

IMPLANTES DE SELANTE ENDODÔNTICO AH PLUS® EM TECIDOS INTRAÓSSEO E CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DE RATOS

Aline Beraldo Ireno

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Centro Ciências da Vida
alinebireno@yahoo.com.br

Prof. Dr. Pedro Paulo Barros

Grupo de Pesquisa ou Programa do Orientador
Centro do Orientador
barrosp@puc-campinas.edu.br

Resumo: *Objetivo: Avaliou, in vitro, as respostas teciduais óssea e conjuntiva subcutânea frente ao selante endodôntico AH Plus®. Métodos: Foram utilizados 20 ratos albinos da linhagem Wistar divididos em 4 grupos. O material, AH Plus® inserido em capilar de polietileno, permaneceu implantado por 24 horas, 1, 2 e 4 semanas em fratura da pata esquerda traseira e no tecido subcutâneo da região dorsal do animal. Lâminas histológicas dos espécimes do tecido ósseo e subcutâneo contendo os corpos de prova do material serão coradas em HE, fotografados e analisados histomorfometricamente. Resultados e Discussão: A resposta tecidual foi analisada levando-se em consideração a presença e intensidade de inflamação e de componentes do infiltrado celular e de células responsável pela produção de matriz extracelular conjuntiva, associadas ao processo cicatricial e de regeneração óssea. Na 1ª semana notou-se o período máximo de formação de tecido ósseo primário, com pequeno decréscimo na 2ª semana, caracterizando o momento do reparo e consolidação da fratura. Na 4ª semana foi possível verificar o encerramento do processo, com conversão do tecido ósseo primário em tecido ósseo secundário. Os eosinófilos e neutrófilos foram os observados com mais frequência dentre as células polimorfonucleadas. Fibroblastos permaneceram presentes em quantidade significativa. Conclusão: O material selante AH Plus® não interferiu significativamente no processo de ossificação da falha óssea. No tecido conjuntivo subcutâneo, este material desencadeou processo inflamatório sutil e não houve alteração no perfil normal de cicatrização, sugerindo que também não interfere no processo regenerativo.*

Palavras-chave: AH Plus®, Selante, Implantes.

Área do Conhecimento: Saúde (400.00.00-1) - Materiais Odontológicos (4.02.09.00-8).

INTRODUÇÃO

Em fraturas de ossos compactos onde ocorre perda substancial de tecido ósseo, a reconstituição da peça óssea pode ser realizada com autoenxertos ósseos. Nestes casos, o enxerto ósseo é fixado na sua nova posição e somente as células osteogênicas do peri-ósteo, endósteo e osteócitos próximos às superfícies banhadas pelo líquido tissular, possuem condições favoráveis de sobrevivência [1].

Diante deste quadro, as células da camada osteogênica provenientes do peri-ósteo, endósteo e medula do osso hospedeiro, se proliferam e migram em direção ao autoenxerto formando novas trabéculas ósseas. Após algum tempo, as trabéculas ósseas aumentam em comprimento e espessura e vão se depositando sobre o enxerto. Desta forma, o novo tecido ósseo é formado e o enxerto é lentamente reabsorvido. Em geral, são necessárias de 8 a 16 semanas para o desenvolvimento de novo tecido ósseo. Portanto, nestes casos os enxertos atuam como estrutura de suporte provisório e temporário e também permitem a migração de células osteogênicas que darão origem a novo tecido ósseo no local [2].

Em situações onde não há disponibilidade de se realizar o autoenxerto, o auxílio para o reparo de fraturas ósseas pode ser obtido com a utilização de materiais sintéticos biocompatíveis.

O ato de preencher o canal radicular é parte do trabalho rotineiro do cirurgião-dentista desde os primórdios da profissão, quando se utilizou, de forma empírica, desde chumbo em folha até madeira, piche, cera, entre outros materiais, com a finalidade de selar o canal radicular, devolvendo o elemento dental à sua função.

Em meados do século XIX, Bowmann, em 1867, introduziu na Endodontia a guta-percha, uma substância vegetal extraída sob a forma de látex de árvores da família das sapotáceas (*Mimusops balata* e *Mimusops hiberi*), a qual tem sido aceita como o melhor material para a obturação do sistema de canais radiculares [3].

Este material encontra-se disponível para o uso odontológico em associação a outros componentes, numa proporção aproximada de 20% de guta-percha, 60 a 75% de óxido de zinco e os demais elementos em proporções menores (1,5 a 15% aproximadamente). A guta-percha apresenta-se sob duas formas cristalinas distintas: α (alfa-cristalina), e β (beta-cristalina) [4]. A guta-percha na forma alfa-cristalina é quebradiça à temperatura ambiente, tornando-se, quando aquecida, pegajosa, aderente e com maior escoamento. Sua temperatura de fusão é de 65°C. Já, a forma beta-cristalina disponível comercialmente na maioria dos casos, é estável e flexível à temperatura ambiente. Quando aquecida, não passa a apresentar adesividade e tem menor escoamento do que a forma alfa. Sua temperatura de fusão é de 56°C [5,6]. O cimento endodôntico assume um papel auxiliar, porém de extrema importância, na obturação do sistema de canais radiculares, já que, este deverá preencher espaços entre os cones de guta-percha e entre cone e a parede do canal.

Independentemente do seu tipo, o cimento deve preencher os seguintes requisitos: apresentar biocompatibilidade, não irritando os tecidos periapicais; possuir viscosidade quando misturado; ter boa adesão às paredes do canal radicular; ter bom tempo de trabalho, possibilitando ao clínico um tempo suficiente para realizar os procedimentos de obturação; promover o selamento tridimensional (hermético) do sistema de canais radiculares; apresentar estabilidade dimensional; ter bom escoamento; ser radiopaco, revelando quando possível à existência de canais adicionais, múltiplos forames, áreas de reabsorção, linhas de fratura e outras características morfológicas inusitadas; não alterar a cor do dente; ser insolúvel aos fluidos teciduais e à saliva; ser solúvel a solventes comuns, no caso de retratamentos; ser impermeável no canal; ter atividade antibacteriana; ser de fácil inserção e remoção do canal radicular [7].

A guta-percha combinada com vários cimentos endodônticos é o material mais utilizado na obturação do sistema de canais radiculares.

Considerando que, durante o tratamento endodôntico, pode ocorrer por diferentes causas, o extravasamento do material obturador no tecido ósseo e tecido conjuntivo periodontal, a utilização destes materiais sob forma de implantes, neste trabalho, tem por finalidade avaliar histomorfométricamente as respostas teciduais.

OBJETIVO

Avaliar, *in vitro*, as respostas teciduais óssea e conjuntiva subcutânea frente ao selante endodôntico AH Plus®.

METODOLOGIA

Implantes

Foram utilizados 16 ratos albinos da linhagem Wistar divididos em 4 grupos de acordo com o tempo de permanência do material implantado: 24 horas, 1, 2 e 4 semanas.

Após pesagem dos animais, submetem-nos à anestesia geral por solução de Cloridrato de Xylasina (Virbaxyl® 2%) + Ketamina (Francotar®), administrado por via intramuscular na dose de 1,5 mL/Kg de peso corporal. Posteriormente, os animais foram colocados em placa de contenção e tiveram as patas traseiras e a região dorsal tricotomizadas.

Após assepsia, fez-se uma incisão na pele de aproximadamente 1,0 cm com uma tesoura de ponta fina, paralelamente ao longo do eixo da tíbia. Com o auxílio de um bisturi, seccionou-se o tecido muscular até a exposição do periósteo que em seguida foi rebatido cuidadosamente até a exposição do tecido ósseo. Com o uso de um mini motor de baixa rotação e uma broca com 2,0 mm de diâmetro, foi feito um orifício no terço superior da tíbia de modo a permitir a introdução do corpo de prova. Realizou-se este procedimento nas duas patas traseiras de cada animal. Na esquerda, implantou-se o corpo de prova (AH Plus® inserido em capilar de polietileno) e a pata traseira direita recebeu implante apenas do capilar, sendo utilizada como controle. Posteriormente, o tecido muscular e a pele foram suturados e sobre os cortes aplicou-se solução aquosa PVPI (poli vinil pirrolidona iodada) anti-séptica.

No implante subcutâneo, após assepsia, foi feita uma incisão na pele de aproximadamente 1,0 cm com auxílio de uma tesoura de ponta fina, paralelamente ao longo do eixo da coluna vertebral. Com uma tesoura ponta romba, o tecido conjuntivo subcutâneo sofreu divulsão com a finalidade de implantar o corpo de prova. O implante foi inserido com uma pinça apropriada, ao lado da coluna vertebral, tão longe quanto possível do local da incisão, para evitar que o processo de cicatrização da ferida interferisse na resposta tecidual. Uma vez feito o implante, suturou-se o corte com dois pontos separados e aplicou-se sobre este a solução aquosa PVPI (poli vinil pirrolidona iodada) anti-séptica.

Dentre as primeiras 48 horas pós-cirurgia, administrou-se a dose de 750 mg/Kg de peso corporal de dipirona sódica em solução 500 mg/mL do laboratório Aventis por via intramuscular.

Obtenção de espécimes dos tecidos ósseo e conjuntivo subcutâneo

Os animais foram eutanaziados, de acordo com os tempos de permanência, em câmara anestésica com halotano líquido (Tanohalo[®], Cristália).

Foram removidos espécimes do tecido ósseo das duas patas e do tecido conjuntivo subcutâneo da região dorsal. Em seguida, foram fixados por imersão em solução de formol tamponado a 10% por 48 horas e após esse período promoveu-se a redução do tamanho dos espécimes para processamento histológico.

Preparação e triagem de lâminas histológicas

Os espécimes do tecido ósseo foram descalcificados em solução saturada de EDTA com agitação contínua durante 30 dias. Espécimes de ambos os tecidos foram submetidos ao processamento histológico realizado pelos técnicos do laboratório de histologia. Cortes de 7 micrometros de espessura foram corados com hematoxilina-eosina para a obtenção de lâminas histológicas, posteriormente fotografadas para análise morfológica.

Análise Morfométrica

Após captura das imagens, as seguintes análises foram realizadas:

a) Determinação semi-quantitativa das células encontradas na cápsula ao redor do implante AH Plus[®] introduzida na região subcutânea dorsal. Nesta análise, foram avaliadas a intensidade da presença de fibrócitos, fibroblastos, macrófagos e células polimorfonucleadas. Foi utilizada a classificação de (+) para presença discreta, (++) presença moderada e (+++) para presença intensa e (-) para ausência;

b) Determinação quantitativa, por meio do software TPS Dig versão 1.38a, da espessura de tecido ósseo secundário e tecido ósseo primário (neoformado) na região interna da tíbia onde havia presença (ou indício morfológico da presença) do material selante. Para facilitar a análise dos resultados, foi determinada uma relação entre espessura do osso primário e secundário, utilizando-se para isso a seguinte equação: $R_{Op/s} = (E_{Op} - 1) / E_{Os}$, sendo $R_{Op/s}$ Relação Osso primário-Osso secundário, E_{Op} Espessura do osso primário e E_{Os} Espessura do osso secundário.

Para análise dos resultados referentes aos implantes ósseos, as espessuras ósseas (e a relação) da tíbia da pata esquerda (com implante) foram comparadas estatisticamente com a da tíbia direita (controle) através do teste t pareado, sendo que valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos. Visando minimizar o erro devido à variabilidade dos animais, foram realizadas 3 medições de espessura na região

da fratura, sendo o valor médio utilizado para análise.

Para análise dos resultados referentes aos implantes subcutâneos, foram realizadas 3 avaliações, em regiões equidistantes, ao longo cápsula fibrosa formada ao redor do implante, sendo o valor modal descrito na tabela 01.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Shahi e colaboradores (2006) [8], atualmente existem quatro métodos clássicos para a avaliação de biocompatibilidade dos materiais: (a) avaliação de citotoxicidade, (b) implantes subcutâneos, (c) implantes intra-ósseos, e (d) avaliação *in vivo* da reação tecidual peri-radicular em animais.

Em cada tempo de permanência dos materiais implantados foram feitas avaliações histológicas. A resposta tecidual foi analisada levando-se em consideração a presença e intensidade de inflamação e de componentes do infiltrado celular e de células responsável pela produção de matriz extracelular conjuntiva, associadas ao processo cicatricial e de regeneração óssea.

Implantes de AH Plus[®] em falha óssea (tíbia)

Em diversos animais que receberam o implante do biopolímero AH Plus[®] foi possível observar sua presença na região de matriz e de medula óssea. Sempre foi observado delgado envoltório conjuntivo com baixa celularidade. Observou-se na região da fratura proliferação osteoblástica e formação de osso primário nos mesmos padrões e proporções daqueles observados nas fraturas ósseas controle, seja em 24 horas, uma, duas ou quatro semanas pós-implante. Na região do perioste, não se evidenciou nenhum tipo de infiltrado celular que pudesse indicar processo inflamatório em resposta ao implante. Do mesmo modo, não se observou deposição anormal de fibras colágenas ou vasos neoformados em quantidades significativas.

Observando a Figura 1 é possível verificar que o material selante não interferiu significativamente no processo de ossificação da falha óssea. Verificou-se inicialmente que a $R_{Op/s}$ se manteve muito discreta no tempo de 24 horas, conforme esperado, uma vez que neste período não houve presença de tecido ósseo neoformado. Na primeira semana nota-se o período máximo de formação de tecido ósseo primário, com pequeno decréscimo na segunda semana, caracterizando o momento do reparo e consolidação da fratura. Na quarta semana é possível verificar uma queda no valor de $R_{Op/s}$ atingindo valores próximos àqueles encontrados para o tempo de 24 horas, indicando encerramento do processo, com conversão do tecido ósseo primário em tecido ósseo

secundário. Qualquer variação na relação $R_{Op/s}$ poderia indicar maior ou menor eficiência do processo de reparo, uma vez que este está envolvido com a formação do tecido ósseo para consolidação da fratura e sua posterior reabsorção (remodelagem óssea).

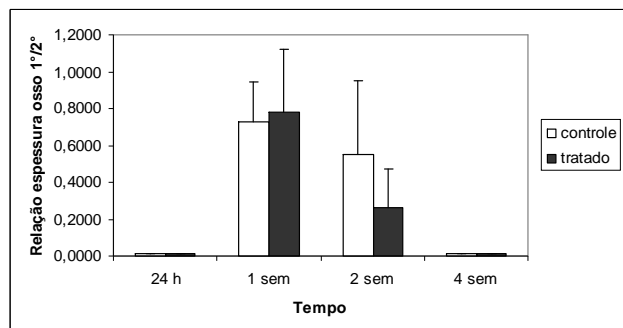


Figura 1: Relação da espessura óssea em implante de AH Plus®

Também foi possível observar a ausência de diferença no processo de ossificação entre o grupo tratado e controle (Figura 2), uma vez que a $R_{Op/s}$ permaneceu em valores próximos nestes dois grupos, sem haver diferença significativa entre os resultados.

Em que pese não ter sido realizada análise morfo-métrica do periósteo, não foram observadas variações significativas de espessura ou constituição celular entre a tíbia da pata com implante e a tíbia da pata controle.

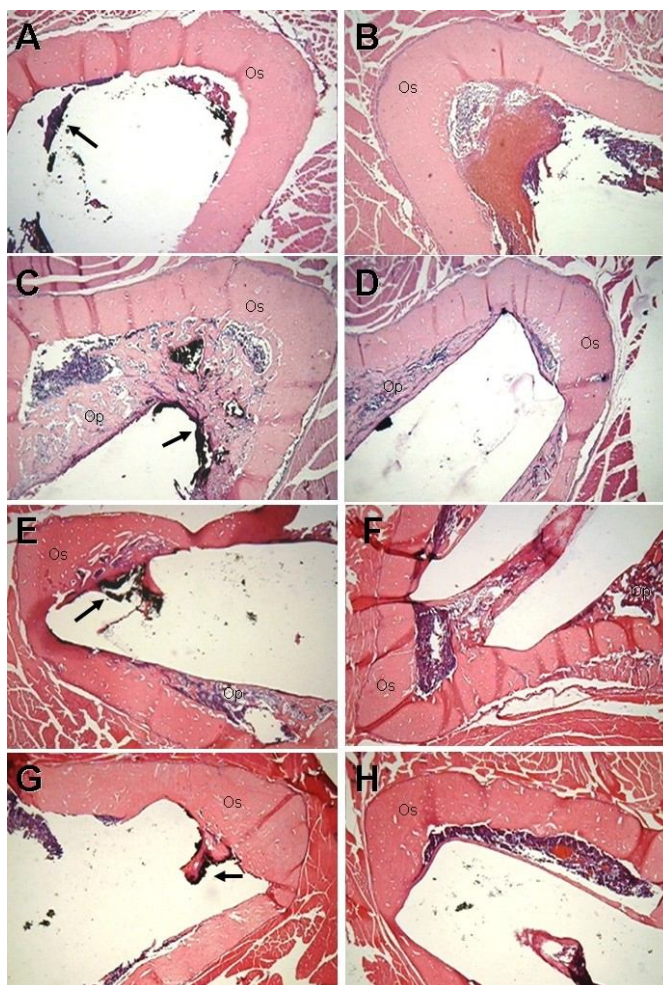


Figura 2: Micrografias de implante ósseo de AH Plus® . A: Grupo Tratado 24 h. B: Grupo Controle 24 h. C: Grupo Tratado 01 semana. D: Grupo Controle 01 semana. E: Grupo Tratado 02 semanas. F: Grupo Controle 02 semanas. G: Grupo Tratado 04 semanas. H: Grupo Controle 04 semanas. Op: tecido ósseo primário; Os: tecido ósseo secundário; seta: material selante. Hematoxilina-eosina, 40x.

Implantes de AH Plus® em região subcutânea

Observou-se na região subcutânea formação de cápsula conjuntiva fibrosa bem circunscrita, com elevada celularidade, havendo predomínio de fibrócitos/fibroblasto, e presença de células polimorfonucleares e macrófagos (associadas ao processo de inflamação e regeneração) nos tempos iniciais (24 horas a uma semana). Tais células foram observadas principalmente na cápsula, mas também nos tecidos adjacentes (Figura 3). Os eosinófilos e neutrófilos foram os observados com mais frequência dentre as células polimorfonucleadas. Na Tabela I é possível observar que fibroblastos permaneceram presentes em quantidade significativa.

Dada a conhecida biocompatibilidade do AH Plus[®], o processo inflamatório desencadeado por sua presença não deve ser intenso, conforme foi constatado na observação dos resultados. Ao comparar com a resposta tecidual do controle, constatou-se também que não houve alteração no perfil normal de cicatrização.

Tabela 1: Distribuição da análise modal dos resultados

Análise MODAL dos resultados		
Período	Células	AH Plus [®] (GP)
24 horas	Fibroblastos	+
	Fibrócitos	+
	Polimorfonucleares	+
	Macrófagos	+
1 semana	Fibroblastos	++
	Fibrócitos	+
	Polimorfonucleares	-
	Macrófagos	+
2 semanas	Fibroblastos	++
	Fibrócitos	+
	Polimorfonucleares	+
	Macrófagos	-
4 semanas	Fibroblastos	++
	Fibrócitos	+
	Polimorfonucleares	-
	Macrófagos	-

(+) presença discreta, (++) presença moderada, (+++) presença intensa e (-) ausência.

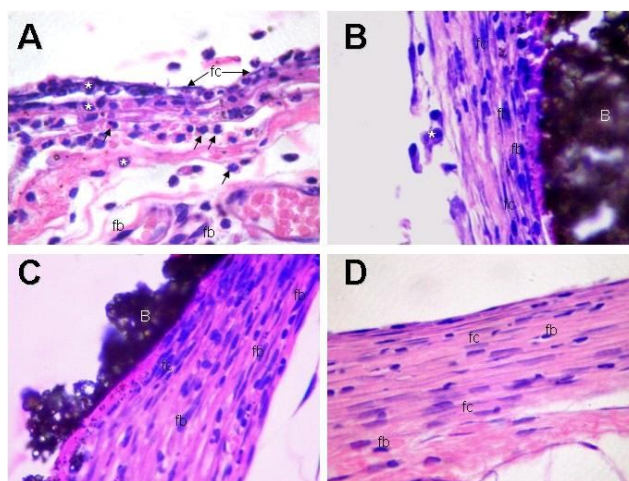


Figura 3: Micrografias de implante subcutâneo de AH Plus[®]. A: Grupo Tratado 24 h. B: Grupo Tratado 01 semana. C: Grupo Tratado 02 semanas. D: Grupo Tratado 04 semanas. Seta: Células polimorfonucleadas; fc: fibrócitos; fb: fibroblastos; * macrófagos; B: bio-material selante. Hematoxilina-eosina, 400x.

CONCLUSÃO

O material selante AH Plus[®] implantado não interferiu significativamente no processo de ossificação da falha óssea. No tecido conjuntivo subcutâneo, os resultados obtidos mostram que este material selante desencadeou um processo inflamatório bastante sutil, conforme esperado, e que não foram observadas alterações no perfil normal de cicatrização, sugerindo que o material também não interfira neste processo regenerativo.

Assim sendo, na eventualidade de extravasamento para os tecidos ósseo e conjuntivo subcutâneo durante o tratamento endodôntico, a presença do material não deverá comprometer o tratamento.

REFERÊNCIAS

- [1] Junqueira, L.C; Carneiro, J. *Histologia Básica*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1990. 388. ISBN 85-277-0150-2.
- [2] Ganong, F.W. *Fisiologia Médica*. 22ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. ISBN 85-7726-003-8.
- [3] Soler, R.M; Shocron, M.L. *Endodoncia*. Rosário: Editorial La Médica, 1957. 305 p.
- [4] Friedman, C.E; Sandrik, J.L; Heuer, M.A. *et al*. Composition and physical properties of gutta-percha endodontic filling materials. *J Endod* 1977; 3(8): 304-8.
- [5] Goodman, A.; Schilder, H.; Aldrich, W. The thermomechanical properties of gutta-percha. Part II.

The history and molecular chemistry of gutta-percha. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974 June; 37(6): 954-61.

[6] Lopes, H.P.; Siqueira Júnior, J.F. *Endodontia: biologia e técnica*. Rio de Janeiro: Medsi; 1999. cap. 20. p. 427-50.

[7] Grossman, L.I. An improved root-canal cement. *J Am Dent Assoc* 1958; 56: 381-5.

[8] 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 Aug;32(8):776-80.