LUÃ LOPES BORGES

**RESPOSTA TECIDUAL APÓS IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE DIFERENTES
CIMENTOS À BASE DE IONÔMERO DE VIDRO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva

Autorização para reprodução

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Borges, Luã Lopes

Resposta tecidual após implantante subcutâneo de diferentes cimentos à base de ionômero de vidro. Ribeirão Preto, 2018.

69p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva

1.Cimento de Ionômero de Vidro; 2.Camundongos Isogênicos;
3.Tecido conjuntivo subcutâneo; 4.Resposta Tecidual

FOLHA DE APROVAÇÃO

NOME: LUÃ LOPES BORGES

TÍTULO: RESPOSTA TECIDUAL APÓS IMPLANTE SUBCUTÂNEO DE DIFERENTES CIMENTOS À BASE DE IONÔMERO DE VIDRO

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES
LUÃ LOPES BORGES

Nascimento	05/02/1992
Filiação	Alberto Tadeu Nascimento Borges e Zobélia Maria de Souza Lopes
2010-2014	Curso de Graduação Faculdade do Amazonas – Instituto Amazônia de Ensino Superior (IAES)
2013-2014	Curso de Atualização em Cirurgia Oral Menor - Faculdade do Amazonas – Instituto Amazônia de Ensino Superior (IAES)
2014 - 2016	Pós-Graduação em Implantodontia - Faculdade do Amazonas – Instituto Amazônia de Ensino Superior (IAES)

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Reitor, Prof. Dr. Vahan Agopyan, e do Vice-Reitor, Prof. Dr. Antônio Carlos Hernandes.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual Diretora, Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva, e do Vice-Diretor, Prof. Dr. Arthur Belém Novaes Júnior.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato e da Vice-Coordenadora Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva.

Aos professores do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas, Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Profa. Dra. Andara De Rossi Daldegan, Prof. Fabricio Kitazono de Carvalho, Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano, Profa. Dra. Lea Assed Da Silva, Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Da Silva, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Profa. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani.

Aos Funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto: Marília Pacífico Lucisano, Nilza Letícia Magalhães, Carolina Paes Torres Mantovani, Marco Antônio dos Santos, Francisco Wanderley Garcia De Paula E Silva, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Matheus Morelli Zanela e Filomena Leli Placciti,

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Antônio Massaro, Raphael Martini Vicente e Edson Campos dos Santos .

Aos colegas da Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado força e saúde para enfrentar os desafios.

Aos meus pais Alberto Tadeu Borges e Zobelía Lopes por direcionar-me sempre para agir com amor, respeito, carinho e ética.

À Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, minha orientadora, pela sua valiosa orientação e direcionamento da minha vida profissional, como fez com tantos outros colegas que tiveram o privilégio de por ela serem orientados. Não é simples humanizar o Ensino e formar profissionais cada vez mais fraternos, justos, éticos e humanos e a Dra Léa conhece e tem habilidade para mostrar esses caminhos. Me sinto muito honrado e agradecido a ela por ter me recebido e orientado não só como aluno, mas como pessoa, entendendo a minha forma de ser e me direcionando pelos caminhos maravilhosos do bem. Meu muitíssimo obrigado pelos seus ensinamentos.

À Carolina Maschietto Pucinelli, a minha mais profunda gratidão pela sua contribuição na minha formação, por compreender e aceitar minhas dificuldades em momentos difíceis para mim. Obrigado Carolina! Você é uma luz que continuará a brilhar e contribuir em prol de uma Odontologia de excelência.

Borges, LL. **Resposta tecidual após implante subcutâneo de diferentes cimentos à base de ionômero de vidro.** Ribeirão Preto, 2018. 69p.

RESUMO

O Cimento de Ionômero de Vidro (CIV) é um material restaurador utilizado na Odontologia Minimamente Invasiva pois, além de apresentar propriedade adesiva à estrutura dental, apresenta propriedades tais como liberação e absorção de íons flúor, compatibilidade biológica com os tecidos bucais e coeficiente de expansão térmica similar ao da dentina. No entanto, o CIV apresenta baixa resistência mecânica, alta suscetibilidade à perda e ao ganho de água nas primeiras 24 horas (sinérese e embebição), período prolongado de presa e polimento ruim. Apesar desse material ter sido introduzido na Odontologia há mais de 40 anos, sua fórmula original vem sofrendo alterações, com o objetivo principal de aprimorar as propriedades mecânicas e alcançar melhores resultados clínicos. Dentre os CIV convencionais, destaca-se o EQUIA® Forte Fil (GC Corporation, Tokyo, Japan), material elaborado com o objetivo de aprimorar as características físicas e estéticas do seu antecessor EQUIA® Fil. No entanto, até o momento não existem trabalhos biológicos avaliando o desempenho do EQUIA™ Forte e Ketac™ Universal Aplicap™. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos isogênicos após implante de diferentes cimentos de ionômero de vidro (EQUIA® Forte Fil, EQUIA® Fil e Ketac™ Universal Aplicap™). Foram utilizados 87 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c divididos em 12 grupos, sendo 9 experimentais (Ketac, E. Fil e E. Forte nos períodos de 7, 21 e 63 dias) e 3 controles (tubos de polietileno vazios, nos mesmos períodos). Decorridos os períodos experimentais, a porção do tecido conjuntivo subcutâneo circundante ao material implantado foi removida e submetida ao processamento histotécnico e à coloração com hematoxilina e eosina. Foi realizada a descrição da reação tecidual em contato com cada material, análise semi-quantitativa do fibrosamento e do infiltrado inflamatório e análise quantitativa da espessura do tecido reacional granulomatoso em contato com o material testado ou tubo de polietileno. Os dados foram analisados estatisticamente ($\alpha=0,05$), utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo Pós-teste de Dunn. Inicialmente, o fibrosamento não foi diferente entre os materiais testados ($p>0,05$), porém passou a ser diferente aos 21 dias, com o controle apresentando o estágio mais avançado de fibrosamento, e chegando ao final do experimento com o Grupo EQUIA® Forte Fil com estágio mais avançado de fibrosamento, em comparação ao grupo EQUIA® Fil ($p<0,05$). O infiltrado inflamatório, por sua vez, não apresentou diferença entre os materiais testados ao longo dos períodos experimentais ($p>0,05$). A área do tecido reacional

granulomatoso foi maior para o Grupo E. Forte, diferindo do controle em todos os períodos avaliados ($p < 0,05$). De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que todos os cimentos à base de ionômero de vidro testados apresentaram compatibilidade tecidual, de acordo com os diferentes parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Cimento de Ionômero de Vidro, Camundongos Isogênicos, Tecido conjuntivo subcutâneo, Resposta Tecidual

Borges, LL. **Tissue response after subcutaneous implantation of different glass ionomer based cements.** Ribeirão Preto, 2018. 69p.

ABSTRACT

The Glass Ionomer Cement (GIC) is a restorative material used in Minimally Invasive Dentistry. Besides it presenting adhesive properties to the dental structure, GIC has properties such as release and absorption of fluoride ion, biological compatibility with buccal tissues and expansion coefficient similar to that of dentin. However, GIC presents low mechanical resistance, high susceptibility to loss and water gain in the first 24 hours (syneresis and imbibition), prolonged setting time and poor polishing. Although this material was introduced in Dentistry more than 40 years ago, its original formula has undergone changes, with the main objective of improving the mechanical properties and achieving better clinical results. Among the conventional GIC, we highlight EQUIA® Forte Fil, a material developed with the aim of improving the physical and aesthetic characteristics of its predecessor EQUIA® Fil. However, there are no biologic researches evaluating the performance of EQUIA® Forte and Ketac™ Universal Aplicap™. The aim of this study was to evaluate the subcutaneous connective tissue response of isogenic mice after implanting different glass ionomer cements (EQUIA® Forte Fil, EQUIA® Fil and Ketac™ Universal Aplicap™). Eighty-seven isogenic mice of the BALB/c were divided into 12 groups, 9 were experimental (Ketac, E. Fil and E. Forte at 7, 21 and 63 days) and 3 controls (empty polyethylene tubes at the same experimental time). After the experimental periods, the portion of the subcutaneous connective tissue surrounding the implanted material was removed and subjected to histotechnical processing and staining with hematoxylin and eosin. A description of the tissue reaction in contact with each material, semi-quantitative analysis of collagen fiber formation and inflammatory infiltrate and quantitative analysis of the tissue thickness of the granulomatous reaction tissue in contact with the tested material or polyethylene tube were performed. Data were analyzed statistically ($\alpha=0.05$) using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dunn Post test. Initially, the collagen fiber formation was not different between the tested materials ($p>0.05$), but it became different at 21 days, with the control presenting the most advanced stage of collagen fiber formation, and reaching the end of the experiment with the EQUIA® Forte Fil group with a more advanced stage of collagen fiber formation, compared to the EQUIA® Fil group ($p<0.05$). Inflammatory infiltrate, on the other hand, showed no difference between the materials tested during the experimental periods ($p>0.05$). The tissue thickness was larger for the EQUIA® Forte Fil

group, differing from the control group in all evaluated periods ($p < 0.05$). According to the results obtained, it was concluded that all the glass ionomer - based cements tested showed tissue compatibility, according to the different parameters evaluated.

Keywords: Glass Ionomer Cement, Isogenic Mice, Subcutaneous Connective Tissue, Tissue Response.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. PROPOSIÇÃO.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Análise microscópica descritiva.....	35
4.2. Análise microscópica semi-quantitativa.....	46
4.3. Análise quantitativa.....	48
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÃO.....	57
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO.....	67

1.Introdução

---

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, acreditou-se que o tratamento cirúrgico-restaurador fosse o tratamento ideal para lesões de cárie, com a eliminação de todo o tecido acometido, confecção de uma cavidade geométrica e restauração dessa cavidade (Mount e Ngo, 2000; Dalli *et al.*, 2012). Entretanto, com o decorrer do tempo e com o melhor entendimento da doença cárie, observou-se que apenas a restauração da cavidade não era suficiente para curar a doença (White e Eakle, 2000).

A Odontologia minimamente invasiva é uma filosofia de abordagem baseada em evidências científicas para o tratamento da doença cárie (Mount, 1991; Tyas *et al.*, 2000; Frencken, 2017; Mackenzie e Banerjee, 2017; Walsh, 2017). Esta filosofia é caracterizada por um conjunto de procedimentos que integra a prevenção, a preservação da estrutura dental e, quando necessário, uma abordagem cirúrgica menos invasiva e com a remoção de uma quantidade mínima de tecido sadio (Dalli *et al.*, 2012; Frencken, 2017; Walsh, 2017). A avaliação de risco, a implementação de procedimentos preventivos, a detecção e tratamento precoce de lesões não cavitadas e uso de técnicas de restauração minimamente invasivas em lesões já cavitadas são procedimentos básicos para essa filosofia de tratamento (Featherstone e Doméjean, 2012).

Para todos esses procedimentos estão disponíveis, atualmente, inúmeros dispositivos e materiais odontológicos. Como exemplo, pode-se citar que, para a detecção de lesões de cárie, além da inspeção visual, tátil e a radiografia, pode-se empregar imagens de câmaras fluorescentes, como o Spectra (Air Techniques, Melville, EUA), ou o laser fluorescente, como o DIAGNOdent (KaVo, Biberach, Germany) (Markowitz e Carey, 2018).

Agentes remineralizadores também vêm sendo estudados. Combinações de flúor com diamino de prata, nitrato de prata ou estanho têm demonstrado bons resultados (Featherstone *et al.*, 2018). Outros agentes como CPP-ACP (Fosfopeptídeo de caseína-Fosfato de cálcio amorfo - MI Paste; Recaldent^{TM} GC Corporation Tokyo, Japan) tem demonstrado superioridade em relação ao dentifrício fluoretado comum (Sitthisettapong *et al.*, 2015). Agentes como o Fosfato β -tricálcico (Karlinsky e Pfarrer, 2012), Vidro Bioativo contendo Fosfossilicato de Cálcio e Sódio (Wang *et al.*, 2016) e o Trimetafosfato de sódio (Takeshita *et al.*, 2016) têm, também, apresentado resultados promissores.

Observou-se, assim, que a abordagem minimamente invasiva da doença cárie deve ser o principal objetivo do cirurgião-dentista (Tyas *et al.*, 2000; Frencken, 2017; Mackenzie e Banerjee; 2017; Walsh; 2017). Embora o tratamento restaurador seja em muitos casos desnecessário, quando há lesão de cárie cavitada se faz necessária a remoção do tecido infectado, seguido do preenchimento da cavidade com materiais restauradores adequados (Gao *et al.*, 2000; Frencken, 2017; Mackenzie e Banerjee; 2017).

Para a remoção de tecido cariado, outras tecnologias podem ser utilizadas, como alternativa à remoção com motores de baixa rotação e brocas convencionais, incluindo a utilização do laser (Montedori *et al.*, 2016), brocas de polímero as quais tendem remover menos quantidade de tecido dental sadio (Aswathi *et al.*, 2017) e agentes químicos como o Carisolv® (MediTeam, Goteborg, Sweden) (Alhumaid *et al.*, 2017).

Por outro lado, os materiais restauradores utilizados devem ser, preferencialmente, adesivos, uma vez que necessitam de um desgaste mínimo de tecido sadio (Moraschini *et al.*, 2015). Dentre estes materiais, destaca-se o Cimento de Ionômero de Vidro (CIV) pois, além de apresentar propriedade adesiva à

estrutura dental, é de uso extremamente versátil por apresentar propriedades tais como liberação e absorção de íons flúor (Dionysopoulos *et al.*, 2013), compatibilidade biológica com os tecidos bucais (Tamilselvam *et al.*, 2013; Gorseta e Glavina, 2017) e coeficiente de expansão térmica similar ao da dentina (Yan *et al.*, 2007; Gorseta e Glavina, 2017).

O termo “cimento de ionômero de vidro” é aplicado aos materiais que, para sua presa, apresentam uma reação ácido-base. Sua apresentação convencional é sob a forma de pó e líquido, os quais podem ser misturados manualmente com auxílio de espátula e placa de vidro ou, então, o material pode apresentar-se previamente dosado sob a forma de cápsulas. Geralmente o pó é composto de sílica (SiO), alumina (Al₂O₃) e fluoreto de cálcio (CaF₂), apresentando um caráter básico. O líquido, por sua vez, é composto de ácido policarboxílico e ácido itacônico, tricarbálico, maléico ou tartárico (Nicholson e Croll, 1997; Sidhu e Nicholson, 2016).

Os CIVs podem ser classificados de acordo com o seu uso clínico (Tay e Lynch, 1989), em: Tipo I – para a cimentação de coroas, próteses e bandas ortodônticas; Tipo II – para restauração; Tipo III – para forramento, base e como selante de fossas e fissuras; e Tipo IV – modificados por resina, que abrangem todas as indicações.

As principais indicações para a utilização do cimento de ionômero de vidro são restaurações Classes I, II, III e V em dentes decíduos, restaurações Classes III e V em dentes permanentes, restaurações provisórias e para tratamento restaurador atraumático (Al-Angari *et al.*, 2014).

Apesar desse material ter sido introduzido na Odontologia há mais de 40 anos, sua fórmula original vem sofrendo alterações, com o objetivo principal de aprimorar as propriedades mecânicas e alcançar melhores resultados clínicos (Rai *et*

al., 2017). Além da baixa resistência mecânica, outras desvantagens do CIV são alta suscetibilidade à perda e ao ganho de água nas primeiras 24 horas (sinérese e embebição), período prolongado de presa e polimento ruim (McCabe *et al.*, 1979; Al-Angari *et al.*, 2014). Assim, surgiram os CIVs reforçados por metais e os CIVs modificados por resina (Almuhaiza, 2016).

O CIV modificado por resina consiste na adição de partículas de resina, tais como 2-HEMA ou bisfenol A glicidil metacrilato (bis-GMA), à formulação do CIV convencional, proporcionando aumento do tempo de trabalho, facilidade na manipulação e melhora das propriedades físicas e estéticas, quando comparadas ao CIV convencional (Rai *et al.*, 2017). No entanto a liberação e absorção de flúor, uma das propriedades mais desejáveis do CIV convencional, ficou prejudicada no CIV modificado por resina (Bansal e Bansal, 2015).

Dentre os cimentos de ionômero de vidro convencionais, destaca-se o Ketac™ Universal Aplicap™ (3M ESPE, Alemanha). No trabalho *in vitro* de Alrahlah (2018), o Ketac™ Universal Aplicap™ apresentou os maiores números após realização da dureza Vickers quando comparados a Tetric N-Ceram (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) SDR Dentsply Caulk (Milford, DE, USA), ACTIVA bioactive (Pulpdent, Germany) e GC Fuji II (LC GC Corporation, Japan). Entretanto, até o momento não existem trabalhos publicados na literatura avaliando o desempenho deste cimento, *in vivo*, tornando necessários estudos biológicos, previamente à sua indicação para o uso clínico.

Outro destaque entre os cimentos ionoméricos convencionais é o EQUIA® Fil (GC Corporation, Tokyo, Japan). Em estudo de coorte retrospectivo Friedl *et al.* (2011) observaram que quando o EQUIA® Fil foi utilizado em Classes I e pequenas Classes II apresentou-se clinicamente aceitável após 2 anos. Em um estudo *in vitro* realizado por Al-Angari *et al.* (2014), foi demonstrado que o EQUIA®

Fil apresentou alta resistência à fratura o que indica que este material pode ser utilizado em áreas de alto nível de estresse.

A adaptação marginal às paredes e a formação de espaços vazios entre o material e a cavidade de diferentes materiais, dentre eles o EQUIA® Fil, foram avaliados em restaurações classe II de dentes decíduos. Os autores concluíram que o EQUIA® Fil apresentou boa adaptação às paredes da cavidade, com menos etapas para a aplicação e menor tempo operatório, quando comparado ao Vitremer® (Gaintantzopoulou *et al.*, 2017).

Em um estudo clínico randomizado acompanhado por 4 anos, o EQUIA® Fil foi comparado à resina composta "Gradia Direct Posterior", para realização de restaurações classe I e II, em dentes permanentes. Ambos os materiais apresentaram resultados clínicos semelhantes e satisfatórios, no período avaliado (Gurgan *et al.*, 2015). Em outro estudo clínico randomizado, acompanhado pelo mesmo período de tempo, foram avaliados 1001 dentes permanentes restaurados com EQUIA® Fil e com Fuji IX GP, em restaurações classe I e II. Ambos os materiais apresentaram resultados satisfatórios, similares em restaurações classe I; por outro lado, quando as restaurações classe I e II foram avaliadas conjuntamente, o EQUIA® Fil apresentou melhores resultados, com menos falhas nos períodos de acompanhamento. Entretanto, a porcentagem de restaurações insatisfatórias de classe II envolvendo três faces foi alta para os dois materiais avaliados (Klinke *et al.*, 2016).

O EQUIA® Fil também foi comparado com outros materiais quanto à sua radiopacidade (Yasa *et al.*, 2015), e atendeu os requisitos exigidos pela "International Organization for Standardization (ISO)" e pelo "American National Standard Institute (ANSI/ADA)". Entretanto, com o objetivo de aprimoramento de suas características físicas e estéticas em 2015, foi lançado no comércio

especializado o EQUIA® Forte Fil. Segundo informações do fabricante, esse material consiste em partículas de vidro ultra-finas e altamente reativas, dispersas na estrutura convencional do ionômero de vidro. Além disso, o ácido poliacrílico usado possui maior peso molecular, o que leva a um sistema restaurador de alta resistência.

No entanto, há poucos trabalhos publicados na literatura avaliando o EQUIA® Forte Fil. Yasa *et al.* (2015) e Van Duinen *et al.* (2016) avaliaram o aumento da temperatura pulpar ocasionado no momento da reação de presa do material. No entanto, os resultados obtidos nesses dois trabalhos foram contraditórios, pois enquanto um estudo mostrou grande aumento da temperatura e recomendou cautela no uso dos materiais foto-ativados (Yasa *et al.*, 2015), o outro concluiu que o aumento da temperatura ocasionado foi seguro, sem risco de ocasionar danos patológicos no tecido pulpar (Van Duinen *et al.*, 2016). Adicionalmente, até o momento não existem trabalhos publicados na literatura específica avaliando o desempenho do EQUIA® Forte Fil, *in vivo*, tornando necessários estudos biológicos, a fim de fornecer subsídios para o seu uso clínico.

2. Proposição

2.PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar diferentes cimentos de ionômero de vidro (EQUIA® Forte Fil, EQUIA® Fil e Ketac™ Universal Aplicap™), com relação às propriedades biológicas, por meio da avaliação da resposta tecidual, em microscopia óptica, após implante dos materiais no tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos isogênicos.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes cimentos à base de ionômero de vidro: EQUIA® Forte Fil (GC Corporation, Tokyo, Japão), EQUIA® Fil (GC Corporation, Tokyo, Japão) e Ketac™ Universal Aplicap™ (3M ESPE, Alemanha) (Tabela 1), manipulados de acordo com a recomendação de cada fabricante.

Tabela 1. Informações dos Cimentos Ionômero de Vidro utilizados para a avaliação da resposta tecidual após implante em camundongos isogênicos

Material	Fabricante	Classificação	Tipo de Vidro	Proteção Superficial	Tempo de Presa
EQUIA ® Fil	GC Corporation	Convencional	Vidro de Flúor Alumínio Silicato	EQUIA ® Coat – Fotopolimerização por 20 segundos	2'00"
Ketac ™ Universal Aplicap ™	3M ESPE	Convencional	Óxido de vidro	Fabricante não indica o uso de verniz	4'30"
EQUIA ® Forte Fil	GC Corporation	Convencional	Vidro de Flúor Alumínio Silicato	EQUIA ® Forte Coat – Fotopolimerização por 20 segundos	2'00"

Inicialmente, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP), sob o protocolo número 2015.1.824.58.1, tendo sido aprovado (Anexo A). Os testes foram conduzidos conforme sugerido pela International Organization for Standardization (ISO) número 10993-6:2007, para avaliação da biocompatibilidade de biomateriais para uso em dispositivos médicos.

Para o experimento foram utilizados os seguintes cimentos à base de ionômero de vidro: EQUIA^{TM} Forte, EQUIA^{TM} Fil e Ketac^{TM} Universal Aplicap^{TM}. Os materiais foram manipulados de acordo com as especificações dos fabricantes, em fluxo laminar, para manter as condições de assepsia. Foram confeccionados 24 corpos de prova para cada material testado com o auxílio de matrizes de Teflon com 1,5mm de diâmetro por 5mm de comprimento, obtidas na Oficina de Precisão da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.

Foram utilizados 87 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando de 15 a 20 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP, os quais foram divididos em 12 grupos, sendo 9 grupos experimentais e 3 grupos controles. Os grupos controle consistiram no implante subcutâneo de tubos de polietileno vazios. Cada animal recebeu um implante na região dorsal contendo um dos corpos de prova com o material ou, então, um tubo de polietileno vazio (Tabela 2):

Tabela 2. Divisão dos grupos, materiais empregados, número de animais por grupo e períodos experimentais, utilizados para a avaliação da resposta tecidual após implante em camundongos isogênicos

Grupos	Material	Período	Número de animais
Ketac 7	Ketac ^{TM} Universal Aplicap ^{TM}	7 dias	8 animais
Ketac 21	Ketac ^{TM} Universal Aplicap ^{TM}	21 dias	8 animais
Ketac 63	Ketac ^{TM} Universal Aplicap ^{TM}	63 dias	8 animais
E. Fil 7	EQUIA ^{TM} Fil	7 dias	8 animais
E. Fil 21	EQUIA ^{TM} Fil	21 dias	8 animais
E. Fil 63	EQUIA ^{TM} Fil	63 dias	8 animais
E. Forte 7	EQUIA ^{TM} Forte	7 dias	8 animais
E. Forte 21	EQUIA ^{TM} Forte	21 dias	8 animais
E. Forte 63	EQUIA ^{TM} Forte	63 dias	8 animais
Controle 7	Tubo de polietileno vazio	7 dias	5 animais
Controle 21	Tubo de polietileno vazio	21 dias	5 animais
Controle 63	Tubo de polietileno vazio	63 dias	5 animais

Os animais foram anestesiados na parte interna da pata traseira esquerda com injeção intramuscular de Ketamina a 10% (Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e Xilazina (Dopaser, Laboratórios Calier, SA, Barcelona, Espanha), na proporção de 0,20mL/kg e 0,8mL/kg, respectivamente, previamente ao ato cirúrgico. Em seguida, foi realizada a tricotomia do pelo do dorso com o auxílio de uma máquina de tricotomia. A antissepsia da região foi realizada com gluconato de clorexidina a 1%. Em seguida, realizou-se uma incisão com tesoura cirúrgica, na região lombar do dorso do animal, com dimensão de 1 cm, seguida de divulsão com tesoura romba.

Após posicionar o corpo de prova no interior do tecido conjuntivo subcutâneo, foi realizada a sutura da pele utilizando fio de seda (Vicryl 4-0 – Ethicon – Johnson & Johnson). Os animais foram mantidos no Biotério da FORP/USP durante os períodos experimentais de 7, 21 ou 63 dias, com alimentação e água *ad libitum*, sendo periodicamente monitorados pelos pesquisadores e pelo médico veterinário responsável pelo biotério da FORP/USP, a fim de observar qualquer anormalidade local, sistêmica ou comportamental.

Os animais foram mantidos no biotério em caixas de acordo com o grupo testado. Ao final de cada um dos períodos experimentais, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica, para remoção do tecido conjuntivo subcutâneo e pele circundantes, e corpo de prova. O tecido removido foi fixado em formol a 10% e as peças submetidas ao processamento histotécnico de rotina, para obtenção das lâminas.

Processamento histotécnico

As peças foram fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas por aproximadamente 3 horas em

água corrente. Os corpos de prova foram removidos do conjunto de tecido conjuntivo subcutâneo e pele circundantes. A seguir, as peças foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os blocos contendo os tecidos foram cortados longitudinalmente em micrótomos (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), no sentido méso-distal, em cortes semi-seriados de 5µm e, então, corados com Hematoxilina e Eosina (HE).

Análise microscópica

A análise dos espécimes foi realizada por um patologista experiente, com o auxílio de um microscópio Axio Imager.M1 (Zeiss, Göttingen, Germany) acoplado a uma câmera AxioCam MRc5 (Zeiss, Göttingen, Germany), utilizando aumentos de 50, 100, 200 e 400x.

Análise Descritiva

Realizou-se a descrição da reação tecidual observada nos tecidos em contato com cada material ou grupo controle, em cada tempo experimental.

Análise Semi-quantitativa

Além disso, no tecido periférico ao material testado, foram realizadas também as seguintes análises (Silva *et al.*, 2009; Queiroz *et al.*, 2011):

Análise Semi-Quantitativa

a) Fibrosamento

Foi considerado o número e a densidade de fibras colágenas de permeio às células periféricas localizadas no tecido reacional circunjacente ao

material testado. O fibrosamento foi classificado em 3 graus de severidade, com valores numéricos correspondentes aos seguintes escores:

- Escore 1 (fibrosamento discreto): fibras colágenas individualizadas como em um tecido conjuntivo normal, entremeadas por espaços negativos indicativos de componentes não fibrosos de matriz extracelular.
- Escore 2 (fibrosamento moderado): presença em algumas áreas de fibras colágenas individualizadas, porém com áreas alternadas de matriz extracelular eosinofílica, sem formações lineares e onduladas, típicas das mesmas.
- Escore 3 (fibrosamento intenso): fibras colágenas em meio a uma matriz extracelular eosinofílica, sem formações lineares e onduladas típicas, não permitindo uma individualização das mesmas.

b) Infiltrado Inflamatório

Avaliou-se a concentração de neutrófilos de permeio ao tecido reacional peri-material. Esta concentração foi classificada em 3 graus de severidade, com valores numéricos correspondentes aos seguintes escores:

- Escore 1 (infiltrado inflamatório discreto): presença de 1 a 10 células inflamatórias no tecido reacional.
- Escore 2 (infiltrado inflamatório moderado): presença de 11 a 20 células inflamatórias no tecido reacional.
- Escore 3 (infiltrado inflamatório intenso): presença de mais de 21 células inflamatórias no tecido reacional.

Análise Quantitativa

Utilizando o aumento de 100x, foi realizada a medida (μm) da espessura do tecido reacional granulomatoso em contato com o material testado, ou tubo de polietileno, em sua porção média (Figura 1). As imagens foram analisadas no próprio programa do microscópio (AxioVision Rel, v 4.8, Carl Zeiss MicroImaging GmbH), utilizando a opção "measures".

Figura 1. Imagem representativa do local onde foi realizada a mensuração do Tecido Reacional (TR), da camada muscular (M) até a lacuna deixada pelo material testado (HE, Zeiss, 100x)

Análise Estatística

Os resultados da análise semi-quantitativa (fibrosamento e infiltrado inflamatório) e da análise quantitativa foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis e, quando houve diferença estatística significativa entre os grupos, foi aplicado o pós-teste de Dunn.

Os dados foram analisados por meio do programa estatístico Graph Pad Prism 7, com nível de significância de 5%.

4. Resultados

---

4. Resultados

Análise Descritiva

A análise descritiva foi realizada nos espécimes dos grupos experimentais e controles. Durante o procedimento histotécnico, houve perda de alguns espécimes.

Controle 7 dias

O tecido reacional periférico apresentou-se com fibrosamento uniforme em sua espessura e severidade, sendo discreto e fino em 100% dos espécimes. O infiltrado inflamatório, representado pelos neutrófilos, foi predominantemente moderado (75% dos espécimes). Os macrófagos permeavam os fibroblastos.

Controle 21 dias

O fibrosamento do tecido reacional variou de moderado (40%) a intenso (60%). A cápsula periférica era permeada, ainda, por neutrófilos. O infiltrado inflamatório variou de discreto (40%) a moderado (60%). Na interface entre o tecido reacional e o material os macrófagos e macrófagos multinucleados mostravam-se presentes e/ou evidentes.

Controle 63 dias

O tecido reacional apresentou-se com moderado grau de fibrosamento (50%) e infiltrado neutrofílico discreto. Não se observou macrófagos multinucleados e nem granulomas do tipo corpo estranho nos espécimes analisados.

A Tabela 3 apresenta a porcentagem de espécimes com relação ao

fibrosamento e infiltrado inflamatório observados na análise descritiva.

Tabela 3. Distribuição do fibrosamento e do infiltrado inflamatório observados na análise descritiva do grupo Controle (implante de tubo de polietileno vazio)

Evento Analisado	Grupos		
	Controle 7 dias	Controle 21 dias	Controle 63 dias
Fibrosamento			
Discreto	4 (100%)	0	1 (25%)
Moderado	0	2 (40%)	2 (50%)
Intenso	0	3 (60%)	1 (25%)
Infiltrado inflamatório			
Discreto	1 (25%)	2 (40%)	2 (50%)
Moderado	3 (75%)	3 (60%)	2 (50%)
Intenso	0	0	0

Ketac™ Universal Aplicap 7 dias

O tecido reacional encontrou-se desorganizado pelo edema e discreto fibrosamento (75% dos espécimes). Notou-se moderado infiltrado neutrofílico (75%) aleatoriamente distribuído. Não se observou macrófagos e células multinucleadas. De permeio ao material, havia fragmentos irregulares e birrefringentes, compatíveis com partículas de material de estrutura cristalizada.

Ketac™ Universal Aplicap 21 dias

O tecido reacional encontrava-se uniformemente fino, com fibrosamento moderado (62,5% dos espécimes) e com discreta infiltração de neutrófilos (87,5%). Em alguns espécimes observou-se partículas birrefringentes de material.

Ketac™ Universal Aplicap 63 dias

O tecido reacional era fino e desorganizado e ainda apresentava discreto infiltrado neutrofílico (71,4%) em meio a fibrosamento discreto (71,4%).

A Tabela 4 apresenta a porcentagem de espécimes com relação ao fibrosamento e infiltrado inflamatório observados na análise descritiva.

Tabela 4. Distribuição do fibrosamento e do infiltrado inflamatório observados na análise descritiva do grupo Ketac.

Evento Analisado	Grupos		
	Ketac 7 dias	Ketac 21 dias	Ketac 63 dias
Fibrosamento			
Discreto	6 (75%)	3 (37,5%)	5 (71,4%)
Moderado	2 (25%)	5 (62,5%)	2 (28,6%)
Intenso	0	0	0
Infiltrado inflamatório			
Discreto	1 (12,5%)	7 (87,5%)	5 (71,4%)
Moderado	6 (75%)	1 (12,5%)	2 (28,6%)
Intenso	1 (12,5%)	0	0

Equia® Fil 7 dias

O tecido reacional era discreto e desorganizado (62,5%). O infiltrado neutrofílico apresentou-se moderado (62,5%), sendo notadas partículas de material birrefringente.

Equia® Fil 21 dias

O tecido reacional periférico apresentou-se moderado (86,7%) e muito desorganizado em relação às fibras colágenas. O infiltrado inflamatório era muito variado entre os espécimes, sendo a maioria (57,1%) moderado.

Equia® Fil 63 dias

O tecido reacional periférico apresentou-se discreto (75%) e ainda pouco fibrosado. O infiltrado neutrofílico apresentou-se em sua maioria (75%) discreto. A espessura do tecido variou de discreta a moderada e apresentou-se bem organizada.

A Tabela 5 apresenta a porcentagem de espécimes com relação ao fibrosamento e infiltrado inflamatório observados na análise descritiva.

Tabela 5. Distribuição do fibrosamento e do infiltrado inflamatório observados na análise descritiva do grupo Equia Fil.

Evento Analisado	Grupos		
	Equia Fil 7 dias	Equia Fil 21 dias	Equia Fil 63 dias
Fibrosamento			
Discreto	5 (62,5%)	1 (14,3%)	6 (75%)
Moderado	3 (37,5%)	6 (86,7%)	2 (25%)
Intenso	0	0	0
Infiltrado inflamatório			
Discreto	2 (25%)	2 (28,6%)	6 (75%)
Moderado	5 (62,5%)	4 (57,1%)	2 (25%)
Intenso	1 (12,5%)	1 (14,3%)	0

Equia® Forte Fil 7 dias

A cápsula de tecido reacional apresentou-se desorganizada, com grau de fibrosamento mínimo (100% dos espécimes) e intensamente (50% dos espécimes) infiltrada por neutrófilos.

Equia® Forte Fil 21 dias

O tecido reacional capsular apresentou-se mal organizado e seu grau de fibrosamento variou de discreto (50%) a moderado (50%). Além disso, observou-se que o tecido reacional apresentou-se discretamente (83,3%) infiltrado

por neutrófilos. Eventualmente, observou-se partículas birrefringentes do material.

Equia® Forte Fil 63 dias

O tecido conjuntivo reacional fibroso apresentou-se moderado (100%) e bem organizado, com discreto (87,5%) infiltrado neutrofílico.

A Tabela 6 apresenta a porcentagem de espécimes com relação ao fibrosamento e infiltrado inflamatório observados na análise descritiva.

Tabela 6. Distribuição do fibrosamento e do infiltrado inflamatório observados na análise descritiva do grupo Equia Forte.

Evento Analisado	Grupos		
	Equia Forte 7 dias	Equia Forte 21 dias	Equia Forte 63 dias
Fibrosamento			
Discreto	8 (100%)	3 (50%)	0
Moderado	0	3 (50%)	8 (100%)
Intenso	0	0	0
Infiltrado inflamatório			
Discreto	1 (12,5%)	5 (83,3%)	7 (87,5%)
Moderado	3 (37,5%)	1 (16,7%)	1 (12,5%)
Intenso	4 (50%)	0	0

As Figuras 2, 3 e 4 ilustram os resultados obtidos após a avaliação microscópica da reação tecidual observada nos tecidos em contato com cada material, nos períodos de 7, 21 e 63 dias, respectivamente.

Figura 2. Análise microscópica aos 7 dias. Em A - Grupo Controle: nota-se tecido reacional com fibrosamento muito discreto infiltrado por eventuais neutrófilos. Em B - Grupo Equia Forte: fibras colágenas delicadas e destacam-se os macrófagos e fibroblastos jovens. Em C - Grupo Equia Fil: no tecido reacional nota-se um fibrosamento moderado com eventuais macrófagos. Na área subjacente tem-se o tecido muscular esquelético. Em D - Grupo Ketac: espessura do tecido reacional fina e fibras colágenas delicadas, apoiadas no tecido muscular esquelético subjacente (HE, Zeiss, 400X).

Figura 3. Análise microscópica aos 21 dias. Tecidos reacionais bem estabelecidos e organizados. Em A - Grupo Controle: nota-se infiltração de neutrófilos e fibrosamento discreto. Em B - Grupo Equia Forte: de permeio as fibras têm-se proliferação vascular e edema, além de fibrosamento bem organizado. Em C - Grupo Equia Fil: destacam-se fibroblastos e macrófagos entre as fibras colágenas suportadas por fibras musculares esqueléticas. Em D - Grupo Ketac: grau de fibrosamento moderado, revelando macrófagos e fibroblastos jovens sobre camada muscular esquelética (HE, Zeiss, 400X).

Figura 4. Análise microscópica aos 63 dias. Em A - Grupo Controle: tecido reacional infiltrado por neutrófilos em meio a fibras colágenas desorganizadas, destacando-se ainda macrófagos e fibroblastos jovens. Em B - Grupo Equia Forte: fibras colágenas do tecido reacional individualizadas, mas discretamente desorganizadas, ainda com eventuais neutrófilos, notando-se ainda algumas fibras musculares esqueléticas. Em C - Grupo Equia Fil: tecido reacional muito fino com fibrosamento moderado e eventuais macrófagos, sobre camada muscular esquelética, notando-se ainda eventuais folículos pilosos subjacente. Em D - Grupo Ketac: tecido reacional bem organizado e com densas fibras colágenas infiltradas ora por neutrófilos, ora por macrófagos, de permeio aos fibroblastos (HE, Zeiss, 400X).

Análise Semi-quantitativa

a) Fibrosamento

A Figura 5 apresenta os resultados dos escores atribuídos ao fibrosamento, no período de 7 dias, evidenciando que não houve diferença estatística entre os grupos experimentais ($p>0,05$).

Figura 5. Escores atribuídos ao fibrosamento, no período experimental de 7 dias

A Figura 6 apresenta os resultados dos escores atribuídos ao fibrosamento no período de 21 dias. Os dados evidenciaram que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Controle e Ketac ($p=0,04$) e entre os grupos Controle e E. Forte ($p=0,02$), com o grupo Controle apresentando os maiores valores para o fibrosamento em todos os casos, ou seja, estágio mais avançado no processo de reparo.

Figura 6. Escores atribuídos ao fibrosamento, no período experimental de 21 dias

A Figura 7 representa os escores atribuídos ao fibrosamento, no período de 63 dias, evidenciando que houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos E. Fil e E. Forte ($p=0,009$), com o grupo E. Forte apresentando os maiores valores de fibrosamento, ou seja, estágio mais avançado no processo de reparo, em comparação ao grupo E. Fil.

Figura 7. Escores atribuídos ao fibrosamento, no período experimental de 63 dias

b) Infiltrado Inflamatório

A Figura 8 representa os escores atribuídos ao infiltrado inflamatório, nos períodos de 7 (A), 21 (B) e 63 (C) dias. Não foi possível observar diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 8. Escores atribuídos ao infiltrado inflamatório, nos períodos experimentais de 7, 21 ou 63 dias

Análise Quantitativa

A tabela 7 apresenta os dados obtidos após mensuração do tecido reacional granulomatoso em contato com os implantes com os cimentos de ionômero de vidro EQUIA^{TM} Forte, EQUIA^{TM} Fil e Ketac^{TM} Universal Aplicap^{TM} ou com os tubos de polietileno (controle).

Tabela 7. Média, desvio padrão e comparação dos resultados obtidos em relação à espessura do tecido reacional nos períodos experimentais de 7, 21 e 63 dias.

Período Experimental	Grupo	Média	Desvio Padrão	p-Valor
7 dias	Controle	0,02 ^a	0	0,001
	Ketac	0,06 ^{ab}	0,02	
	E. Fil	0,05 ^{ab}	0,01	
	E. Forte	0,21 ^b	0,08	
21 dias	Controle	0,03 ^a	0,004	0,008
	Ketac	0,06 ^b	0,02	
	E. Fil	0,07 ^{ab}	0,04	
	E. Forte	0,07 ^b	0,02	
63 dias	Controle	0,03 ^a	0,02	0,02
	Ketac	0,08 ^{ab}	0,02	
	E. Fil	0,08 ^{ab}	0,04	
	E. Forte	0,11 ^b	0,04	

* Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos, nos três períodos de avaliação (Pós-teste de Dunn; $p < 0,05$).

De acordo com os dados da tabela 7, pôde-se observar que no período de 7 dias houve diferença significativa entre os grupos Controle e E. Forte ($p=0,001$), sendo a espessura do tecido reacional maior no grupo E. Forte.

No período de 21 dias, foi possível observar diferença significativa entre os grupos Controle e Ketac, com o grupo Ketac apresentando os espécimes com maior espessura de tecido reacional. Entre os grupos Controle e E. Forte também observou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,008$), com o E. Forte apresentando os maiores valores.

Aos 63 dias, foi possível observar diferença significativa entre os grupos Controle e E. Forte ($p=0,02$), com os espécimes do grupo E. Forte apresentando os maiores valores de espessura do tecido reacional.

5. Discussão

---

5. Discussão

O Cimento de ionômero de vidro é um material extremamente versátil, podendo ser empregado na cimentação de coroas, próteses e bandas ortodônticas, em restaurações, como forramento e base de cavidades e, também, como selante de fossas e fissuras (Tay e Lynch, 1989; Sidhu e Nicholson, 2016). Além disso, o CIV ainda é um dos principais materiais de escolha quando a filosofia minimamente invasiva é empregada .

Na Odontopediatria, área da Odontologia onde essa filosofia é amplamente difundida, o CIV é utilizado não apenas pelas suas diversas indicações de uso, mas principalmente em função das muitas propriedades benéficas desse material. Na cavidade bucal, a liberação de flúor favorece a remineralização, tornando o CIV um bom material para uso na prática clínica (ten Cate e van Duinen, 1995; De Witte *et al.*, 2000; Krämer *et al.*, 2017). De maneira geral, os CIV's apresentam boa compatibilidade tecidual e boa adesividade aos tecidos dentais, favorecendo ainda mais suas indicações de uso (Tamilselvam *et al.*, 2013; Korwar *et al.*, 2015).

Várias metodologias têm sido utilizadas para avaliar a compatibilidade biológica de materiais odontológicos. Dentre essas técnicas, encontra-se a avaliação da resposta tecidual do tecido conjuntivo subcutâneo, em modelos animais. Esta metodologia de pesquisa baseia-se principalmente na avaliação do tecido reacional, enfatizando as características evolutivas da formação de cápsula de fibras colágenas e infiltrado inflamatório, utilizando-se avaliações qualitativas e quantitativas (Boaventura *et al.*, 2012).

A análise histopatológica da resposta tecidual em subcutâneo de camundongos, após diferentes tempos experimentais, inclui não apenas a descrição das características teciduais frente ao potencial irritante, mas também a duração de

seu efeito no tecido (Andrade *et al.*, 2018). Apesar dessa metodologia não reproduzir fielmente as características dos tecidos dentais e bucais, oferece dados preliminares importantes a respeito das propriedades biológicas dos materiais odontológicos e as características do tecido reacional (Aminozarbian *et al.*, 2012; Viola *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012; Saghiri *et al.*, 2013; Mesquita *et al.*, 2017).

O tecido reacional observado é consequência da resposta do hospedeiro frente aos materiais implantados no subcutâneo dos camundongos isogênicos. Células inflamatórias e residentes produzem e liberam diversas citocinas e fatores de crescimento, que resultam numa cascata complexa envolvida na resposta do tecido (Andrade *et al.*, 2018).

A análise geral dos resultados obtidos no presente estudo evidenciou que a resposta tecidual variou de acordo com os parâmetros avaliados, com os materiais testados e com os diferentes períodos experimentais. Observou-se que inicialmente o fibrosamento não foi diferente entre os materiais testados, porém apresentou diferença quanto à espessura do tecido reacional entre os grupos Controle e E. Forte, este último apresentando os maiores valores. Aos 21 dias, o fibrosamento passou a ser diferente, com o controle apresentando estágio mais avançado de fibrosamento, quando comparado com o Ketac e E. Forte. Esses valores vão ao encontro dos dados obtidos com relação à espessura do tecido reacional, no qual observou-se diferença entre os grupos Controle e Ketac e Controle e E. Forte, com os dados do grupo controle apresentando os menores valores. Isso significa que o tecido reacional do grupo Controle apresentou-se mais organizado com relação à formação de fibras colágenas, apresentando melhores resultados biológicos e processo de reparo em estágio mais avançado. Ao final do experimento, o Grupo E. Forte apresentou estágio mais avançado de fibrosamento em relação ao E. Fil. Quanto à espessura do tecido reacional, observou-se diferença

entre o grupo Controle e E. Forte, este último ainda apresentando os maiores valores. O infiltrado inflamatório, por sua vez, não apresentou diferença entre os materiais testados ao longo dos períodos experimentais.

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que todos os cimentos à base de ionômero de vidro avaliados (EQUIA^{TM} Forte, EQUIA^{TM} Fil e Ketac^{TM} Universal Aplicap^{TM}) apresentaram compatibilidade com o tecido conjuntivo subcutâneo.

A comparação direta dos resultados obtidos no presente estudo com a literatura específica torna-se impossibilitada, em função da ausência de estudos publicados avaliando a resposta tecidual frente aos materiais avaliados. Assim, estudos adicionais são necessários, empregando outros modelos experimentais, a fim de avaliar a resposta dos tecidos pulpaes e periapicais, frente ao uso desses materiais, fornecendo subsídios para o seu uso seguro na prática clínica.

6. Conclusão

---

6. Conclusão

Com base nas metodologias empregadas e nos resultados obtidos, foi possível concluir que todos os cimentos à base de ionômero de vidro testados apresentaram compatibilidade tecidual, de acordo com os diferentes parâmetros avaliados.

Referências

Referências

Aminozarbani MG, Barati M, Salehi I, Mousavi SB. Biocompatibility of mineral trioxide aggregate and three new endodontic cements: An animal study. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012 Jan;9(1):54-9.

Al-Angari SS, Hara AT, Chu TM, Platt J, Eckert G, Cook NB. Physicomechanical properties of a zinc-reinforced glass ionomer restorative material. *J Oral Sci*. 2014 Mar;56(1):11-6.

AlHumaid J, Al-Harbi F, El Tantawi M, Elembaby A. X-ray microtomography assessment of Carisolv and Papacarie effect on dentin mineral density and amount of removed tissue. *Acta Odontol Scand*. 2018 May;76(4):236-240.

Almuhaiza M. Glass-ionomer Cements in Restorative Dentistry: A Critical Appraisal. *J Contemp Dent Pract*. 2016 Apr 1;17(4):331-6.

Andrade AS, Silva GF, Camilleri J, Cerri ES, Guerreiro-Tanomaru JM, Cerri PS, Tanomaru-Filho M. Tissue Response and Immunoexpression of Interleukin 6 Promoted by Tricalcium Silicate-based Repair Materials after Subcutaneous Implantation in Rats. *J Endod*. 2018 Mar;44(3):458-463.

Alrahlah A. Diametral Tensile Strength, Flexural Strength, and Surface Microhardness of Bioactive Bulk Fill Restorative. *J Contemp Dent Pract*. 2018 Jan 1;19(1):13-19.

Aswathi KK, Rani SP, Athimuthu A, Prasanna P, Patil P, Deepali KJ. Comparison of efficacy of caries removal using polymer bur and chemomechanical caries removal agent: A clinical and microbiological assessment - An in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2017 Jan-Mar;35(1):6-13.

Bansal R, Bansal T. A Comparative Evaluation of the Amount of Fluoride Release and Re-Release after Recharging from Aesthetic Restorative Materials: An in vitro Study. *J Clin Diagn Res*. 2015 Aug;9(8):ZC11-4.

Boaventura JM, Bertolini MJ, Padovani GC, de Oliveira MR, Zaghe MA, de Oliveira Júnior OB, de Andrade MF. Tissue response to experimental dental cements prepared from a modified powder glass composition. *Dent Mater J*. 2012;31(4):583-92.

Dalli M, Çolak H, Mustafa Hamidi M. Minimal intervention concept: a new paradigm for operative dentistry. *J Investig Clin Dent*. 2012 Aug;3(3):167-75.

De Witte AM, De Maeyer EA, Verbeeck RM, Martens LC. Fluoride release profiles of mature restorative glass ionomer cements after fluoride application. *Biomaterials*. 2000 Mar;21(5):475-82.

Dionysopoulos D, Koliniotou-Koumpia E, Helvatzoglou-Antoniades M, Kotsanos N. Fluoride release and recharge abilities of contemporary fluoride-containing restorative materials and dental adhesives. *Dent Mater J*. 2013;32(2):296-304.

Featherstone JD, Doméjean S. Minimal intervention dentistry: part 1. From 'compulsive' restorative dentistry to rational therapeutic strategies. *Br Dent J*. 2012 Nov;213(9):441-5.

Featherstone JD, Fontana M, Wolff M. Novel Anticaries and Remineralization Agents: Future Research Needs. *J Dent Res*. 2018 Feb;97(2):125-127.

Frencken JE. Atraumatic restorative treatment and minimal intervention dentistry. *Br Dent J*. 2017 Aug 11;223(3):183-189.

Friedl K, Hiller KA, Friedl KH. Clinical performance of a new glass ionomer based restoration system: a retrospective cohort study. *Dent Mater*. 2011 Oct;27(10):1031-7.

Gaintantzopoulou MD, Gopinath VK, Zinelis S. Evaluation of cavity wall adaptation of bulk esthetic materials to restore class II cavities in primary molars. *Clin Oral Investig*. 2017 May;21(4):1063-1070.

Gao W, Smales RJ, Yip HK. Demineralisation and remineralisation of dentine caries, and the role of glass-ionomer cements. *Int Dent J*. 2000 Feb;50(1):51-6.

Gorseta K, Glavina D. Thermo-cured glass ionomer cements in restorative dentistry. *J Istanbul Univ Fac Dent*. 2017 Dec 2;51(3 Suppl 1):S122-S127.

Gurgan S, Kutuk ZB, Ergin E, Oztas SS, Cakir FY. Four-year randomized clinical trial to evaluate the clinical performance of a glass ionomer restorative system. *Oper Dent*. 2015 Mar-Apr;40(2):134-43.

http://www.gcamerica.com/products/operatory/EQUIA_Forte/EQUIA_Forte_Sell_Sheet_US2016-iPad.pdf.

Karlinsey RL, Pfarrer AM. Fluoride plus functionalized β -TCP: a promising combination for robust remineralization. *Adv Dent Res*. 2012 Sep;24(2):48-52.

Klinke T, Daboul A, Turek A, Frankenberger R, Hickel R, Biffar R. Clinical performance during 48 months of two current glass ionomer restorative systems with coatings: a randomized clinical trial in the field. *Trials*. 2016 May 8;17(1):239.

Korwar A, Sharma S, Logani A, Shah N. Pulp response to high fluoride releasing glass ionomer, silver diamine fluoride, and calcium hydroxide used for indirect pulp treatment: An in-vivo comparative study. *Contemp Clin Dent*. 2015 Jul-Sep;6(3):288-92.

Krämer N, Schmidt M, Lückner S, Domann E, Frankenberger R. Glass ionomer cement inhibits secondary caries in an in vitro biofilm model. *Clin Oral Investig*. 2018 Mar;22(2):1019-1031.

Mackenzie L, Banerjee A. Minimally invasive direct restorations: a practical guide. *Br Dent J*. 2017 Aug 11;223(3):163-171.

Markowitz K, Carey K. Assessing the Appearance and Fluorescence of Resin-Infiltrated White Spot Lesions With Caries Detection Devices. *Oper Dent*. 2018 Jan/Feb;43(1):E10-E18.

McCabe JF, Jones PA, Wilson HJ. Some properties of a glass ionomer cement. *Br Dent J*. 1979 May 1;146(9):279-81.

Mesquita JA, Lacerda-Santos R, Sampaio GAM, Godoy GP, Nonaka CFW, Alves PM. Evaluation in vivo of biocompatibility of different resin-modified cements for bonding orthodontic bands. *An Acad Bras Cienc*. 2017;89(3 Suppl):2433-2443.

Montedori A, Abraha I, Orso M, D'Errico PG, Pagano S, Lombardo G. Lasers for caries removal in deciduous and permanent teeth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Sep 26;9:CD010229.

Moraschini V, Fai CK, Alto RM, Dos Santos GO. Amalgam and resin composite longevity of posterior restorations: A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2015 Sep;43(9):1043-1050.

Mount GJ, Ngo H. Minimal intervention: a new concept for operative dentistry. *Quintessence Int.* 2000 Sep;31(8):527-33.

Mount GJ. Minimal treatment of the carious lesion. *Int Dent J.* 1991 Feb;41(1):55-9.

Nicholson JW, Croll TP. Glass-ionomer cements in restorative dentistry. *Quintessence Int.* 1997 Nov;28(11):705-14.

Queiroz AM, Assed S, Consolaro A, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva RA, Silva LA. Subcutaneous connective tissue response to primary root canal filling materials. *Braz Dent J.* 2011;22(3):203-11.

Rai N, Naik R, Gupta R, Shetty S, Singh A. Evaluating the Effect of Different Conditioning Agents on the Shear Bond Strength of Resin-Modified Glass Ionomers. *Contemp Clin Dent.* 2017 Oct-Dec;8(4):604-612.

Saghiri MA, Tanideh N, Garcia-Godoy F, Lotfi M, Karamifar K, Amanat D. Subcutaneous connective tissue reactions to various endodontic biomaterials: an animal study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2013 Winter;7(1):15-21.

Sidhu SK, Nicholson JW. A Review of Glass-Ionomer Cements for Clinical Dentistry. *J Funct Biomater.* 2016 Jun 28;7(3). pii: E16.

Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P, Silva LA, Consolaro A. Subcutaneous tissue response of isogenic mice to calcium hydroxide-based pastes with chlorhexidine. *Braz Dent J.* 2009;20(2):99-106.

Sitthisettapong T, Doi T, Nishida Y, Kambara M, Phantumvanit P. Effect of CPP-ACP Paste on Enamel Carious Lesion of Primary Upper Anterior Teeth Assessed by Quantitative Light-Induced Fluorescence: A One-Year Clinical Trial. *Caries Res.* 2015;49(4):434-41.

Takeshita EM, Danelon M, Castro LP, Cunha RF, Delbem AC. Remineralizing Potential of a Low Fluoride Toothpaste with Sodium Trimetaphosphate: An in situ Study. *Caries Res.* 2016;50(6):571-578.

Tamilselvam S, Divyanand MJ, Neelakantan P. Biocompatibility of a conventional glass ionomer, ceramic reinforced glass ionomer, giomer and resin composite to fibroblasts: in vitro study. *J Clin Pediatr Dent.* 2013 Summer;37(4):403-6.

Tay WM, Lynch E. Glass-ionomer (Polyalkenoate) cements. Part 1. Development, setting reaction, structure and types. *J Ir Dent Assoc.* 1989 Jun;35(2):53-7.

ten Cate JM, van Duinen RN. Hypermineralization of dentinal lesions adjacent to glass-ionomer cement restorations. *J Dent Res.* 1995 Jun;74(6):1266-71.

Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry--a

review. FDI Commission Project 1-97. *Int Dent J*. 2000 Feb;50(1):1-12.

van Duinen RN, Shahid S, Hill R, Glavina D. In-vitro Study on Temperature Changes in the Pulp Chamber Due to Thermo-Cure Glass Ionomer Cements. *Acta Stomatol Croat*. 2016 Dec;50(4):287-291.

Viola NV, Guerreiro-Tanomaru JM, da Silva GF, Sasso-Cerri E, Tanomaru-Filho M, Cerri PS. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012 Oct;100(7):1773-81.

Walsh LJ. Minimal intervention management of the older patient. *Br Dent J*. 2017 Aug 11;223(3):151-161.

Wang Y, Mei L, Gong L, Li J, He S, Ji Y, Sun W. Remineralization of early enamel caries lesions using different bioactive elements containing toothpastes: An in vitro study. *Technol Health Care*. 2016 Sep 14;24(5):701-11.

White JM, Eakle WS. Rationale and treatment approach in minimally invasive dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2000 Jun;131 Suppl:13S-19S.

Yan Z, Sidhu SK, Carrick TE, McCabe JF. Response to thermal stimuli of glass ionomer cements. *Dent Mater*. 2007 May;23(5):597-600.

Yang WK, Ko HJ, Kim MR. Evaluation of the rat tissue reaction to experimental new resin cement and mineral trioxide aggregate cement. *Restor Dent Endod*. 2012 Nov;37(4):194-200.

Yasa E, Yasa B, Aglarci OS, Ertas ET. Evaluation of the Radiopacities of Bulk-fill Restoratives Using Two Digital Radiography Systems. *Oper Dent*. 2015 Sep-Oct;40(5):E197-205.

Anexo

Anexo A – Certificado de aprovação do trabalho no Comitê de Ética no Uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “**Resposta do tecido conjuntivo subcutâneo em camundongos isogênicos após a utilização de diferentes cimentos ionômero de vidro**”, Protocolo nº 2015.1.824.58.1, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em reunião de 21/10/2015.

Vigência do Projeto	01/11/2015 a 30/08/2017
Espécie/Linhagem	Camundongo Isogênico BALB/c
Nº de animais	130
Peso/Idade	15-20 gramas / 6-8 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central do <i>Campus</i> USP – Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 21 de outubro de 2015.

Prof. Dr. Michel Reis Messoria
Vice-Coordenador da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP