrontadas com o sistema-teste, a qual deve ser realizada por meio de um método que elimine a ocorrência de vício na amostragem. Isso é conseguido pela aplicação do procedimento de casualização em todos os estágios do experimento, desde a escolha dos animais, da seleção dos blocos histológicos e da seleção dos cortes de cada lâmina a serem utilizados nas quantificações.

De cada espécime, foram obtidas três lâminas, contendo quatro cortes semi-seriados cada uma, com intervalos de 50µm entre cada corte. De cada lâmina selecionada, foram escolhidos dois cortes histológicos para serem avaliados. Foram quantificados os critérios determinados em todos os campos microscópicos referentes à região capsular que estava em contato com os materiais testados.

B. Avaliação da densidade de volume (Vvi) das fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos e outras estruturas.

Esses parâmetros histológicos foram avaliados com uma objetiva de imersão de 100X e um graticulo de integração II Zeiss colocado em uma ocular Kpl 8X, composta de 10 linhas paralelas e de 100 pontos numa área quadrangular. A imagem do graticulo foi sobreposta, sucessivamente, a todos os campos histológicos presentes na região capsular, e anotados os números de pontos (Pi) que coincidiram sobre cada um dos critérios estabelecidos.

A densidade de volume (Vvi) foi determinada pela seguinte fórmula:

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

Figura 11- Esquema de casualização dos campos microscópicos.

Figura 12 – Graticulo de integração II Zeiss sobre a imagem de um corte histológico.

4.2.3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizada análise de variância a dois critérios (ANOVA) para a comparação entre o material e os períodos de implantação, seguido pelo teste de Tukey, para comparações múltiplas entre os grupos dentro dos períodos, e entre estes para cada um dos critérios avaliados morfometricamente. Foi adotado nível de significância $p < 0,05$. Para a análise estatística foi utilizado o programa "SigmaPlot 12".

5 *R*ESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA

Os espécimes examinados demonstraram formação de uma estrutura tecidual envolvendo o tubo implantado. A análise da amostra experimental foi efetuada nas extremidades da referida estrutura, enquanto que o controle foi analisado nas laterais.

Figura 13 - Estrutura capsular do tubo de polietileno implantado. (x2,5)

GRUPO 1- MTA CINZA ANGELUS® - 15 DIAS

Presença de tecido neoformado com aspecto denso, exibindo características de estrutura fibrocelular. A população celular estava composta por fibrócitos e macrófagos mononucleados (figura 14A), encontrados principalmente na superfície em contato com o cimento testado. Nessa superfície foi possível observar, ainda, resquícios de uma estrutura amorfa levemente basofílica, sugerindo material necrótico, contendo pontos de coloração negra de tamanhos variados compatível com restos do material implantado. A reação inflamatória caracterizou-se como infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve.

GRUPO 2- CIMENTO PORTLAND IRAJAZINHO - 15 DIAS

Tecido de aspecto fibrocelular, exibindo considerável população de fibrócitos e moderada vascularização. Na superfície desse tecido, voltado para o cimento testado, havia conglomerados de células macrofágicas (figura 14B). Em alguns espécimes em que o tecido formado invaginava-se para a luz do tubo, apresentava morfologia de tecido conjuntivo frouxo ricamente celularizado e moderada vascularização. Essa população celular estava composta por fibroblastos e macrófagos mononucleados exibindo, na maior parte, atividade fagocítica, representada pelo aumento de volume e presença de vacúolo. A reação inflamatória caracterizou-se como infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve.

GRUPO 3- CIMENTO PORTLAND MINETTI - 15 DIAS

Tecido fibrocelular exibindo células inflamatórias esparsas compatíveis com linfócitos. Na superfície voltada para o material, o tecido apresentava-se com infiltrado inflamatório mais acentuado com predominância de células macrofágicas mononucleadas e células gigantes multinucleadas esparsas (figura 14C). Em alguns espécimes, em que ocorreu a invaginação do tecido conjuntivo neoformado para a luz do tubo, o aspecto do tecido era frouxo, com ativa proliferação fibroangioblástica com infiltrado inflamatório de linfócitos e macrófagos em contato com o cimento testado. A reação inflamatória caracterizou-se como infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve.

GRUPO 4- CIMENTO PORTLAND VOTORAN - 15 DIAS

Tecido conjuntivo neoformado de aspecto denso com predominância dos elementos celulares sobre tecido fibrocelular. Essa população celular assumiu características de infiltrado inflamatório crônico, com presença marcante de macrófagos e moderada de linfócitos (figura 14D). Notou-se também a presença esparsa de algumas células gigantes multinucleadas. A reação inflamatória caracterizou-se como infiltrado inflamatório crônico de intensidade moderada.

GRUPO CONTROLE – LATERAL DO TUBO - 15 DIAS

Nas laterais do tubo implantado a estrutura capsular apresentou-se como uma delgada faixa de tecido fibrocelular (figura 14E).

ASPECTOS MICROSCÓPICOS DO PERÍODO DE 15 DIAS

Figura 14A – MTA Angelus® cinza – tecido fibrocelular (estrela preta); Macrófagos/células gigantes (seta preta). (x40); **Figura 14B** – Cimento Portland branco Irajazinho – tecido fibrocelular (estrela preta); Macrófagos/células gigantes (seta preta). (x40); **Figura 14C** – Cimento Portland cinza Minetti – tecido fibrocelular (estrela preta); macrófagos/células gigantes (seta preta); vasos sanguíneos (seta vermelha). (x40); **Figura 14D** – Cimento Portland cinza Votoran – Tecido fibrocelular (estrela preta); Macrófagos/células gigantes (seta preta). (x40); **Figura 14E** – Grupo Controle – tecido fibrocelular (estrela preta). (x40)

GRUPO 1- MTA CINZA ANGELUS® - 30 DIAS

O tecido formado, em contato com o cimento em teste, apresentou-se no formato de uma faixa com uma estrutura do tipo fibrocelular. Na superfície desse tecido, voltada para o cimento testado, observou-se concentração de macrófagos mononucleados (figura 15A), apresentando-se em alguns pontos com citoplasma amplo e vacuolado. A reação inflamatória caracterizou-se como infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve.

GRUPO 2- CIMENTO PORTLAND IRAJAZINHO - 30 DIAS

Tecido fibrocelular com células macrofágicas mononucleadas e multinucleadas esparsas na superfície voltada para o cimento implantado (figura 15B). A reação inflamatória caracterizou-se como infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve.

GRUPO 3- CIMENTO PORTLAND MINETTI - 30 DIAS

O tecido neoformado exibiu, aspecto fibrocelular. Todavia, a superfície voltada para o cimento em teste apresentou-se com aspecto frouxo, variando de espessura nos diversos espécimes examinados. Havia nesse tecido uma população de células inflamatórias do tipo linfocitária, com presença moderada de células macrofágicas concentradas principalmente na superfície em contato com o cimento e, a presença de células gigantes multinucleadas era esparsa (figura 15C). A reação inflamatória caracterizou-se como infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve.

GRUPO 4- CIMENTO PORTLAND VOTORAN – 30 DIAS

Tecido conjuntivo neoformado um pouco mais estreito que os espécimes do período anterior, formado por tecido fibrocelular proeminente com poucos elementos celulares (figura 15D). Essa população celular estava composta por infiltrado inflamatório crônico com predomínio de macrófagos e linfócitos esparsos. Havia a presença de vestígios de material implantado que se apresentavam como

conglomerados de cor negra fagocitados por macrófagos. A reação inflamatória caracterizou-se como infiltrado inflamatório crônico de intensidade moderada.

GRUPO CONTROLE – LATERAL DO TUBO - 30 DIAS

Nas laterais do tubo implantado, o tecido conjuntivo formado era fibroso do tipo fibrocelular (figura 15E).

ASPECTOS MICROSCÓPICOS DO PERÍODO DE 30 DIAS

Figura 15F – MTA Angelus® cinza – tecido fibrocelular (estrela preta); Macrófagos/células gigantes (seta preta). (x40); **Figura 15G** – Cimento Portland branco Irajazinho – tecido fibrocelular (estrela preta); Macrófagos/células gigantes (seta preta). (x40); **Figura 15H** – Cimento Portland cinza Minetti – tecido fibrocelular (estrela preta); macrófagos/células gigantes (seta preta). (x40); **Figura 15I** – Cimento Portland cinza Votoran – Tecido fibrocelular (estrela preta); Macrófagos/células gigantes (seta preta). (x40); **Figura 15J** – Grupo Controle – tecido fibrocelular (estrela preta). (x40)

GRUPO 1- MTA CINZA ANGELUS® - 60 DIAS

Tecido conjuntivo do tipo fibrocelular com formação proeminente de fibras colágenas. Na superfície dessa estrutura tecidual voltada para o cimento testado havia conglomerado de macrófagos mononucleados (figura 16A), e pontos de coloração negra esparsos sugestivos de resquícios do material implantado. A reação inflamatória caracterizou-se como infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve.

GRUPO 2- CIMENTO PORTLAND IRAJAZINHO - 60 DIAS

Formação de tecido fibrocelular tendo na superfície voltada para o cimento implantado, conglomerado de células inflamatórias predominantemente macrofágico (figura 16B) e presença de linfócitos esparsos em alguns espécimes, onde esse conglomerado apresentava-se mais espesso em decorrência da invaginação para a luz do tubo. A reação inflamatória caracterizou-se como infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve.

GRUPO 3- CIMENTO PORTLAND MINETTI - 60 DIAS

Formação de um tecido fibrocelular proeminente, cujo componente inflamatório estava constituído predominantemente por células macrofágicas mononucleadas e linfócitos esparsos. Essas células estavam concentradas principalmente na periferia da faixa tecidual, voltada para o cimento implantado (figura 16C). Alguns desses macrófagos exibiam citoplasma com vacúolo, sugerindo atividade fagocítica. Em alguns cortes, foi possível observar pequenos pontos de coloração negra sugerindo partículas de material sendo fagocitado. A reação inflamatória caracterizou-se como infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve.

GRUPO 4- CIMENTO PORTLAND VOTORAN – 60 DIAS

Tecido conjuntivo de pouca espessura do tipo fibrocelular, com moderado infiltrado de macrófagos que se concentravam predominantemente na periferia dessa faixa tecidual, em contato com o material implantado. Notou-se ainda, conglomerados de coloração negra sugestivos de partículas de material fagocitado

(figura 16D). A reação inflamatória caracterizou-se como infiltrado inflamatório crônico de intensidade leve.

GRUPO CONTROLE – LATERAL DO TUBO - 60 DIAS

Nas porções laterais do tubo implantado, tecido conjuntivo de estrutura fibrosa do tipo fibrocelular (figura 16E).

ASPECTOS MICROSCÓPICOS DO PERÍODO DE 60 DIAS

Figura 16K– MTA Angelus® cinza – tecido fibrocelular (estrela preta); Macrófagos/células gigantes (seta preta); pontos sugestivos de resquícios do cimento em teste (seta verde). (x40); **Figura 16L** – Cimento Portland branco Irajazinho – tecido fibrocelular (estrela preta); Macrófagos/células gigantes (seta preta). (x40); **Figura 16M** – Cimento Portland cinza Minetti – tecido fibrocelular (estrela preta); macrófagos/células gigantes (seta preta). (x40); **Figura 16N** – Cimento Portland cinza Votoran – Tecido fibrocelular (estrela preta); Macrófagos/células gigantes (seta preta). (x40); **Figura 16O** – Grupo Controle – tecido fibrocelular (estrela preta). (x40)

5.2 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

Os valores médios e desvio padrão obtidos para a densidade de volume (%) de células inflamatórias, fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos, material e de outras estruturas no tecido conjuntivo capsular reacional, adjacente à superfície dos materiais implantados, nos diferente períodos experimentais encontram-se dispostos na tabela 2.

Tabela 2 – Média e desvio padrão da densidade de volume (%) de células inflamatórias, fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos, material e de outras estruturas encontradas no tecido conjuntivo capsular reacional adjacente à superfície dos materiais implantados nos três períodos de avaliação.

GRUPOS	EVENTOS	PERÍODOS		
		15 dias	30 dias	60 dias
1	MTA Angelus®			
	Células Inflamatórias	4,72 ± 0,90	1,93 ± 0,66	1,11 ± 0,45
	Fibroblastos	7,00 ± 0,50	5,16 ± 0,68	7,89 ± 1,74
	Fibras Colágenas	52,07 ± 8,30	43,7 ± 7,17	40,9 ± 10,2
	Vasos sanguíneos	0,93 ± 0,48	1,4 ± 0,36	0,84 ± 0,89
	Material	0,49 ± 0,69	0,12 ± 0,21	0,23 ± 0,52
	Outros	32,99 ± 6,14	46,55 ± 6,61	47,3 ± 9,59
2	CP Irajazinho			
	Células Inflamatórias	3,63 ± 0,99	2,46 ± 0,46	1,23 ± 0,83
	Fibroblastos	6,44 ± 0,52	4,34 ± 0,64	4,38 ± 0,82
	Fibras Colágenas	43,8 ± 6,88	47,25 ± 10,06	48,6 ± 6,38
	Vasos sanguíneos	0,78 ± 0,57	0,89 ± 0,43	1,02 ± 0,55
	Material	0,04 ± 0,08	0,004 ± 0,009	0,39 ± 0,24
	Outros	50,38 ± 6,51	45,02 ± 10,82	43,01 ± 7,59
3	CP Minetti			
	Células Inflamatórias	5,05 ± 2,04	3,66 ± 1,18	2,91 ± 0,89
	Fibroblastos	7,15 ± 0,89	5,33 ± 0,77	4,74 ± 1,09
	Fibras Colágenas	52,1 ± 14,45	41,56 ± 5,83	45,9 ± 11,15
	Vasos sanguíneos	0,85 ± 0,27	1,66 ± 0,93	1,01 ± 0,58
	Material	0,26 ± 0,17	0,40 ± 0,50	0,26 ± 0,29
	Outros	34,21 ± 15,4	40,51 ± 12,05	43,6 ± 11,8
4	CP Votoran			
	Células Inflamatórias	10,17 ± 3,76	6,40 ± 2,57	3,77 ± 0,70
	Fibroblastos	5,84 ± 0,93	5,94 ± 0,55	3,88 ± 0,51
	Fibras Colágenas	47,9 ± 5,35	50,4 ± 10,16	42,2 ± 7,97
	Vasos sanguíneos	2,04 ± 1,07	1,46 ± 0,59	1,49 ± 0,46
	Material	0,20 ± 0,22	0,87 ± 0,57	0,23 ± 0,28
	Outros	33,85 ± 7,89	34,7 ± 11,5	48,2 ± 8,32
Controle (C)				
	Células Inflamatórias	1,25 ± 4,39	0,15 ± 0,35	0 ± 0
	Fibroblastos	3,95 ± 2,20	5,05 ± 2,31	4 ± 1,81
	Fibras Colágenas	27,2 ± 7,33	57,6 ± 11,28	83,8 ± 10,37
	Vasos sanguíneos	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Material	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Outros	67,6 ± 6,04	37,25 ± 11,6	12,15 ± 10,39

Tabela 3 – Comparação entre os grupos no período de 15 dias quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria.

GRUPOS	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	FIBROBLASTOS	FIBRAS COLÁGENAS	VASOS SANGUÍNEOS	MATERIAL	OUTROS
1 X C	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Significante.
1 X 4	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
1 X 2	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
2 X C	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
2 X 4	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.
3 X C	Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Significante.
3 X 4	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
3 X 2	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
3 X 1	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
4 X C	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Significante.

Tabela 4 – Comparação entre os grupos no período de 30 dias quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria.

GRUPOS	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	FIBROBLASTOS	FIBRAS COLÁGENAS	VASOS SANGUÍNEOS	MATERIAL	OUTROS
1 X C	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
1 X 4	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
1 X 2	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
2 X C	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
2 X 4	Significante.	Significante.	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.
3 X C	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
3 X 4	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
3 X 2	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
3 X 1	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
4 X C	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.

Tabela 5 – Comparação entre os grupos no período de 60 dias quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria.

GRUPOS	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	FIBROBLASTOS	FIBRAS COLÁGENAS	VASOS SANGUÍNEOS	MATERIAL	OUTROS
1 X C	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Significante.
1 X 4	Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
1 X 2	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
2 X C	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
2 X 4	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.
3 X C	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
3 X 4	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
3 X 2	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
3 X 1	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
4 X C	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Significante.

Tabela 6 – Comparação entre os períodos para o grupo 1 (MTA Angelus® cinza) quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria.

GRUPOS	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	FIBROBLASTOS	FIBRAS COLÁGENAS	VASOS SANGÜÍNEOS	MATERIAL	OUTROS
15X30	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
15X60	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.
30X60	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.

Tabela 7 – Comparação entre os períodos para o grupo 2 (CP Irajazinho branco) quanto aos critérios estabelecidos para a morfometria.

GRUPOS	CÉLULAS INFLAMATÓRIAS	FIBROBLASTOS	FIBRAS COLÁGENAS	VASOS SANGÜÍNEOS	MATERIAL	OUTROS
15X30	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	
15X60	Não Significante.	Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	
30X60	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.	Não Significante.

Gráfico 1 – Densidade de volume (%) das células inflamatórias presentes no tecido conjuntivo capsular reacional adjacente à superfície dos materiais implantados.

Gráfico 2 – Densidade de volume (%) dos fibroblastos presentes no tecido conjuntivo capsular reacional adjacente à superfície dos materiais implantados .

Gráfico 3 – Densidade de volume (%) das fibras colágenas presentes no tecido conjuntivo capsular reacional adjacente à superfície dos materiais implantados.

Gráfico 4 – Densidade de volume (%) dos vasos sanguíneos presentes no tecido conjuntivo capsular reacional adjacente à superfície dos materiais implantados.

Gráfico 5 – Densidade de volume (%) do material presente no tecido conjuntivo capsular reacional adjacente à superfície dos materiais implantados.

6 *D*_{ISSCUSSÃO}

6 DISCUSSÃO

6.1 DA METODOLOGIA

Foi utilizada a implantação de tubos de polietileno em tecido subcutâneo de ratos para avaliar a biocompatibilidade dos materiais. Esse método foi introduzido por TORNECK (1966) e foi aprovado por OLSSON; SLIWKOWSKI, LANGELAND (1981). Trata-se de um recurso metodológico comprovadamente satisfatório para testes de biocompatibilidade (MOTTA, 2003; KOWALSKI, 2004; YALTIRIK, et al., 2004; MORAIS et al., 2006; SHAHI et al., 2006; SUMER et al., 2006; COUTINHO-FILHO et al., 2008; VOSOUGHOSSEINI et al., 2008; GOMES-FILHO et al., 2009b). O uso dos tubos de polietileno é uma técnica bastante difundida, pois simula as condições do canal radicular (FRIEND; BROWNE, 1968; FERRAZ et al., 1990), uma vez que as porções terminais do tubo contendo o material entram em contato com o tecido conjuntivo, representando a relação forame apical/tecidos periapicais.

Quanto ao tempo de avaliação, as análises foram realizadas aos 15, 30 e 60 dias, à semelhança de outros trabalhos em tecido subcutâneo (MORETTON et al., 2000; SUMER et al., 2006; MAGRO-KATO, 2007; ORTIZ-OROPEZA, 2007). MORETTON et al. (2000) afirmaram que o período de 60 dias é suficiente para avaliar respostas teciduais a longo prazo. Na literatura não existe um consenso entre os autores, quanto aos períodos de avaliação, tendo estudos com 60 dias (TORNECK, 1966; TORNECK, 1967; PHILLIPS, 1967), 7 e 30 dias (HOLLAND et al., 1999; HOLLAND et al., 2001; HOLLAND et al., 2002) e entre 7 e 180 dias (OLSSON, SLIMKOWSKI; LANGELAND, 1981; FERRAZ et al., 1990; ECONOMIDES et al., 1995; KOLOKOURIS et al., 1996; KOLOKOURIS et al., 1998).

Apesar de inúmeros trabalhos utilizarem como controle um tubo de polietileno vazio (PHILLIPS, 1967; MAKES et al., 1977; KOLOKOURIS et al., 1996; GORDUYSUS; ETIKAN; GOKOZ, 1998), ou com uma das extremidades selada com guta-percha (HUNTER, 1957; SPANGBERG; LANGELAND, 1973; HOLLAND, 1975; LEONARDO et al. 1990; SHIN, 2003; NOETZEL, 2006), optamos em utilizar a lateral do tubo de polietileno, uma vez que os resultados biológicos desse material já são

bastante conhecidos, consagrando-o quanto à sua biocompatibilidade (GORDUYSUS; ETIKAN; GOKOZ, 1998; YALTIRIK, et al., 2004, CINTRA et al., 2006; MORAIS et al., 2006; SUMER et al., 2006; MORI et al., 2009; Bortolo 2009).

Quanto à forma de análise dos resultados, empregou-se a descritiva, que tem sido amplamente utilizada em trabalhos de biocompatibilidade (ECONOMIDES et al., 1995; MORAIS et al., 2006; SHAHI et al., 2006; GOMES-FILHO et al., 2009a; 2009b), e a morfométrica para células inflamatórias, fibroblastos e fibras colágenas. Alguns estudos (HOLLAND et al. 1999, 2001a, MORAIS et al., 2006) empregam escores para determinar a reação inflamatória, no entanto, a análise se torna subjetiva e para isto, o examinador tem que estar bem calibrado. A morfometria fornece dados mais concretos e valores numéricos reais.

6.1.2. DOS CIMENTOS EMPREGADOS

MTA-Angelus®

A avaliação da biocompatibilidade do MTA cinza, da empresa Angelus, foi selecionado por ser um material de fabricação nacional e por ser a única opção comercializada nacionalmente. Alguns estudos foram publicados na literatura testando suas propriedades físico-químicas e biológicas e quanto a presença de arsênico (DUARTE et al., 2005; BRAMANTE et al., 2008). Porém em relação ao arsênico, foi apenas avaliado a sua liberação (DUARTE et al., 2005) e presença (BRAMANTE et al., 2008), tornando-se oportuno avaliar em tecido subcutâneo de ratos, se o maior ou menor conteúdo desse metal pesado influencia na intensidade da reação inflamatória.

Cimento Portland

O cimento Portland foi utilizado neste trabalho devido à semelhança com o MTA (WUCHERPFENNING; GREEN 1999, ESTRELA et al. 2000) e por ser seu principal constituinte (75% no ProRoot MTA e 80% no MTA-Angelus).

Dos vários cimentos Portland disponíveis no mercado, o cimento Portland cinza Votoran e Minetti e o cimento Portland branco Irajazinho foram selecionados para o estudo em função dos níveis de arsênico constatados nos trabalhos de DUARTE et al., 2005 e BRAMANTE et al., 2008.

6.2 DOS RESULTADOS

A neoformação óssea e cementária evidenciam a biocompatibilidade de um material (TORABINEJAD et al., 1993; HOLLAND et al., 2001; HOLLAND et al., 2001). Em estudos que envolvem tecido conjuntivo, como este, a biocompatibilidade é demonstrada pela formação de cápsula fibrosa. Ao redor dos tubos implantados, houve a formação de cápsula fibrosa em todos os espécimes, e em todos os períodos experimentais, indicando atividade reparadora, sugerindo que o mesmo é bem tolerado pelos tecidos, corroborando com outros estudos (WUCHERPFENNING; GREEN, 1999; YALTIRIK et al., 2004; CINTRA et al., 2006; SUMER et al., 2006; COUTINHO-FILHO et al., 2008). Essa reparação foi caracterizada pela proliferação fibro-angioblástica e formação de fibras colágenas. O parâmetro utilizado entre os materiais testados foi a lateral do tubo de polietileno, que apresentou em todos os períodos avaliados, uma maturidade tecidual superior aos demais grupos.

Aos 15 dias, os grupos experimentais e controle evidenciaram maior quantidade de células inflamatórias em relação aos períodos de 30 e 60 dias. (Tabela 2/ gráfico 1). Os espécimes do grupo controle, nos três períodos experimentais, foram os que demonstraram a menor densidade de células inflamatórias. Já os espécimes do Cimento Portland cinza Votoran, apresentaram a

maior densidade de células inflamatórias, com diferenças significantes em relação aos demais materiais e ao grupo controle (tabela 3/tabela 4/tabela 5), nos três períodos experimentais. Não foram constatadas diferenças significantes entre os demais materiais nos períodos avaliados (tabela 3/ tabela 4/ tabela 5). A comparação de todos os grupos experimentais, entre seus períodos, dentro ainda do critério de densidade de células inflamatórias, demonstrou diferença significativa entre 15X30 dias, 15X60 dias e entre 30X60 dias. Essas diferenças estão relacionadas à redução da intensidade da reação inflamatória, indicando a perda gradativa da ação agressiva dos cimentos testados, da mesma forma já observada em outros estudos (MORETTON et al., 2000; MOTTA, 2003; YALTIRIK et al. 2004; SUMER et al. 2006; VOSOUGHHOSSEINI et al., 2008; GOMES-FILHO et al., 2009).

Tem sido relatado que a presença de arsênico no cimento Portland e no MTA é um problema no que diz respeito a biocompatibilidade (ISLAM, CHNG, YAP, 2006b). Embora quantidade significativa de arsênico esteja presente nos diferentes tipos desses materiais (BRAMANTE et al., 2008; DE-DEUS et al., 2009; CHANG et al., 2010), a sua liberação no meio é pequena (DUARTE et al., 2005; DE-DEUS et al., 2009; MATSUNAGA et al., 2010). Assim, o alto conteúdo de arsênico não necessariamente indica sua maior liberação, o que pode ser verificado em nosso estudo, pois o cimento Portland cinza Minetti, apesar de possui maior concentração de arsênico em sua composição em relação aos outros cimentos estudados, não foi o material que apresentou maior resposta inflamatória.

O cimento que apresentou, aos 15 dias, o valor mais baixo de reação inflamatória foi o cimento Portland branco (Irajazinho), com uma média de 3,63%, e a reação inflamatória mais severa foi representado pelo cimento Portland cinza Votoran com média de 10,17% (tabela 2). Uma vez que as reações teciduais são afetadas pela forma e tamanho das partículas do material implantado em estudos histológicos (HWANG et al., 2009), essa diferença de resposta, em nosso estudo, entre os dois tipos de cimento, pode estar relacionado ao tamanho dos cristais, que são maiores no cimento Portland cinza e menores no tipo branco (ASGARY et al., 2005; ASGARY et al. 2006; KOMABAYASHI; SPANGBERG, 2008).

O MTA Angelus® cinza apresentou menor reação inflamatória em relação aos dois cimentos Portland cinzas. Essas diferenças podem ser atribuídas à superfície

química desses materiais após a reação de presa (DAMMASCHKE et al. 2005), pois apesar da semelhança entre ambos, o cimento Portland pode conter algumas impurezas, dependendo de onde o mineral foi extraído, o que pode afetar tanto a sua cristalização como provocar algum tipo de reação (HOLLAND et al., 2000). Já o MTA, segundo PRIMUS (2005) e CAMILLERI (2005), é fabricado sob condições controladas e livre de impurezas.

Em uma pequena porcentagem das amostras foi observada invaginação do tecido conjuntivo para o interior do tubo, causando um maior afluxo de células inflamatórias, com uma maior quantidade de macrófagos e linfócitos nessa região. Foi observado também, extravasamento insignificante de cimento em uma pequena porcentagem das amostras. Este material disperso, em contato com o tecido conjuntivo, causou uma maior concentração de células predominantemente macrofágicas e células gigantes multinucleadas, e estas englobavam os pequenos focos de necrose. Os resíduos de material experimental apresentavam-se nos cortes histológicos como esferas de coloração negra. As partículas do cimento foram classificadas como “material” durante a análise morfológica. Segundo MORAES et al. (2001), quando ocorre esse extravasamento, a área de contato do material com o tecido conjuntivo aumenta e, conseqüentemente, a reação inflamatória é intensificada devido a reação química e física.

Com relação à presença de fibroblastos, ocorreu uma redução na sua quantidade ao longo dos períodos estudados, exceto para o grupo do MTA, que apresentou um pequeno aumento da quantidade de fibroblastos no período de 60 dias (7,8%) (tabela 2), mas sem diferenças significantes em relação ao período de 15 dias (7,0%) (tabela 2/ tabela 6). No período de 15 dias, ocorreram diferenças significantes entre o grupo controle (3,95%) e os cimentos Minetti (7,15%) e MTA (7,0%) (tabela 2/ tabela 3). No período de 30 dias, ocorreram diferenças significantes apenas entre o cimento Votoran (5,94%) e Irajazinho (4,3%) (tabela 2/ tabela 4). No período de 60 dias houve diferenças significantes entre o MTA e os demais cimentos, inclusive o grupo controle (tabela 5). Os cimentos Irajazinho e Minetti apresentaram diferenças significantes entre o período de 15 dias em relação aos períodos de 30 e 60 dias (tabela 7/ tabela 8), apresentando uma maior quantidade de fibroblastos inicialmente, com redução ao longo do tempo. O MTA apresentou uma maior quantidade de fibroblastos no período de 30 dias (gráfico 2), com

diferença significativa em relação aos períodos de 15 e 60 dias (tabela 6). O cimento Votoran apresentou uma menor quantidade de fibroblastos no período de 60 dias (gráfico 2), com diferenças significantes em relação aos períodos de 15 e 30 dias (tabela 9). O grupo controle não apresentou diferenças significantes entre os três períodos (tabela 10). Todos os cimentos e o controle apresentaram reação tecidual equivalente aos 30 dias, sem diferenças significantes (tabela 4). A proliferação fibroblástica mostra o desenvolvimento do processo de reparo, pois sua atividade metabólica está direcionada para os precursores das fibras colágenas (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

O volume das fibras colágenas apresentou diferenças significantes entre o grupo controle e os demais cimentos apenas no período de 60 dias (tabela 5). Os cimentos Votoran, Minetti e MTA apresentaram redução das fibras colágenas no decorrer do tempo, corroborando com o estudo de MAKKES et al. (1977), em que relataram que a redução da cápsula fibrosa é um sinal de biocompatibilidade. Entretanto, houve um aumento gradativo de fibras colágenas proporcionando uma organização da cápsula fibrosa no grupo controle (gráfico 3), corroborando com SCARPARO et al. (2009). Segundo esses autores, essa organização é indicativa do processo de reparo ou envolvimento fibroso do corpo estranho. Não houve diferenças significantes entre os materiais nos períodos de 15 e 30 dias, e nem entre os períodos dos materiais, apenas o grupo controle apresentou diferenças significantes entre os períodos de 15 e 60 dias (tabela 10).

O aporte sanguíneo adequado é a base para a atividade metabólica dos fibroblastos (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000), sendo a associação, neoformação angioblástica e proliferação fibroblástica, fundamental para o processo de reparo. Aos 15, 30 e 60 dias, os grupos experimentais e o controle exibiram neoformação vascular semelhante, sem diferenças significantes exceto apenas para o cimento Votoran em relação ao grupo controle e o cimento Irajazinho. Houve uma maior proliferação no período de 30 dias, mas sem diferença significativa em relação aos períodos de 15 e 60 dias. Essa redução da quantidade de vasos sanguíneos representa um processo de reparo por fibrose em andamento. Ocorre a diminuição da vascularização à medida que ocorre o aumento das fibras colágenas, semelhante ao relatado por SHAHI et al. (2006); MAGRO-KATO (2007); ORTÍZ-OROPEZA (2007).

Foram consideradas outras estruturas presentes no tecido conjuntivo subcutâneo, como focos de necrose e substância fundamental amorfa. Houve diferença significativa entre o grupo controle e os cimentos MTA, Votoran e Minetti no período de 15 dias (tabela 3). No período de 60 dias houve diferença significativa entre o grupo controle e o CP cinza Votoran (tabela 5). Houve diferença significativa no grupo controle entre os períodos de 15 e 60 dias (tabela 10), pois no último período, os espécimes exibiram formação de uma faixa densa e espessa de tecido conjuntivo, ocorrendo uma menor quantidade de substância fundamental amorfa.

Todos os cimentos implantados provocaram reação tecidual caracterizado por resposta inflamatória crônica de leve a moderada, proliferação fibro-angioblástica e formação de fibras colágenas, evidenciando a biocompatibilidade desses materiais ao longo do tempo. Entretanto, apesar da similaridade entre o MTA e o cimento Portland e os bons resultados obtidos em estudos de biocompatibilidade, a adoção do cimento Portland necessita de mais pesquisas, justamente por tratar-se de um material experimental, antes de assegurar sua indicação definitiva em humanos.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, e respeitando-se as limitações da metodologia empregada, é possível concluir que:

1. Todos os cimentos testados provocaram reações teciduais, sendo leve para o MTA Angelus®, CP branco Irajazinho e CP cinza Minetti e, moderada para o CP cinza Votoran.
2. Não existiu relação direta entre a concentração de arsênico presente na composição dos materiais e a intensidade da reação inflamatória.
3. Os cimentos analisados produziram respostas inflamatórias semelhantes, apenas com diferença estatisticamente significativa entre o cimento Portland cinza Votoran e os demais cimentos nos três períodos estudados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abedi HR, Ingle JI. Mineral trioxide aggregate: a review of a new cement. J Calif Dent Assoc. 1995;23(12):36-9.

Abedi HR. The use mineral trioxide aggregate cement (MTA) as a direct pulp capping agent. J Endod. 1996;22(4):199.

Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. Int Endod J. 2003;36(3):225-31.

Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. J Endod. 2005;31(2):101-3.

Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Stowe S, Brink F. A qualitative X-ray analysis of white and grey mineral trioxide aggregate using compositional imaging. J. Mater Sci Mater Med. 2006;17(2):187-91.

Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M, Ghoddusi J, Kheirieh S, Brink F. Comparison of Mineral Trioxide Aggregate's Composition with Portland Cements and a New Endodontic Cement. J Endod. 2009;35(2):243-50.

Bates CF, Carnes DL, Del Rio CE. Longitudinal sealing ability of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. J Endod. 1996;22(11):575-8.

Bernabé PFE, Holland R. Cirurgia Parendodôntica: como praticá-la com embasamento científico. In: Estrela C, *Ciência Endodôntica*. São Paulo, Artes Médicas, 2004. Cap.16, p. 657-797.

Bortolo, MV. 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. 173p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

Bramante C, Bortoluzzi E, Broon N. Agregado trióxido mineral (MTA) como plug para la obturación de conductos radiculares: descripción de la técnica y caso clínico. Endodoncia. 2004;22(3):155-61.

Bramante CM, Demarchi AC, de Moraes IG, Bernadineli N, Garcia RB, Spångberg LS, Duarte MA. Presence of arsenic in different types of MTA and white and gray portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(6):909-13.

Burguera M, Burguera JL., Brunetto MR, de la Guardia M, Salvador A. *Anal. Chim. Acta* 1991;261:105. In: *Especiação de Arsênio – Uma Revisão.* Química Nova 2000;23(1).

Caicedo R, Becerra P, Bonilla SM. Effect of different endodontic materials on cellular fibroblasts. *J Endod.* 2000;26(9):554./Abstract n.06.

Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater.* 2005;21(4):297-303.

Chang SW, Shon WJ, Lee WC, Kum KY, Seung HB, Kwang SB. Analysis of heavy metal contents in gray and white MTA and 2 kinds of Portland cement: a preliminary study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(4):642-6.

Cintra LT, Bernabé PF, de Moraes IG, Gomes-Filho JE, Okamoto T, Consolaro A et al. Evaluation of subcutaneous and alveolar implantation surgical sites in the study of the biological properties of root-end filling endodontic materials. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(1):75-82.

Costa CAS. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: *Metodologia Científica. Ensino e Pesquisa em Odontologia.* 2001. p.143-160.

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

Coutinho-Filho T, De-Deus G, Klein L, Manera G, Peixoto C, Gurgel-Filho ED. Radiopacity and histological assessment of Portland cement plus bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(6):e69-77.

Dammaschke T, Gerth HU, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dental Mater.* 2005;21(8):731-8.

Deal BF, Wenckus CS, Johnson BR, Fayad MI. Chemical and physical properties of MTA, Portland cement, and a new experimental material Fast-Set MTA. *J Endod.* 2002;28(3):252./Abstract n.70.

De-Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, Plotkowski MC, Coutinho-Filho T.I. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ecv 304 endothelial cells. *Int Endod J.* 2005;38(9):604-9.

De-Deus G, Petruccelli V, Gurgel-Filho E, Coutinho-Filho T. MTA versus Portland cement as repair material for furcal perforations: a laboratory study using a polymicrobial leakage model. *Int Endod J.* 2006;39(4):293-8.

De-Deus G, de Souza MC, Sergio Fidel RA, Fidel SR, de Campos RC, Luna AS. Negligible expression of arsenic in some commercially available brands of Portland cement and mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2009;35(6):887-90.

Duarte MA, De Oliveira Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, De Campos Fraga S. Arsenic release provided by MTA and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99(5):648-50.

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.

ElDeeb ME, ElDeeb M, Tabibi A, Jensen JR. An evaluation of the use of amalgam, Cavit, and calcium hydroxide in the repair of furcation perforations. *J Endod.* 1982;8:459-66

Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pécora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, Portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Bras Dent J.* 2000;11(1):3-9.

Faraco Junior IM, Holland R. Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J.* 2004;15(2):104-8.

Ferraz SL, Birman EG, Antoniazzi JH, Magalhães JF. Estudo da histocompatibilidade de cimento endodôntico no tecido conjuntivo subcutâneo utilizando três metodologias. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1990;4(3):241-6.

Ferris DM, Baumgartner JC. Perforation repair comparing two types of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2004;30(6):422-4.

Fisher EJ, Arens DE, Miller CH. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and super EBA as a root-end filling material. *J Endod.* 1998;24(3):176-9.

Friend LA, Browne RM. Tissue reactions to some root filling materials. Br Dent J. 1968;125(7):291-8.

Funteas UR, Wallace JA, Fochtman FW. A comparative analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. J Endod. 2002;28(3):259. /Abstract n.21.

Glickman GN, KOCH, K. 21ST – Century Endodontics. J Am Dent Assoc. 2000; 131(1).Supplement:39S-46S.

Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PF, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. J Endod. 2009;35(2):256-60.

Gomes-Filho JE, Rodrigues G, Watanabe S, Estrada Bernabé PF, Lodi CS, Gomes AC, et al. Evaluation of the tissue reaction to fast endodontic cement (CER) and Angelus MTA. J Endod. 2009a;35(10):1377-80.

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

Guarienti D, Osinaga PWR, Figueiredo JAP. Avaliação química e estrutural comparativa entre o cimento Portland e o MTA. Braz Oral Res. 2002;16:190.Supplement. /Abstract n. Pb167.

Haglund R, HE J, Jarvis J, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages *in vitro*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003;95(6):739-45.

Hammad HM, Hamadah MA, Al-Omari WM. Histological evaluation of rat tissue response to GMTA, Retroplast, and Geristore retrograde filling materials. Aust Endod J. 2011;37(1):18-25.

Hardy I, Liewehr FR, Joyce AP, Agee K, Pashley DH. Sealing ability of One-Up Bond and MTA with and without a secondary seal as furcation perforation repair materials. J Endod 2004;30(9):658-61.

Holland R. et al. Resposta tecidual a implantação de diferentes marcas de cones de guta-percha. Estudo histológico em ratos. Rev Fac Odontol Araçatuba. 1975;4(1):81-90.

Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes with Mineral Trioxide Agregate or calcium hydroxide. J. Endod. 1999b;25(3):161-6.

Holland R, de Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with Mineral trioxide agregate, Portland Cement or calcium hydroxide. Braz Dent J. 2001a;12(1):3-8.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Jr E. Reaction of dogs`teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. J Endod. 1999;25(11)c:728-30.

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

Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E. Agregado de trióxido mineral y cemento Portland en la obturación de conductos radiculares de perro. Endodoncia 2001c;19(4):275-80.

Holland R, Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PF, Junior ED. Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. J Endod. 2001d;27(4):281-4.

Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PFE, Otoboni Filho JÁ, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. Braz Dent J. 2002;13(1):23-26.

Hong CU, Mckendry DJ, Pitt Fodr M, Torabinejad M. Healing of furcal lesions repaired by amalgam or mineral trioxide aggregate. J Endod. 1994;20(7):197./Abstract n.37.

Hughes MF. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. Toxicol Lett. 2002;133(1):1-16.

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.

Hwang YC, Lee SH, Hwang IN, Kang IC, Kim MS, Kim SH, Son HH, Oh WM. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107(3):e96-e102.

Ingle JI. A standardized endodontic technique utilizing newly designed instruments and filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1961;14:83-91.

Islam I, Chng HK, Yap AU. Comparison of the physical and mechanical properties of MTA and Portland cement. *J Endod.* 2006a;32(3):193-7.

Islam I, Chng HK, Yap AU. X-ray difracion analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Int Endod J.* 2006b;39(3):220-5.

Juárez Broon N, Bramante CM, de Assis GF, Bortoluzzi EA, Bernardineli N, de Moraes IG, Garcia RB. Healing of root perforations treated with mineral trioxide aggregate (MTA) and Portland cement. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(5):305-11.

Junn DJ, McMillan P, Bakland LK, Torabinejad M. Quantitative assessment of dentin bridge formation following pulp capping with mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 1998;24(4):278./Abstract.

Keiser K, Johnson CC.; Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod.* 2000;26(5):288-91.

Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, Brady K, McDonald F. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res.* 1997;37(3):432-9.

Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 1998;24(8):543-7.

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

Komabayashi T, Spångberg LSW. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and portland cement: a study with a flow particle image analyzer. *J Endod.* 2008;34(1):94-8.

Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Economides NA, Beltes P, Kortsaris AH. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three fibroblastic cell lines. *J Endod.* 2005;31(1):44-6.

Kowalski R. Estudo comparativo da resposta histológica ao implante submucoso em ratos de cimento agregado trióxido mineral (MTA) de duas marcas comerciais. *Odontol Clin Cient.* 2004;3(1):17-24.

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

Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate of repair of lateral root perforations. J Endod. 1993;19(11):541-4.

Leonardo MR, Utrilla LS, Rothier A, Leonardo RT e 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.

Magro-Kato, Márcia Maria. Avaliação microscópica da implantação, em subcutâneo de ratos, do agregado trióxido mineral - CPM e do clínquer do cimento Portland branco puro e acrescido de 2 e 5% de sulfato de cálcio e determinação de seus tempos de presa. Dissertação (Mestrado). 234p. Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo. Bauru, 2007.

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

Mandal BK, Suzuki KT. Arsenic round the world: a review. Talanta. 2002 16;58(1):201-35.

Matsunaga T, Tsujimoto M, Kawashima T, Tsujimoto Y, Fujiwara M, Ookubo A, Hayashi Y. Analysis of Arsenic in Gray and White Mineral Trioxide Aggregates by Using Atomic Absorption Spectrometry. J Endod. 2010;36(12):1988-90.

Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cement as wound dressings. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;33(2):163-6.

Min KS, Kim HI, Park HJ, Pi SH, Hong CU, Kim EC. Human pulp cells response to Portland cement *in vitro*. J Endod. 2007;24(3):184-6.

Mitchell PJ, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. Biomaterials. 1999;20(2):167-73.

Moraes SH, Aragão EM, Heck AR. Reação do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao implante do cimento Portland. J Bras Endod. 2001;2(7):326-9.

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.

Moretton TR, Brown CE Jr, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res.* 2000;52(3):528-33.

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

Motta AG, Lopes HP, Corrêa TJS, Pinheiro AR, Rebouças AAP. Reação do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao MTA e ao hidróxido de cálcio. *Rev. Bras Odontol.* 2003;60(4):274-6.

Myers K, Kaminski E, Lautenschlager E, Miller D. The effects of mineral trioxide aggregate on the dog pulp. *J Endod.* 1996;22(4):184-6. /Abstract. n.39/

Nakata TT, Bae KS, Baumgartner JC. Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. *J Endod.* 1998;24(3):184-6.

Noetzel J, Ozer K, Reissbauer BH, Anil A, Rössler R, Neumann K, Kielbassa AM. Tissue response to an experimental calcium phosphate cement and mineral trioxide aggregate as materials for furcation perforation repair: a histological study in dogs. *Clin Oral Investig.* 2006;10(1):77-83.

Oliveira MG, Xavier CB, Demarco FF, Pinheiro AL, Costa AT, Pozza DH. Comparative Chemical Study of MTA and Portland Cements. *Braz Dent J.* 2007;18(1):3-7.

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

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%. 219p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2007.

Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod.* 1998;24(2):91-6.

Parirokh M, Mirsoltani B, Raoof M, Tabrizchi H, Haghdoost AA. Comparative study of subcutaneous tissue responses to a novel root-end filling material and white and grey mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2011;44(4):283-9.

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

Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;107(3):e96-e102.

Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Mineral trioxide aggregate as a pulp capping material. *J Am Dent Assoc*. 1996;127(10):1491-4.

Primus CM. Comments on "arsenic release provided by MTA and Portland cement" by Duarte MA, et al. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(4):416-7.

PRO ROOT MTA (Mineral Trioxide Aggregate) Root canal repair material water: directions for use. Tulsa, Dentsply-Maillefer, Tulsa Dental, 2002.

Reyes-Carmona JF, Santos AS, Figueiredo CP, Baggio CH, Felipe MC, Felipe WT, et al. Host-mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. *J Endod*. 2010;36(8):1347-53.

Ribeiro DA, Duarte MA, Matsumoto MA, Marques ME, Salvadori DM. Biocompatibility *in vitro* tests of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements. *J Endod*. 2005;31(8):605-7.

Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and White Portland cements on chinese hamster ovary (CHO) cells *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(2):258-61.

Safavi K, Nichols FC. Secretion of PGE₂ from monocytes exposed to MTA or Portland cement. *J Endod*. 2000;26(9):540./Abstract n. 18.

Saidon, J. et al. Tissue reaction to implanted mineral trioxide aggregate or Portland cement. *J Endod*. 2002;28(3):308./Abstract n. 52.

Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(4):483-9.

Scarpato RK, Haddad D, Acasigua GA, Fossati AC, Fachin EV, Grecca FS. Mineral trioxide aggregate-based sealer: analysis of tissue reactions to a new endodontic material. *J Endod.* 2010;36(7):1174-8.

Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA. Mineral trioxide aggregate: a new material for endodontics. *J Am Dent Assoc.* 1999; 130(7):967-75.

Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, McMillan P. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod.* 1999;25(1):1-5.

Shahi S, Rahimi S, Lotfi M, Yavari H, Gaderian A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. *J Endod.* 2006;32(8):776-80.

Scheerer SQ, Steiman HR, Cohen JA. Comparative evaluation of three root-end filling materials: an in vitro leakage study using *Prevotella nigrescens*. *J Endod.* 2001;27(1):40-2.

Schembri M, Peplow G, Camilleri J. Analyses of Heavy Metals in Mineral Trioxide Aggregate and Portland Cement. *J Endod.* 2010;36(7):1210-15.

Shin S, Chen I, Li D, Nah H, Kim S. Biocompatibility and mitogenic effect of several root-end filling materials in osteoblast and odontoblast cultures. *J Endod.* 2003;29(4):306./Abstract n. 29.

Shahi S, Rahimi S, Yavari HR, Mokhtari H, Roshangar L, Abasi MM, et al. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. *J Endod.* 2010;36(5):899-903.

Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod J.* 2007;40(3):186-97.

Sipert CR, Hussne RP, Nishiyama CK, Torres SA. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. *Int Endod J.* 2005;38(8):539-43.

Soares I. Resposta Pulpar ao MTA – Agregado de Trióxido Mineral-comparada ao hidróxido de cálcio, em pulpotomias. Histológico em cães. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 1996.

Song JS, Mante FK, Romanow WJ, Kim S. Chemical analysis of powder and set forms of Portland cement, gray ProRoot MTA, and gray MTA-Angelus. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;12(6):809-815.

Spangberg L, Langeland K. Biologic effects of dental materials. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells *in vitro*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1973;35(3):402-14.

Steffen R, van Waas H. Understanding mineral trioxide aggregate/Portland-cement: A review of literature and background factors. Eur Arch Paediatr Dent. 2009;10(2):93-7.

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.

Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. *In vitro* antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. J Oral Sci. 2007;49(1):41-5.

Thomson, T.S. et al. Osteocalcin expression by cementoblasts attached to mineral trioxide aggregate. J Endod. 2001;27(3):Abstract n.42.

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

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

Torabinejad M, Higa RK, Mckendry DJ, Pitt Ford TR. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. J Endod 1994;20(4):159-63.

Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root end filling material. J Endod. 1995;21(7):349-53.

Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J. Endod.* 1995;21(3):109-12.

Trindade AC, Oliveira EPM, Figueiredo JAP. Análise comparativa da resposta tecidual ao agregado trióxido mineral (MTA) e ao cimento Portland, isolado e acrescido de substância radiopacizante. *J Bras Endod.* 2003;4(15):309-14.

Vosoughhosseini S, Lotfi M, Shahi S, Baloo H, Mesgariabbasi M, Saghiri MA, et al. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. *J Endod.* 2008;34(6):715-7.

Weldon JK Jr, Pashley DH, Loushine, RJ, Weller RN, Kimbrough WF. Sealing ability of mineral trioxide aggregate and super-EBA when used as furcation repair materials: a longitudinal study. *J Endod.* 2002;28(6):467-70.

Wu MK, Kontakiotis EG, Wesselink PR. Long-term seal provided by some root-end filling materials. *J Endod.* 1998;24(8):557-60.

Wucherpfenning AL, Green DB. Mineral trioxide vs. Portland cement: two biocompatible filling materials. *J Endod.* 1999;25(4):308. /Abstract n. 40.

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.

Yildirim T, Gencoglu N, Firat I, Perk C, Guzel O. Histologic study of furcation perforations treated with MTA or Super EBA in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(1):120-4.

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

Zhu Q, Haglund R, Safavi KE, Spangberg LS Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *J Endod.* 2000;26(7):404-6.

A *NEXO*

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

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

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 024/2009

Bauru, 18 de setembro de 2009.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado ***"Avaliação microscópica de reação tecidual de subcutâneo de rato frente a cimentos Portland contendo diferentes concentrações de arsênico"***, de autoria de Paloma Gagliard Minotti, 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,

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

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

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 024/2009

Bauru, 12 de abril de 2011.

Senhor Professor,

Em atenção à solicitação de alteração no título do projeto de pesquisa **“Avaliação microscópica de reação tecidual de subcutâneo de rato frente a cimentos Portland contendo diferentes concentrações de arsênico”** de autoria de Paloma Gagliard Minotti Marina Angélica Marciano da Silva, CD. Raquel Zanin Midená e CD. Bruno Cavalini Cavenago, sob sua orientação, para **AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DA REAÇÃO TECIDUAL EM SUBCUTÂNEO DE RATO FRENTE A CIMENTOS PORTLAND CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ARSÊNICO**, informamos a aprovação por esta Comissão, considerando não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Clovis Monteiro Bramante

Docente do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Dentários