

# Estudo comparativo da reação tecidual conjuntiva de ratos, frente a três cimentos endodônticos resinosos

*Comparative study of rat's connective tissue reaction, against three endodontic resin cements*

Kazuzo Okino Neto<sup>1</sup>, Abílio Albuquerque Maranhão de Moura<sup>2,3</sup>, Harry Davidowicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Curso de Odontologia da Universidade Paulista, Sorocaba-SP, Brasil, <sup>2</sup>Curso de Odontologia da Universidade Paulista, São Paulo-SP, Brasil, <sup>3</sup>Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP, Brasil.

## Resumo

**Objetivo** – Este estudo avaliou *in vivo* a biocompatibilidade dos cimentos AH Plus, Acroseal e EndoREZ, após a implantação em tecido subcutâneo de 16 ratos Wistar. **Métodos** – Os cimentos foram colocados no interior de tubos de polietileno e implantados em locais específicos no subcutâneo do dorso dos animais. Os blocos de tecidos foram removidos após 24 horas, 72 horas, 7 dias e 21 dias, processados histologicamente e analisados através da observação microscópica óptica. **Resultados** – Os resultados indicaram que todos os cimentos induziram reações inflamatórias discretas, que diminuíram ao longo do experimento. **Conclusões** – O cimento Acroseal apresentou o melhor comportamento biológico, seguido pelo AH Plus e EndoREZ.

**Descritores:** Endodontia; Cimentos dentários; Obtenção do canal radicular; Teste de biocompatibilidade

## Abstract

**Objective** – The purpose of this study was evaluate *in vivo* the biocompatibility of the cements AH Plus, Acroseal and EndoREZ, after implantation in connective tissue of sixteen Wistar rats. **Methods** – The cements were put in the polyethylene tubs and implanted in specific areas in animal's dorsal subcutaneous. The block of tissues was removed after 24 hours, 72 hours, 7 days and 21 days, histological processes was conducted and analyzed under optical microscopic observation. **Results** – The results indicated that all cements induced mild inflammatory reaction, that decreased with the experiment time. **Conclusions** – The Acroseal cement showed the best biological reaction, followed by AH Plus and EndoREZ.

**Descriptors:** Endodontics; Dental cements; Root canal obturation; Materials testing

## Introdução

O sucesso da terapia endodôntica está diretamente relacionada com o controle da infecção do sistema de canais radiculares, através do preparo químico-cirúrgico, obtenção e selamento da cavidade endodôntica<sup>1</sup>. A obtenção do sistema de canais radiculares é realizada com cones de guta-percha e cimento endodôntico. Atualmente existem vários tipos de cimentos endodônticos, que podem ser classificados de acordo com sua composição; óxido de zinco e eugenol, hidróxido de cálcio, ionômero de vidro, resinoso e silicone<sup>2</sup>. Independente de sua composição, o cimento endodôntico ideal, deve preencher alguns requisitos, dentre eles, ser biocompatível<sup>3</sup>. Vários estudos tem sido executados objetivando avaliar as características biológicas dos cimentos endodônticos, dentre eles, utilizando cultura de células<sup>4</sup>, implantes em tecido conjuntivo de cobaias<sup>5-6</sup>, injeção em tecido conjuntivo de cobaias<sup>7-8</sup> e em dentes de cobaias<sup>9-10</sup>. Os testes recomendados pela *Fédération Dentaire Internationale*<sup>11</sup> (1980) e *International Organization for Standardization – ISO 7405 Dentistry*<sup>12</sup> (1997) em relação à pesquisa de novos materiais odontológicos são: testes iniciais, secundários e de aplicação. Os testes iniciais utilizam culturas de células para verificar a viabilidade dos materiais. Os testes secundários e de aplicação, avaliam o comportamento biológico dos tecidos frente aos materiais.

Os cimentos resinosos apresentam excelentes propriedades seladoras, pela alta capacidade adesiva, principalmente em condições de umidade<sup>7</sup>. A capacidade seladora é apenas um dos requisitos de um cimento endodôntico ideal, o qual deve possuir entre outros fatores, um bom comportamento biológico. O objetivo do presente estudo é avaliar *in vivo* a intensidade da reação inflamatória do tecido conjuntivo em dorso de ratos, frente ao implante de tubos de polietileno preenchidos com AH Plus (Dentsply/De Trey), Acroseal (Septodont), EndoREZ (Ultradent) e um grupo-controle em quatro tempos experimentais, 24 horas, 72 horas, 7 dias e 21 dias.

## Métodos

Foram selecionados 16 ratos machos da raça Wistar, com idade entre 8 a 12 semanas, pesando aproximadamente 250 gramas. Utilizou-se 64 tubos de polietileno com 1,5 mm de diâmetro interno, 2,0 mm de diâmetro externo e 10,0 mm de comprimento, que foram selados em uma de suas extremidades e autoclavados. Quarenta e oito tubos foram preenchidos com os cimentos recém-espaturados de acordo com os fabricantes, com o auxílio de motor elétrico e contra-ângulo associado a propulsores de lântulo. O excesso de cimento que porventura extravasou para a superfície externa do tubo foi removido com o auxílio de uma gaze estéril. Os 16 tubos restantes não foram preenchidos por cimento. Todos os instrumentos e materiais utilizados na preparação e implante das amostras foram previamente esterilizados em autoclave. Os 64 tubos foram divididos em 4 grupos:

Grupo I: 16 tubos preenchidos com AH Plus

Grupo II: 16 tubos preenchidos com Acroseal

Grupo III: 16 tubos preenchidos com EndoREZ

Grupo IV: 16 tubos vazios

Os animais foram anestesiados através da injeção intramuscular de uma mistura de Cetamin (Cloridrato de Cetamina 10%) e Xilazin (Cloridrato de Xilazina 2%) na proporção meio a meio, injetando-se 0,2 ml da solução para cada 100 grama de peso do animal. Após a anestesia, a tricotomia do dorso foi iniciada com máquina elétrica e finalizada com lâminas gilete, tomando-se o cuidado de manter a integridade cutânea. Procedeu-se à desinfecção da área cirúrgica com Riodeine (PVP-I 10%), antes de realizar as incisões.

O dorso do rato foi dividido em dois lados, tendo-se a coluna vertebral como referência. Em cada um dos lados realizou-se uma incisão de aproximadamente 1,5 cm. Inseriu-se um instrumento rombo com o objetivo de divulsionar os tecidos, separando o cutâneo do

conjuntivo, tomando-se o cuidado de não causar perfuração ou dilaceração. Foram criadas duas lojas para cada incisão, uma para a direção craniana e outra para a direção caudal. Os tubos de polietileno foram levados para a intimidade da loja cirúrgica com o auxílio de um trocar, de tal forma que cada rato recebeu 3 tubos, contendo cada um cimentos diferentes e 1 tubo sem cimento. A seguir as incisões foram suturadas com fio de seda número 4.0 estéril.

Os ratos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 4 ratos cada, separados em gaiolas diferentes, segundo os tempos experimentais de 24 horas (Grupo A), 72 horas (Grupo B), 7 dias (Grupo C) e 21 dias (Grupo D).

Passado o tempo experimental de cada grupo, foi procedido o sacrifício dos animais com sobre-dose de Cetamin e Xilazin.

Após a confirmação do óbito, realizou-se a desinfecção do dorso dos animais com Riodeine (PVP-I 10%) e localização dos tubos por palpação. Executaram-se incisões com lâmina de bisturi no<sup>15</sup>, respeitando-se margem de segurança de 2 cm de cada lado, removendo-se tubos e os tecidos circunvizinhos, em uma única peça cirúrgica, formando assim 4 fragmentos de tecidos. Os fragmentos foram conservados em formol 10%, identificados e encaminhados ao laboratório de análise patológica para o processamento. Cabe ressaltar que nos grupos de 7 e 21 dias, nova tricotomia foi necessária, antes da desinfecção e remoção das amostras.

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz, considerando as células do processo inflamatório, proliferação de tecido conjuntivo fibroso, presença de fragmentos de cimento no tecido conjuntivo e sinais de processos degenerativos, inclusive necrose.

## Resultados

A avaliação dos eventos histológicos foi realizada por um único observador, através de microscopia óptica, com aumentos de 100 e 200 vezes, graduando-se a intensidade do infiltrado inflamatório em: não significativa (0); discreta (1); moderada (2) e intensa (3), de acordo com os padrões definidos pela ISO<sup>11</sup>. Os critérios utilizados para graduar a intensidade do infiltrado inflamatório estão descritos no Quadro 1.

**Quadro 1. Intensidade da reação inflamatória**

Graus	Células inflamatórias
0	Nenhuma ou poucas células inflamatórias, caracterizando tecido conjuntivo normal
1	Discreta quantidade de polimorfonucleares ou mononucleares e características histológicas do tecido conjuntivo subcutâneo identificáveis
2	Moderada quantidade de células inflamatórias, mas sem tecido necrótico, podendo haver desarranjo das características histológicas do tecido conjuntivo subcutâneo
3	Denso infiltrado inflamatório, com presença de abscesso e possibilidade de tecido necrótico

### AH Plus

Nos períodos de 24 e 72 horas de implantação do cimento AHPlus, o tecido apresentou discreto infiltrado inflamatório, caracterizado por edema e presença de poucos neutrófilos, plasmócitos, linfócitos, eosinófilos e macrófagos. Verificou-se a presença de fibroblastos com raras fibras colágenas, sem formação de cápsula fibrosa.

No período de 7 dias, um infiltrado inflamatório discreto ainda estava presente. Plasmócitos, linfócito, macrófagos, alguns mastócitos e eosinófilos foram encontrados. Observou-se proliferação de fibroblastos com formação de fibras colágenas em feixes ondulados e orientados.

Após 21 dias, verificou-se a presença de tecido de granulação,

caracterizado pela presença de capilares sangüíneos neo-formados, proliferação de fibroblastos infiltrados por células inflamatórias mononucleadas e delgados feixes de fibras colágenas.

### Acroseal

Nos períodos de 24 e 72 horas, o tecido apresentava um discreto infiltrado inflamatório, com poucos neutrófilos, plasmócitos, linfócitos, eosinófilos e macrófagos, proliferação de capilares e numerosos fibroblastos envolvidos por fibras colágenas delicadas.

No período de 7 dias, verificou-se tecido de granulação e proliferação de fibroblastos com formação de fibras colágenas em feixes ondulados e bem orientados. Linfócitos e plasmócitos foram vistos em pequena quantidade.

Aos 21 dias, foram observados numerosos fibroblastos com formação de feixes de fibras colágenas espessas, densas e onduladas. Poucas células mononucleadas foram encontradas.

### EndoREZ

Nos períodos de 24 e 72 horas, verificou-se a presença de um discreto infiltrado inflamatório, edema e um tecido de granulação, com proliferação de capilares sangüíneos e presença de poucos neutrófilos, plasmócitos, linfócitos, eosinófilos e macrófagos. Fibroblastos estavam presentes com raras fibras colágenas, assemelhando tecido conjuntivo frouxo.

Aos 7 dias, verificou-se a persistência de plasmócitos, linfócitos, eosinófilos e inúmeros mastócitos. Muitos fibroblastos com pouca formação de colágeno, apresentando feixes delgados e discretos, foram evidenciados.

Aos 21 dias, foi possível observar a persistência do edema, a presença de capilares sangüíneos, de células inflamatórias mononucleadas como plasmócitos e linfócitos e fibroblastos relacionados com fibrilas colágenas muito delgadas.

### Controle

Nos períodos de 24 e 72 horas, observou-se que o tecido conjuntivo adjacente aos tubos apresentou características semelhantes ao tecido conjuntivo sub-epitelial. Verificou-se um infiltrado inflamatório não significante, com raros neutrófilos e macrófagos.

Aos 7 dias, verificou-se um tecido conjuntivo isento de edema e presença de fibroblastos e feixes de fibras colágenas orientadas envolvendo os tubos. Não foram evidenciados neutrófilos e macrófagos. Células inflamatórias mononucleadas estavam presentes em pequena quantidade.

No período de 21 dias, observou-se a ausência de edema e raras células inflamatórias mononucleadas. Foram encontrados inúmeros fibroblastos e feixes de fibras colágenas, caracterizando uma fibrose ao redor do tubo.

Em nenhuma das lâminas analisadas foi possível observar processos degenerativos, necrose ou presença de corpo estranho.

## Discussão

A metodologia utilizada neste estudo é recomendada por organizações internacionais como *Fédération Dentaire Internationale*<sup>11</sup> (1980) e *International Organization for Standardization – ISO 7405 – Dentistry*<sup>12</sup> (1997), que buscam a uniformização e padronização dos testes de avaliação biológica em relação aos materiais dentários<sup>5-6,13</sup>. Esta padronização é amplamente aceita pela comunidade científica internacional, pois permite a comparação de resultados, sendo fator decisivo no projeto e elaboração deste estudo. De acordo com as organizações supracitadas, os testes recomendados são: iniciais, secundários e de aplicação.

Os testes iniciais são indicados para verificar a citotoxicidade<sup>14</sup>, genotoxicidade<sup>8</sup> e mutagenicidade<sup>15</sup> dos materiais dentários. Como os cimentos endodônticos podem ter contato direto com os tecidos periapicais, estes testes são importantes para avaliar a viabilidade celular frente a esses materiais, assim como as possibilidades genotóxicas e mutagênicas. Os testes secundários, objetivo do presente estudo, enfocam o comportamento biológico dos tecidos de cobaias

em relação aos materiais dentários, avaliando a histocompatibilidade, através da intensidade da resposta inflamatória do hospedeiro<sup>13-16</sup>. Finalmente, os testes de aplicação, utilizando geralmente dentes de cães<sup>10-17</sup> e macacos<sup>9-18</sup>, são os testes mais próximos da realidade clínica. Porém cabe ressaltar que as diferenças anatômicas e imunológicas dos diferentes animais devem ser consideradas.

A metodologia de implantação de tubos de polietileno no tecido conjuntivo de ratos utilizada neste estudo foi embasada nos estudos de Torneck realizados em 1966 e 1967<sup>19-20</sup>, que demonstraram a aceitabilidade desse material pelo tecido conjuntivo subcutâneo de ratos. Estes achados originaram diversos estudos, permitindo avaliar a histocompatibilidade de vários cimentos endodônticos<sup>5-6</sup>. O interessante nesta metodologia é que os tubos de polietileno simulam uma raiz, onde pequena porção de uma das extremidades do tubo viabiliza a interação material/tecido. Além disso, permite a implantação de cimentos recém-espaturados, como nos tratamentos endodônticos realizados na clínica diária. Nas metodologias que utilizam culturas de células, notam-se alguns inconvenientes, como o emprego de vários tipos celulares e meios de culturas, avaliação por diferentes testes, materiais em contato direto com as células, entre outros fatores, que podem apresentar resultados discrepantes<sup>14</sup>. Os cimentos em contato direto com culturas de células são sobreavaliados e podem ser comparados aos casos de sobreobturações que ocorrem nos tratamentos endodônticos<sup>15</sup>. Estes detalhes devem ser considerados frente à análise e comparação dos resultados dos estudos realizados através desta metodologia. Cabe salientar que estes estudos avaliam a viabilidade celular, diferindo do presente estudo, que objetivou a verificação da reação inflamatória no tecido conjuntivo.

De acordo com a metodologia utilizada neste estudo, verificou-se que o comportamento biológico dos cimentos AH Plus e Acroseal foi semelhante em todos os períodos avaliados. Ambos os cimentos induziram discreto infiltrado inflamatório nos períodos iniciais, o qual diminuiu com o tempo, e significante proliferação fibroblástica e de fibras colágenas nos períodos finais. O EndoREZ apresentou um comportamento biológico ligeiramente menos favorável em comparação ao AH Plus e ao Acroseal. Apresentou discreto infiltrado inflamatório nos períodos iniciais, que persistiu em todos os períodos avaliados. Nos períodos finais, uma proliferação fibroblástica e de fibras colágenas menos intensa, em relação aos outros cimentos testados.

Poucos estudos comparativos foram realizados com os cimentos utilizados neste estudo objetivando avaliar o comportamento biológico e utilizando a metodologia de implantação de tubos preenchidos com cimento no tecido subcutâneo de ratos. Gomes Filho<sup>5</sup> (2001) avaliou os cimentos Pulp Canal Sealer, Endométhasone e AH Plus através da mesma metodologia e encontrou resultados diferentes. Verificou que o AH Plus apresentou intensa reação inflamatória inicial, que diminuiu com o tempo. Aos 30 dias, verificou que ainda persistia uma discreta reação inflamatória. Esta diferença provavelmente pode estar relacionada com a intensidade do trauma cirúrgico ou o extravasamento do cimento para o tecido. Alguns estudos, nos quais o cimento AH Plus foi colocado em contato direto com as células, apresentaram reações inflamatórias intensas nos períodos iniciais, diminuindo com o tempo<sup>15-21</sup>. Esta capacidade do AH Plus induzir uma reação inflamatória inicial pode estar relacionada com a liberação de formaldeído durante a reação de presa e pelo componente Bisfenol-A diglicidil éter, presente em sua formulação. Porém, de acordo com Cohen *et al.*<sup>22</sup> (2000) a liberação de formaldeído pelo AH Plus é de 3,9 p.p.m. e do AH 26 é 1,347 p.p.m., portanto a liberação de formaldeído pelo AH Plus é mínima, corroborando os achados de Leonardo *et al.*<sup>23</sup> (1999). Pode-se inferir, então, que o componente Bisfenol-A diglicidil éter induziria esta intensa reação inflamatória inicial, quando em contato com os tecidos<sup>24</sup>.

Em relação ao Acroseal, poucos dados foram encontrados na literatura, em relação ao comportamento biológico. De acordo com os resultados encontrados neste estudo, o Acroseal apresentou um bom comportamento biológico, induzindo discreta reação inflamatória para todos os tempos testados. Estes achados podem estar relacionados com a presença do hidróxido de cálcio em sua com-

posição. Testes iniciais, comparando os diversos tipos de cimentos, verificaram que os cimentos à base de hidróxido de cálcio apresentaram menor citotoxicidade<sup>4</sup>. Nos testes secundários e de aplicação, os cimentos à base de hidróxido de cálcio apresentaram melhor comportamento biológico em relação a outros tipos de cimentos<sup>9-25</sup>. Cabe salientar que a biocompatibilidade é apenas um dos requisitos de um cimento endodôntico, o qual deve apresentar, também, algumas características físico-químicas para desempenhar as suas funções<sup>3</sup>.

Assim como o Acroseal, o EndoREZ não apresenta muitos dados na literatura em relação ao seu comportamento biológico. Neste estudo, foi o cimento que induziu uma reação inflamatória mais persistente, porém com a mesma intensidade em relação ao AH Plus e Acroseal. No período de 30 dias, o EndoREZ ainda induziu o edema e foi verificada menor quantidade de fibras colágenas. Perassi<sup>6</sup> (2004) avaliou o EndoREZ através da mesma metodologia e verificou reação inflamatória discreta até os 50 dias. Souza *et al.*<sup>16</sup> (2006) verificaram que o EndoREZ induziu reação inflamatória severa nos períodos de 4 e 12 semanas, porém a metodologia utilizada foi diferente. A reação inflamatória foi avaliada através de implantes de tubos de teflon em mandíbulas de porcos-da-índia. Por outro lado, Zmener *et al.*<sup>26</sup> (2005) através de implantes de tubos de silicone preenchidos com EndoREZ em tíbias de ratos, verificou, após 10 dias, reação inflamatória severa, que desapareceu após 60 dias. Os resultados encontrados por Perassi<sup>6</sup> (2004) estão de acordo com os achados deste estudo, porém o período de avaliação foi mais curto, findando aos 21 dias. Os resultados de Souza *et al.*<sup>16</sup> (2006) e Zmener *et al.*<sup>26</sup> (2005) apresentaram diferenças em relação aos resultados deste estudo, provavelmente pelo diferente local de implantação dos tubos preenchidos com o cimento EndoREZ. Estes pesquisadores utilizaram tecido ósseo como sítio de implante. Outra variável pode ter sido o critério de avaliação da reação inflamatória induzida pelos corpos de prova.

De acordo com os resultados deste estudo, verificou-se que o cimento Acroseal apresentou o melhor comportamento biológico, seguido do AH Plus e do EndoREZ, sucessivamente. Pode-se inferir que o cimento Acroseal pode ser empregado na rotina da clínica endodôntica<sup>4</sup>, assim como o AH Plus, pois, em estudos de aplicação em dentes de cães, este cimento apresentou bom comportamento biológico<sup>10</sup>.

Desta forma, pode-se inferir que a reação inflamatória em relação aos diferentes tipos de cimentos, avaliados por diferentes metodologias, é mais significativa nos períodos iniciais, decrescendo com o tempo e podendo influenciar no pós-operatório dos tratamentos endodônticos. Cabe ressaltar que mais estudos devem ser realizados no intuito de verificar as propriedades biológicas e físico-químicas dos cimentos endodônticos, em busca do cimento ideal.

## Conclusões

De acordo com os resultados obtidos através da metodologia empregada, pode-se concluir que:

1. Todos os cimentos induziram reações inflamatórias discretas.
2. As reações inflamatórias induzidas pelos cimentos diminuíram com o tempo, com exceção do EndoREZ.
3. O Acroseal apresentou o melhor comportamento biológico, seguido do AH Plus e EndoREZ, respectivamente.
4. Nenhum cimento induziu processos degenerativos, inclusive necrose.

## Referências

1. Hizatugu R, Kado ES, Miyasaki EM, Okino Neto K, Meneghini GP, Otani AY *et al.* Endodontia em sessão única. São Paulo: Santos; 2007. p.45-88.
2. Lopes HP, Siqueira Júnior JF. Endodontia – biologia e técnica. 2ªed. Rio de Janeiro: Medsi; 2004. p.623-31.
3. Grossman LL. An improved root canal cement. J Am Dent Assoc.1958;56(3): 381-5.
4. Schwarze T, Fiedler I, Leyhausen G, Geurtsen W. The cellular compatibility of five endodontic sealers during the setting period. J Endod. 2002;28(11):784-6.
5. Gomes Filho JE. Avaliação histológica da reação do tecido subcutâneo de ratos após implantação de cimentos endodônticos [dissertação de mestrado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2001.

6. Perassi FT. Resposta tecidual ao cimento endodôntico resinoso EndoRez e um cimento experimental derivado do polímero de mamona comparados ao Endofill e Sealapex. Estudo morfológico. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista; 2004.
7. Miletic I, Anic I, Pezelj-Ribaric S, Jukic S. Leakage of five root canal sealers. *Int Endod J*. 1999;32:415-8.
8. Mittal M, Chandra S, Chandra S. Comparative tissue toxicity evaluation of four endodontic sealers. *J Endod*. 1995;21(12):622-4.
9. Tagger M, Tagger E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH 26 in monkeys. *Endod Dent Traumatol*. 1989;5:139-46.
10. Leonardo MR, Silva LAB, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol*. 1999;15:28-32.
11. Fédération Dentaire International. Commission of Dental Materials, Instruments, Equipment and Therapeutics. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J*. 1980;30(2):140-88.
12. International Organization for Standardization – ISO 7405 Dentistry – Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – Test Methods for dental materials. Geneva: 1997.
13. Zmener O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: preliminary observations in the subcutaneous connective of rats. *J Endod*. 2004;30(5):348-51.
14. Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Geromichalos GD, Kortsaris AH. Cytotoxicity of three resin-based root canal sealers: an in vitro evaluation. *Endod Dent Traumatol*. 1998;14:182-5.
15. Camps J, About I. Cytotoxicity testing of endodontic sealers: a new method. *J Endod*. 2003;29(9):583-6.
16. Souza CJA, Montes CRM, Pascon EA, Loyola A, Versiani MA. Comparison of the intraosseous biocompatibility of AH-Plus, EndoRez, and Epiphany root canal sealers. *J Endod*. 2006;32(7):656-62.
17. Rodrigues RR. Comportamento dos tecidos periapicais em dentes de cães, após sobreobturação com quatro cimentos endodônticos. [tese de doutorado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas; 2004.
18. Pascon EA, Leonardo MR, Safavi K, Langeland K. Tissue reaction to endodontic materials: methods, criteria, assessment, and observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991;72:222-37.
19. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966;21(3):379-87.
20. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1967;24(5):674-83.
21. Huang TH, Lii CK, Chou MY, Kao CT. Lactate dehydrogenase leakage of hepatocytes with AH 26 and AH-Plus sealer treatments. *J Endod*. 2000;26(9):509-11.
22. Cohen BI, Pagnilo MK, Musikant BL, Deutsch AS. An in vitro study of the cytotoxicity of two root canal sealers. *J Endod*. 2000;26(4):228-5.
23. Leonardo MR, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Silva RS. Release of formaldehyde by 4 endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 1999;88(2):221-5.
24. Schweikl H, Schmalz G, Federlin M. Mutagenicity of root canal sealer AH-Plus in Ames test. *Clin Oral Invest*. 1998;2:125-9.
25. Kolokouris I, Economíades N, Beltes B, Vlemmas I. In vivo comparison of the biocompatibility of two root canal sealers implanted in to the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod*. 1998;24(2):82-5.
26. Zmener O, Banegas G, Pameijer CH. Bone tissue response to a methacrylate-based endodontic sealer: a histological and histometric study. *J Endod*. 2005;31(6):457-9.

**Endereço para correspondência:**

Dr. Kazuzo Okino Neto  
R. Albuquerque Lins, 537 – cj. 15-18 – Higienópolis  
São Paulo-SP, CEP 01230-001  
Brasil

E-mail: kazuzo@uol.com.br

Recebido em 10 de novembro de 2009  
Aceito em 16 de dezembro de 2009