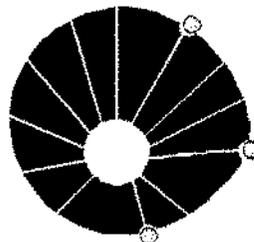


FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



UNICAMP

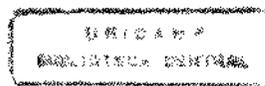
JOÃO EDUARDO GOMES FILHO

**ESTUDO DO MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DO GLICOL
METACRILATO COMO MATERIAL DE INCLUSÃO DE
IMPLANTES SUBCUTÂNEOS EM RATOS**

Tese apresentada ao Curso de Clínica Odontológica- Área de Endodontia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre.

PIRACICABA

- 1999 -



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

JOÃO EDUARDO GOMES FILHO

**ESTUDO DO MÉTODO DE UTILIZAÇÃO DO GLICOL
METACRILATO COMO MATERIAL DE INCLUSÃO DE
IMPLANTES SUBCUTÂNEOS EM RATOS**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83


Assinatura do Orientador

Tese apresentada ao Curso de Clínica
Odontológica- Área de Endodontia, Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do Título
de Mestre.

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO JOSÉ DE SOUZA FILHO

PIRACICABA

- 1999 -

Ficha Catalográfica

G585e Gomes Filho, João Eduardo.
Estudo do método de utilização do glicol metacrilato como material de inclusão de implantes subcutâneos em ratos. / João Eduardo Gomes Filho. – Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.
102p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

I. Biocompatibilidade. 2. Endodontia. 3. Cimentos dentários. I. Souza Filho, Francisco José de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Mariênc Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 08 de Outubro de 1999, considerou o candidato JOÃO EDUARDO GOMES FILHO aprovado.

1. Prof. Dr. FRANCISCO JOSE DE SOUZA FILHO

2. Prof. Dr. IVALDO GOMES DE MORAES

3. Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais **JOÃO** e **NEIDE**, pelo amor que me conduziu desde a infância, com o qual pude sempre contar para alcançar este objetivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me reservar sempre os melhores caminhos

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, na pessoa de seu digníssimo diretor Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos.

À CAPES pelo apoio financeiro

À Profa. Dra. Altair A. Del Bel Cury, coordenadora geral do curso de Pós-graduação

À Profa. Dra. Mônica Campos Serra, coordenadora do curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, pelo incessante empenho e dedicação.

Ao meu co-orientador e amigo Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes pelo imenso interesse e apoio.

Aos professores da Disciplina de Endodontia, Prof. Fabrício Batista Teixeira, Prof. Caio Cesar Randi Ferraz, Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr Alexandre Augusto Zaia, Prof. Dr Luiz Valdrighi , que representam mais que uma equipe, para mim representaram uma construção intelectual

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia e Histologia, Rúbens, Cida, Denize, Adailton, Ivani, Cidinha, sem os quais seria impossível o desenvolvimento deste trabalho.

À minha querida Juliana pelo carinho, amor, e compreensão que sempre me incentivaram neste caminho

Aos meus grandes amigos e companheiros Cássio, Fábio e Johnson pela amizade em mim depositada.

Aos meus amigos de curso, Gerson, João Odilo, Assis, Eudes e Eneida, pela grande amizade que pudemos nutrir e que com certeza a manteremos pelo resto de nossas vidas.

A todos os amigos da Pós-graduação pela amizade e carinho que pudemos compartilhar.

SUMÁRIO

CAPÍTULO

	PÁGINA
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUÇÃO.....	5
REVISÃO DA LITERATURA.....	11
MÉTODOS DE ESTUDO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS.....	11
GLICOL METACRILATO.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	61
RESULTADOS.....	69
DISCUSSÃO.....	83
CONCLUSÕES.....	95
BIBLIOGRAFIA.....	97

RESUMO

Um dos métodos mais práticos e usados para o estudo da biocompatibilidade dos cimentos endodônticos é a implantação de tubos de polietileno contendo esses materiais no tecido subcutâneo de ratos. A ação irritante desses cimentos é, então, avaliada pelo exame histopatológico da resposta tecidual ao redor do material. No entanto, o processamento histológico das peças contendo o tecido e o tubo, geralmente incluídos em parafina, apresenta dificuldades técnicas que podem influir na imagem final e conseqüentemente na avaliação dos resultados. O objetivo deste trabalho foi estudar a eficiência do glicol metacrilato como material de inclusão de tecido subcutâneo de ratos implantados com tubos de polietileno contendo cimento endodôntico. Para o experimento foram utilizados tubos de polietileno termicamente selados em uma das extremidades preenchidos com cimento endodôntico (Endométhasone), os quais foram implantados em tecido subcutâneo de ratos. Após 30 dias, os ratos foram sacrificados e peças contendo tecido epitelial, tubo preenchido por cimento, tecido conjuntivo e tecido muscular foram removidos e fixados em Bouin por 24 horas e em seguida deixados em solução de formol tamponado até o momento do processamento histológico. Os tubos foram localizados no interior das peças e seccionados transversalmente, sendo que o segmento que continha a extremidade selada foi descartado e o outro dividido longitudinalmente ao meio para que fossem obtidas duas hemi-metades muito semelhantes. Uma hemi-metade foi processada histologicamente pelo método da parafina e a outra pelo método do glicol metacrilato. Os resultados obtidos com a inclusão em glicol metacrilato foram superiores aos da parafina, mostrando uma boa qualidade histológica, que permitiu uma melhor análise das células e dos tecidos com a microscopia óptica. Desta maneira pode-se concluir que a inclusão em glicol metacrilato é um método alternativo e eficiente para avaliar a biocompatibilidade de cimentos endodônticos em tecido subcutâneo de ratos

SUMMARY

One of the most practical and widely used methods to assess the biocompatibility of endodontic sealers is the implantation of polyethylene tubes filled with the sealer into the subcutaneous connective tissue of rats. The irritant effect of the sealers is then evaluated by the histological process of the tubes with surrounding tissue, usually using paraffin embedding, presents several technical difficulties which can influence in the analysis of the results. The aim of this work was to study the efficiency of glycol methacrylate as embedding material of rat subcutaneous tissue which received implants of tubes filled with endodontic sealer. Polyethylene tubes hot sealed in one end and were filled with endodontic sealer (Endomethasone) were implanted into subcutaneous tissue of rats. After the 30 days, the animals were killed and blocks with epithelium tissue, tube and sealer, connective tissue and muscular tissue were removed and fixed in Bouin to 24 hours and in 10% buffered formalin until being processed. The tubes were then transversally cut to higher axis, the sealed part was despised and the other one cut in the middle of the higher axis, this way we had two similar halves. One of the halves was processed by paraffin embedding method and the other one by glycol methacrylate method. The results achieved when the glycol methacrylate was used were highly superior than the ones with paraffin, showing a good histologic quality which allowed an improved analysis of cell and tissues biology with light microscopy. Therefore, it is concluded that the glycol methacrylate is an alternative and efficient method to assess the biocompatibility of endodontic sealers into subcutaneous tissue of rats.

INTRODUÇÃO

A terapia endodôntica, particularmente os procedimentos biomecânicos, envolve a remoção de microorganismos e seus produtos, bem como debrís e substratos potenciais, e desta forma previne ou inibe futuros crescimentos bacterianos. Em seqüência, há uma preocupação em se evitar a reinfecção do espaço já limpo e preparado com um material que permita uma completa obturação. Dentre os materiais mais utilizados estão a guta-percha e o cimento endodôntico, os quais devem possuir propriedades físicas e biológicas aceitáveis (6,16; 17).

Para que um cimento seja biocompatível, ele deve ser atóxico, não causar necrose tecidual e ser rapidamente aceito pelos tecidos sem manter uma seqüela inflamatória (19, 30).

Os métodos de avaliação da biocompatibilidade incluem a utilização de dentes de animais (38, 40), injeção em tecido subcutâneo de coelhos (7, 18), tecido subcutâneo de ratos (10, 11, 13, 24, 27, 28, 30, 31, 34, 35, 37, 47, 48), cultura de células (25, 41, 45).

Um dos métodos para avaliação da biocompatibilidade de cimentos endodônticos em tecido subcutâneo de ratos utiliza a implantação de tubos de polietileno contendo o cimento a ser avaliado. Este método é simples e de fácil reprodução e padronização. No entanto, o processamento histológico das peças contendo o tecido e/ou o tubo, geralmente incluídas em parafina (13; 24; 27; 28, 34; 35, 41; 47,48), apresenta grandes dificuldades tanto durante a microtomia quanto na qualidade final do material histopatológico, dificultando a quantificação celular no processo inflamatório (3, 14, 29).

Resinas polimerizáveis têm sido utilizadas para processamento histológico de tecidos animais e vegetais com grande vantagem sobre a parafina, pois permite cortes com pouca distorção e com maior preservação do tecido, além disso, virtualmente permite a identificação de todas as células (1; 2; 3; 9; 14; 21; 29; 32; 39; 42; 50).

Rosenberg et al. (39), em 1960, utilizaram pela primeira vez o glicol metacrilato como material para inclusão de tecidos biológicos para serem analisados em microscópio eletrônico. Somente em 1974, o glicol metacrilato foi reconhecido como material para inclusão de tecido animal para estudo em microscópio de luz (9).

De acordo com Cole (9), as principais características que fazem do glicol metacrilato (GMA) um material de escolha para inclusão de tecido em microscopia de luz incluem : a) facilidade para infiltrar no tecido sem a completa remoção da água; b) seu monômero é miscível em água e etanol; c) tecido mole e tecido duro são bem infiltrados e suportados pelo GMA; d) a temperatura pode ser mantida entre 0-4°C, o que reduz artefatos provocados pela temperatura; e) os cortes puderam ser feitos de 0,5-3,0 micrometros de espessura, proporcionando grande capacidade de identificação celular; f) a remoção do polímero do tecido previamente à coloração não é necessário.

Contudo, não se percebe na literatura estudada, a utilização do glicol metacrilato como material de inclusão de tecido subcutâneo de ratos para o estudo comparativo da biocompatibilidade de cimentos endodônticos.

Com base nestes achados, observa-se que a preservação da morfologia celular, a redução de artefatos de técnica e a possibilidade de identificar e quantificar os tipos celulares são características histológicas fundamentais para se avaliar a biocompatibilidade de um material. Desta forma, propõem-se a estudar o método de utilização do glicol metacrilato como material de inclusão de tecido subcutâneo de ratos.

PROPOSIÇÃO

O objetivo desse trabalho foi avaliar o método de inclusão de tecido subcutâneo de ratos em glicol metacrilato.

REVISÃO DE LITERATURA

MÉTODOS DE ESTUDO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS

GUTTUSO, em 1963, avaliou a resposta inflamatória do tecido conjuntivo de ratos após a implantação de materiais endodônticos. Foram utilizados 10 diferentes materiais (AH-26, Riebler, Diaket, cimento Kerr, Pro-cosol, Tubli-Seal, Microcide A, N2 Medical e PBSC), em trinta e seis ratos adultos saudáveis, os quais foram anestesiados por inalação de éter. Em cada rato, 3 áreas (ventre abdominal, dorso interescapular, e dorso pélvico) foram tricotomizadas por um aparelho elétrico e desinfetada com álcool 70% e uma incisão de 1 cm foi feita horizontalmente. Os cimentos foram espatulados e injetados no interior do tecido, numa quantidade aproximada de 0,1cc por área. Já os materiais semilíquidos necessitaram de incisão o suficiente para que uma agulha perfurasse o tecido subcutâneo e foram implantados embebedos em pontas absorventes com 1,0 cm de comprimento.

Os animais foram sacrificados com uma overdose de clorofórmio após 2, 16 e 32 dias. Uma área grande ao redor de cada implante foi removida e imediatamente colocada em formol a 10%. As peças foram então levadas ao processamento histológico, com inclusão em parafina e cortes de aproximadamente 8 micrometros.

Não foram identificadas alterações grosseiras no tecido implantado com AH 26, Diaket, cimento Kerr, Micro-Cide A, e PBSC, já ao implante de N2, N2 Medical, Proco-Sol, Riebler, e Tubuiseal, em 16 dias, houve uma reação severa que provocou abscesso evidente ou ulceração do tecido. Mas ao trigésimo segundo

dia, os tecidos de todos os ratos apresentaram normalidade, exceto pela evidência de área ulcerada no ventre do animal no qual foi implantada a resina Riebler.

Concluiu que o Diaket tem vantagem em relação ao cimento Kerr por não conter metal, bem como o uso de N2, N2 Medical e Riebler não é indicado. Nenhuma conclusão foi tomada a respeito do Micro-Cide A, pois tiveram uma resposta similar às pontas de papel controle e este fato permitiu concluir que as pontas de papel absorvente não são um bom veículo para estudo de líquidos.

TORNECK, em 1966, investigou a influência de um espaço não preenchido, bem como de outros fatores locais normalmente associado com o reparo endodôntico do tecido.

tubos de polietileno de variados comprimentos e diâmetros foram implantados cirurgicamente no dorso de ratos. Antes da implantação os tubos foram desinfetados em solução de iodo, depois lavados em solução salina, secos com gaze estéril e armazenados em tubos estéreis até o uso. Para a primeira fase os tubos tiveram as duas extremidades abertas e na segunda uma das extremidades foi termicamente selada antes da desinfecção.

Os tubos permaneceram implantados por 60 dias, quando os animais foram sacrificados, o implante e o tecido adjacente foram removidos e fixados em formalina 10% para processamento histológico com inclusão em parafina e coloração com HE e Mallory.

Pontes de tecido desenvolveram-se no lume de alguns tubos e não em outros. Naqueles onde não houve formação de tecido no lume, também não foi

observado invaginação do tecido para o interior do tubo. Nos tubos selados de um lado, preveniu-se a invaginação, embora em alguns tubos foi observada a tentativa de invaginação.

A invaginação ocorreu nos tubos abertos de pequeno comprimento e grande diâmetro. Em tubos selados de um lado, a invaginação ocorreu primariamente em pequenos diâmetros, indicando que os fatores que influenciam o crescimento individual são diferentes em cada sistema. Em todos os espécimes um fluido seroso foi observado preenchendo o tubo e este fluido pareceu não influenciar a indução da inflamação.

Concluiu que um canal limpo e desinfetado resultaria provavelmente na cura do tecido periapical, desde que o tecido tenha uma capacidade de reparo normal.

PHILLIPS, em 1967, avaliou a resposta tecidual a tubos de polietileno vazios implantados em subcutâneo de ratos.

Os tubos tinham 6mm, 10mm e 15mm de comprimento com 6 diâmetros diferentes para cada comprimento, os quais antes de serem implantados foram desinfetados.

Os ratos foram anestesiados por inalação de éter e as áreas a serem implantadas receberam tricotomia e desinfecção. Quatro tubos com 4 secções diferentes foram implantados em cada rato.

Os animais foram sacrificados 60 dias após o implante pela inalação de éter e os blocos de tecido contendo os tubos foram removidos e fixados em formalina 10%. Os espécimes seguiram para processamento histológico com

inclusão em parafina e foram seccionados com 6 micrômetros de espessura e coloração HE.

Os resultados mostraram que todos os tubos foram encapsulados por tecido conjuntivo fibroso e os tubos de comprimento menor com maior diâmetro interno demonstraram um invaginação de tecido. Nenhuma resposta inflamatória foi encontrada com nenhum tubo.

ROWE, em 1967, investigou a reação do tecido periapical de gatos frente a alguns materiais obturadores de canal radicular. Foram utilizados 58 dentes de 16 gatos. Os materiais utilizados foram os seguintes: óxido de zinco e eugenol, uma mistura de sulfato de bário, formalina e componentes anti-inflamatórios, cimento de Grossman, Ledermix, N2 Normal e N2 apical.

Os animais foram anestesiados, o dente selecionado foi limpo com álcool 70% e a abertura coronária realizada. O comprimento do dente foi obtido com alargador e a irrigação realizada com peróxido de hidrogênio 5vol.. Então, o material selecionado foi introduzido no canal com instrumento em rotação e o dente selado com amálgama.

Os animais foram sacrificados após 2, 6, 12, 14, 16 e 20 semanas, quando os blocos de dissecação do dente e do tecido ósseo adjacente foram removidos, imediatamente fixados em formalina 10% e descalcificados. Os blocos foram, então, processados histologicamente com inclusão em parafina, e obtidos cortes de 9 micrômetros e coloração com hematoxilina e eosina.

Os resultados mostraram que a adição de formalina e um agente anti-inflamatório ao material obturador, o qual continha eugenol modificado

(diluído em óleo de oliva), pode ser válido para a redução da inflamação nos primeiros meses após a remoção da polpa.

TORNECK, em 1967, investigou a reação do tecido conjuntivo de ratos a tubos de polietileno preenchidos com debris celulares contaminados e comparou com a reação de tubos preenchidos com os mesmos debris celulares, porém estéreis estéreis.

Tubos de polietileno de variados comprimentos e diâmetros foram implantados cirurgicamente no dorso de ratos. Antes da implantação os tubos foram desinfetados em solução de iodo, depois lavados em solução salina, secos em gaze estéril e armazenados em tubos estéreis até o uso. Para a primeira fase os tubos tiveram as duas extremidades abertas e numa segunda uma das extremidades foi termicamente selada antes da desinfecção.

Alguns tubos selados em uma extremidade foram preenchidos com fragmento de tecido muscular da perna traseira de rato e colocados em solução salina para serem autoclavados. Outros tubos também selados foram preenchidos com o mesmo tecido muscular, só que contaminados com cocos Gram-negativo.

Os tubos foram, então, implantados em subcutâneo de ratos por 60 dias. Ao final deste período os animais foram sacrificados e o tecido removido e fixado, para processamento histológico com inclusão em parafina e coloração HE e Giemsa e Gram.

Os achados indicaram que o prognóstico de reparo foi menos favorável quando o lume foi preenchido com debris contaminados. Em ambas as

condições de tubo preenchido (contaminado ou não), o reparo foi menos favorável que quando o tubo estava estéril sem preenchimento algum.

BROWNE, FRIEND, em 1968, investigaram a irritação do tecido subcutâneo de coelhos a alguns materiais obturadores. Os materiais testados foram amálgama de prata, N2 normal, Putridomors, Diaket normal, Diaket A, AH26, Kri I, óxido de zinco e óleo de oliva.

As amostras dos materiais foram colocadas em tubos de polietileno de 5,00mm de comprimento, 0,50mm de diâmetro interno, e paredes de 0,25mm de espessura, sendo que os excessos foram removidos com gaze para que os tubos pudessem ser implantados na região de flancos e nuca de coelhos. Tubos com solução salina também foram implantados e serviram como controle.

Os animais foram anestesiados e as regiões receptoras dos implantes foram tricotomizadas e desinfetadas com tintura de clorexidina 2% para realização das incisões. Os tubos foram implantados de modo a ficarem a pelo menos 22mm da borda da incisão. As incisões foram suturadas e desinfetadas novamente com tintura de clorexidina 2%.

As amostras permaneceram em contato com o tecido por 2 dias, 4 dias, 7 dias e, 4 semanas, 3 meses, 6 meses e 12 meses, sendo que 4 coelhos foram sacrificados a cada período de tempo e cada um continha 1 implante de cada material. Ao final de cada período os tecidos contendo as amostras foram removidos e fixados em formalina 10% por 24 horas e processados histologicamente com inclusão em parafina. Foram efetuados cortes seriados de 8 micrômetros e corados com HE.

Como resultado obtiveram que todos os materiais causaram grande reação inflamatória em 2 dias com exceção do N2 normal, e a maior reação inicial se deu com o amálgama. Com 4 semanas não houve diferença significativa entre os materiais. Com 3 meses houve uma maior reação ao Diaket normal, e os materiais AH26, Ledermix, e amálgama não foram irritantes. Uma leve reação persistiu por 12 meses em todos os materiais e um tecido fibroso cresceu para o interior dos tubos preenchidos com solução salina e pasta Kri após 3 meses.

SPANGBERG; LANGELAND; em 1973, avaliaram a citotoxicidade de 12 materiais obturadores *in vitro*, utilizando um novo método, o qual permitiu um completo contato entre o material e as células, o que possibilitou a quantificação da toxicidade.

Os resultados mostraram que todos os materiais testados foram altamente tóxicos quando recém manipulados, embora, um cimento experimental tenha sido menos tóxico que os demais materiais. A cloropercha, após a evaporação do clorofórmio, teve a menor toxicidade de todos os materiais, após a presa.

Concluíram que foi possível consurgir uma correlação entre os métodos *in vitro* e *in vivo*.

DE SOUZA, et al, em 1977, analisaram a resposta do tecido subcutâneo de rato a várias pastas à base de hidróxido de cálcio, após a implantação de tubos de dentina humana contendo as diferentes substâncias do estudo. Esses tubos de dentina apresentavam abertura com dois diâmetros diferentes nas

extremidades para que a influência da dimensão da área de contato na resposta do tecido pudesse ser verificada.

Os materiais testados foram hidróxido de cálcio com água destilada, Calxyl, Pulpdent, hidróxido de cálcio DFL, Dycal, MPC, Formagen, pasta de hidróxido de cálcio com iodofórmio, pasta de hidróxido de cálcio com PMCCanforado, Pasta A, composta de 4,0g de hidróxido de cálcio, 2,0g de óxido de zinco e 5,0mL de propilenoglicol, Pasta B composta de 5,0 g de hidróxido de cálcio, 2,5g de óxido de zinco, 3,5mL de óleo de oliva, 4,0mL de bálsamo do Canadá e 2,5mL de propilenoglicol, e Calvital.

Os tubos de dentina de 5,0 a 7,0 mm de comprimento foram preparados a partir do 1/3 apical das raízes dos dentes humanos extraídos, os quais foram alargados com alargador 35 passando para brocas 702. Os mesmos foram preenchidos com o material e implantados na região do dorso do animal, um de cada lado da linha média em 432 ratos que foram divididos em 12 grupos e para controle os tubos foram implantados em 365 animais adicionais.

Decorridos os períodos de 2, 7, 15, 30, 60 e 180 dias, os animais foram sacrificados, as peças removidas e fixadas em formalina 10% para processamento histológico com inclusão em parafina, cortes seriados de 6 micrometros e coloração com hematoxilina e eosina.

Os resultados mostraram que: 1- a resposta do tecido conjuntivo do rato foi semelhante nas duas extremidades do tubo; 2- o hidróxido de cálcio, Calxyl, Pulpdent, hidróxido de cálcio DFL, hidróxido de cálcio e iodoformio, hidróxido de cálcio com p. monoclorofenol canforado, Calvital e pasta A estimularam a deposição de uma barreira de tecido mineralizado nas extremidades dos tubos

de dentina, isolando o material do tecido conjuntivo; 3- O Formagen produziu somente a deposição de barreiras parciais de tecido duro, em alguns espécimes 4- O Dycal, MPC e pasta B não induziram a deposição de barreira; 5- o acréscimo de aditivos ao hidróxido de cálcio pode reduzir sua capacidade de estimular a deposição de tecido calcificado.

CRANE et al, em 1980, compararam as características biológicas e físicas de um cimento obturador de canal radicular sem eugenol (experimental) com outros 2 cimentos sem eugenol - Tubliseal e Pulp canal sealer.

Três amostras de cada material foram feitas para se determinar o tempo de trabalho, o tempo de presa, a dureza e o pH. O tempo de trabalho foi definido quando a guta-percha não pode ser envolvida facilmente pelo cimento, já o tempo de presa foi aquele no qual a espátula não pode erguer o cimento sobre seu próprio peso. A dureza em 24 horas foi medida por um durômetro e o pH foi medido com eletrodos de um medidor de pH.

Para infiltração marginal foram utilizados canais radiculares de dentes humanos extraídos obturados com guta-percha e cimento pela técnica da condensação lateral. Canais obturados com guta-percha mas sem cimento foram utilizados como controle. Após a obturação, as raízes foram seladas com cera exceto 0,5 mm apical e, então, imersa em azul de metileno, seccionada em cortes de 0,75mm e as obturações avaliadas à partir da penetração do corante.

A compatibilidade do material ao tecido foi investigada pela implantação subepitelial de tubos de polietileno contendo os materiais. Os animais foram sacrificados após 24, 48, e 96 horas e 6 meses, quando os blocos de tecido

foram removidos e processadas histologicamente com inclusão em parafina e coloração com hematoxilina e eosina. A reação foi graduada em 4 graus - 0 (nenhuma reação), 1 (leve reação), 2 (moderada reação) 3 (severa reação).

Concluíram que o tempo de presa e de trabalho do cimento sem eugenol foi maior que dos demais materiais testados. O tempo de presa para todos os materiais foi clinicamente aceitável. A dureza, o pH e o selamento de todos os cimentos foram similares. O cimento sem eugenol foi mais biocompatível, embora em 6 meses não tivesse sido detectada diferença significativa entre os cimentos.

LANGELAND; OLSSON; PASCON, em 1981, testaram as características físicas e biológicas do Hydron, as quais eram preconizadas pelo fabricante: 1- inerte, biocompatível, atóxico, e antiinflamatório; 2- não causa reação de corpo estranho, reabsorção, ou interferência com o reparo do tecido ao qual está em contato; 3- sela e preenche completamente o canal.

As propriedades físicas do material variaram com a quantidade de água presente durante a presa. A colocação acurada do material foi difícil e a sua remoção após a presa dependeu do uso de brocas.

No teste biológico, a implantação do material no tecido provocou reação e macrófagos e corpos estranhos foram transportados da área original. Este transporte foi ativo durante 480 dias. A reação inflamatória variou em intensidade e extensão.

MORSE et al, em 1981, testaram soluções de eugenol, clorofórmio, eucaliptol e água destilada, quanto às suas biocompatibilidades em tecido subcutâneo de ratos.

Trinta e dois ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio 65mg/mL, 5,1mg/100g de peso. Após a tricotomia 4 círculos foram feitos com caneta na pele dos animais, onde foram injetadas as soluções no tecido subcutâneo.

Após 6 horas os ratos foram sacrificados com injeção de pentobarbital de sódio, os blocos de tecido removidos e fixados em formalina 10%. O processamento histológico se deu com inclusão em parafina e cortes de 5 a 6 micrômetros de espessura. A observação ao microscópio óptico quantificou o número de células inflamatórias para dar o seguinte "score" menos de 25 células inflamatórias – grau 1 (nenhuma inflamação), de 25 a 124 - grau 2 (leve inflamação), 125 ou mais – grau 3(moderada ou severa inflamação , incluindo necrose).

Os resultados mostraram que o eugenol desenvolveu uma reação inflamatória mais severa que as outras soluções. Considerando-se que o eugenol se mostrou altamente irritante e que o clorofórmio foi banido pela FDA, o eucaliptol deveria ser mais amplamente utilizado na endodontia.

OLSSON, SLIKWSKI, LANGELAND, em 1981, avaliaram o método de implantação de tubos de teflon contendo materiais endodônticos, no interior de tecido subcutâneo de ratos, para testar a biocompatibilidade e enquadrar os

materiais em níveis de toxicidade. Os materiais testados foram cloropercha, cimento Kerr, e AH26.

Quarenta e dois ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 0,4mL de Ketamine HCl 100mg/mL contendo acepromacine, 0,05mg/mL. Após tricotomia do dorso do animal e desinfecção com 5% de iodo alcoólico, incisões foram feitas e 4 bolsas preparadas com profundidade de 20mm. Os tubos de teflon de 7mm de comprimento e diâmetro interno de 1,3mm foram autoclavados e preenchidos com os materiais e, então, implantados cuidadosamente para evitar que o material se espalhasse. As incisões foram então suturadas com fio cirúrgico.

Seis animais foram sacrificados com superdose de Ketamine 14 dias após. Outros 12 com 30, 90 e 180 dias. Os tubos foram removidos juntamente com o tecido adjacente e imersos em formalina 10% por 48 horas, quando os blocos foram processados histologicamente com inclusão em parafina e cortados com 5 micrometros e corados com HE, Tricromio de Masson, azul de metileno, e Brown e Brenn. Observou-se a ocorrência de tecido fibroso, de vários tipos de células inflamatórias, e de alterações vasculares, graduando a reação em leve, moderada e severa.

A severidade da reação variou amplamente dentro de cada grupo e foi possível concluir que o método de implantação serve para avaliar os materiais endodônticos, mas um "ranking" de biocompatibilidade só seria possível para materiais com considerável diferença de toxicidade.

GROSSMAN, EDUARD, em 1982, examinaram algumas essências oleosas, usando o eugenol como controle positivo e solução salina como controle negativo, para determinar se alguma delas era menos irritante que o eugenol.

Oito coelhos foram tricotomizados, desinfetados com álcool antes de serem feitos círculos no dorso do animal para demarcar a área a ser injetada com 0,05mL da essência a ser testada.

O exame macroscópico foi feito com 24 e 48 horas, 1 semana, 14 dias e em alguns casos 1 mês, para visualizar a reação inflamatória, presença de edema e necrose.

Os animais foram sacrificados com injeção de Ketamine e blocos de tecido foram removidos e fixados em formalina para processamento histológico de rotina. A reação foi graduada em leve, moderada ou severa.

Três essências - anetol, anis, e folha de pimenta foram menos irritantes que o eugenol.

PITT FORD, em 1983, examinou o selamento proporcionado por 4 materiais obturadores, comparando com a reação tecidual dos mesmos materiais, para verificar alguma correlação. Os materiais utilizados foram ASPA IV, Kalzinol, Poly F, Endoseal.

Dentes humanos extraídos foram selecionados e armazenados em solução salina antes da preparação convencional e obturação do canal com os cimentos e guta-percha. Após a presa, os dentes foram cobertos com verniz, exceto o forame apical e retornado à solução salina. Foram, então, imersos em

solução de eosina por 48 horas e cortados longitudinalmente para que a profundidade de penetração do corante pudesse ser identificada.

Para a investigação da reação tecidual, utilizou-se dentes de cães, preparando os incisivos e pré-molares. As polpas dos dentes foram removidas e procedeu-se irrigação e imediata obturação, sendo que os ápices dos dentes não foram alargados e nenhum dente foi sobreinstrumentado. O acesso coronário foi selado com amálgama.

Após 3 ou 12 meses, os dentes foram removidos e preparados histologicamente com coloração H.E. e Brown e Brenn. A reação inflamatória foi graduada em nenhuma, leve e severa, dependendo do número de células inflamatórias existentes.

Os resultados não mostraram qualquer tipo de correlação entre a infiltração do corante e a biocompatibilidade do cimento. Conclui, portanto, que é necessário preencher o canal mas não há necessidade de se promover um selamento hermético. A importância do teste in vitro parece ter sido sobrenfatizado no passado.

SAFAVI, PASCON, LANGELAND, em 1983, avaliaram a resposta do tecido subcutâneo de ratos frente a dois cimentos endodônticos, usando uma técnica de injeção e medição morfométrica. Os materiais testados foram AH26 e Hydron.

Quarenta e oito ratos foram anestesiados intramuscularmente com combinação de Ketamine HCl (100mg/mL) e acepromancine (0,05mg/mL). A pele foi tricotomizada e desinfetada com álcool 70%. Um mL5 de cada material

foi injetado no interior de tubos de teflon com auxílio de uma seringa e agulha 20x1. Os tubos possuíam de 5 a 7mm de comprimento, 1,7mm de diâmetro total e diâmetro interno de 1,3mm, sendo que uma das extremidades foi ocluída.

Para a implantação, a pele dorsal do animal foi perfurada para evitar hemorragia durante a penetração de uma agulha G-14, biselada, a qual continha em seu interior o tubo de teflon. Os tubos foram implantados de modo que a extremidade ocluída ficasse voltada para a ponta da agulha e para auxiliar a implantação, um embolo foi utilizado no interior da agulha.

Após um período de 90 minutos, 7, 14, 30, 90, e 180 dias, os ratos foram sacrificados em câmara de CO₂ ou por super dose intracárdica de ketamine. Os tubos e o tecido adjacente foram removidos e fixados em formalina 10% por 48 horas para o processamento histológico com inclusão em parafina e coloração HE, Tricromico de Masson, azul de metileno, e Brown e Brenn.

Necrose e inflamação foram observadas ao redor dos materiais em todos os intervalos de tempo. Concluíram que o método foi convincente para uma avaliação qualitativa dos materiais, mas não permitiu um "ranking" acurado da biocompatibilidade dos materiais.

TANZILI et al, em 1983, compararam a resposta do tecido subcutâneo de ratos ao Hydron e à guta-percha mais cimento Tubliseal.

Trinta e dois tubos de polietileno selados termicamente em uma das extremidades, os quais mediam 10mm de comprimento e 1,5mm de diâmetro interno, foram preenchidos com Hydron, ou guta-percha mais o cimento Tubliseal. Imediatamente após o preenchimento, os tubos foram implantados no

subcutâneo do rato, sendo que 4 tubos (2 de cada material) foram implantados em cada animal. O tecido da periferia do tubo foi usado como controle.

Os animais foram sacrificados após 3 e 7 semanas, e 3 e 6 meses, quando o tubo e o tecido periférico ao tubo foram removidos e fixados em formalina 10%. O processamento histológico se deu com inclusão em parafina, cortes seriados de 6 micrometros e coloração HE e Von Kossa.

Os tubos preenchidos com Hydron mostraram uma expansão e reabsorção do material com distribuição deste no tecido conjuntivo, além disso, uma moderada cápsula de tecido conjuntivo contendo macrófagos se formou na interface material/tecido. Depósitos calcificados amorfos foram identificados próximo ao Hydron, sendo mais denso na interface Hydron/tecido. Já os tubos preenchidos com guta-percha e cimento Tubliseal demonstraram cápsula de tecido conjuntivo mais fina, com pequena distribuição ou reabsorção do material pelo tecido e uma leve resposta linfocitária próxima à cápsula fibrosa.

Concluíram que o Hydron tem capacidade de induzir calcificação, mas não é estável dimensionalmente e induz resposta macrofágica. Já a guta-percha mais cimento e Tubliseal pareceram ser relativamente inertes e poderiam ser usados como material obturador.

KETERRING, TORABINEJAD, em 1984, se propuseram a estudar a combinação de vários aspectos relacionados à citotoxicidade de 5 cimentos obturadores de canal radicular. Os cimentos foram testados em HeLa e cultura de fibroblastos. Os cimentos testados foram Tubliseal, Diaket, AH26, cimento de Grossman, e cimento de Wach.

A toxicidade foi medida pela incorporação de timidina aos componentes do ácido nucleico de cada tipo de célula usada. Os resultados mostraram que todos os cimentos testados são tóxicos em ambos os estados fresco ou após a presa e que o "ranking" de toxicidade dos cimentos em Hela foi similar à cultura de fibroblastos. Os resultados comparados aos achados de outros autores permitiram concluir que o "ranking" é duvidoso.

MORSE et al, em 1984, avaliaram a toxicidade de materiais endodônticos em tecido subcutâneo de ratos. Os materiais testados foram cimento de óxido de zinco e eugenol, cloropercha, eucapercha, e xilopercha.

Dez ratos foram usados para injeção dos materiais. Uma área circunscrita de 10mm de diâmetro serviu como orientação para a injeção e posterior coleta do material a ser analisado. Os animais foram sacrificados após 48 horas com injeção de pentobarbitol de sódio intracárdica, quando as peças de tecido contendo o tubo foram removidas e fixadas em formalina 10% para o processamento histológico de rotina com inclusão em parafina.

Os graus de inflamação foram determinados pela quantidade de células inflamatórias proporcionando o seguinte "score" menos de 25 células inflamatórias – grau 1 (nenhuma inflamação), de 25 a 124 - grau 2 (leve inflamação), 125 ou mais – grau 3(moderada ou severa inflamação).

Os resultados mostraram que a xilopercha e o óxido de zinco e eugenol causaram significativamente maior inflamação que a cloropercha e eucapercha. A eucapercha foi significativamente melhor que os outros 3 materiais.

CALLIS, SANTINI, em 1987, examinaram a resposta do tecido periapical ao cimento de ionômero de vidro usado como material obturador retrógrado de canais radiculares e compararam a resposta tecidual à da guta-percha mais Tubliseal.

Caninos inferiores de 10 ferrets foram utilizados. Após a anestesia com pentobarbital de sódio, um retalho gengival foi feito para ressecção das coroas dos dentes, bem como para o acesso e alargamento dos canais radiculares. Os canais foram limpos com limas tipo K número 50, irrigados e secos. Os canais do lado direito foram obturados com guta-percha e tubliseal, e os do lado esquerdo com ionômero de vidro.

Cinco animais foram sacrificados após 7 dias e mais 5 após 28 dias. A porção anterior da mandíbula foi extraída e fixada em formalina 4%. Os blocos descalcificados em citrato fórmico e processados histologicamente com inclusão em parafina, cortes de 5 micrômetros e coloração com HE e Brown e Brenn. A resposta foi graduada, dependendo do número de células - menos de 25 células inflamatórias - grau1 (nenhuma inflamação), de 25 a 124 - grau 2 (leve inflamação), 125 ou mais - grau3(moderada ou severa inflamação). A formação óssea foi graduada em 0 (ausente) e 1 (presente).

Após 7 dias, ambos os materiais provocaram uma resposta inflamatória, sendo que a resposta ao ionômero de vidro foi mais severa. Após 28 dias, uma leve inflamação à guta-percha ainda estava presente, mas nenhuma inflamação ao ionômero de vidro foi encontrada. O osso neoformado foi encontrado frente aos dois materiais, porém mais completamente formado quando se implantou

ionômero de vidro, onde se observou inclusive um crescimento ósseo sobre o cimento. Uma camada de tecido fibroso separou a guta-percha do osso.

ORSTAVIK; MIJÖR, em 1988, avaliaram a resposta do tecido subcutâneo de ratos aos materiais endodônticos, bem como a metodologia convencional para estes materiais, correlacionando a resposta do tecido aos elementos liberados pelos implantes através da microanálise em raio X. Os materiais testados foram Endométhasone, Procosol, AH26, cloropercha, Biocalex, pasta Kri I, Kerr PCS, Forfenan, N2 normal e Dyaket

Quarenta e oito ratos foram anestesiados com 0,07 ml de mebumal 10% para posterior tricotomia e incisão. Então, bolsas foram criadas a partir desta incisão, através de divulsão do tecido, para que a implantação dos tubos de polietileno com os materiais a serem testados pudesse ser realizada.

Os ratos foram sacrificados após 14 e 90 dias pela exposição ao gás carbônico. A pele foi novamente tricotomizada e uma área de tecido no tamanho de 20x20mm contendo o implante foi excisada e fixada em formalina 10% por 48 horas. O processamento histológico se deu com inclusão em parafina, cortes de 5 a 7 micrômetros e coloração com HE. A reação foi graduada em nenhuma, severa e extrema inflamação. As reações do tecido diferenciaram marcadamente em intensidade, extensão e características celulares. Para os materiais resinosos foi notada uma reação de baixa intensidade, já os materiais á base de óxido de zinco e eugenol desenvolveram uma reação mais intensa e os materiais á base de clorofôrmio e do tipo pasta-pasta proiciaram uma reação mais favorável.

A análise aos raios X revelou componentes dos materiais na cápsula conjuntiva para a maioria dos materiais investigados. Os cimentos AH26 e Hydron (à base de resina) foram rodeados por macrófagos que fagocitavam os componentes de metais pesados. Os materiais à base de óxido de zinco e eugenol, bem como aqueles à base de clorofórmio, dispersaram partículas de tamanho muito grande para a fagocitose mononuclear.

Concluíram que a metodologia foi bem sucedida para a avaliação dos implantes de materiais endodônticos e que os cimentos à base de resina foram altamente irritantes em 14 dias, mas levemente em 90 dias. Já os implantes à base de óxido de zinco e eugenol foram pouco irritantes inicialmente, mas persistiram por um período maior. Os elementos derivados dos implantes podem ser detectados e identificados em conjunção com as reações inflamatórias aos implantes.

BLACKMAN; GROSS; SELTZER, em 1989, avaliaram a resposta inflamatória e o potencial de reparo do osso e do tecido conjuntivo de ratos, quando implantados com cimento de ionômero de vidro, comparado ao cimento de óxido de zinco e eugenol.

Trinta ratos foram anestesiados pela inalação com éter, a tíbia da perna exposta por dissecação e um orifício realizado, corpos de prova de Ketac-Endo ou IRM foram implantados. Durante todo o procedimento irrigou-se copiosamente com solução salina. Implantes subcutâneos de amostras de cada material também foram feitos.

Oito animais foram sacrificados em 14 dias, outros oito em 30 dias e 12 após 80 dias usando-se doses de mebutal e perfusão cardíaca de solução de formalina. Os ossos e o tecido mole foram removidos e o tecido duro descalcificado para posterior processamento histológico com inclusão em parafina, cortes de 6 micrômetros e coloração com HE.

A reação inflamatória foi graduada dependendo do número de células inflamatórias : grau 1 até 24 células; grau 2 de 25 a 124 células; grau 3 mais de 125 células inflamatórias. A atividade osteoclástica, a presença de tecido de granulação e reação de corpo estranho com material fagocitado também foram observados e tabulados.

A resposta para cada material inicialmente e após 30 dias foi leve. Nenhuma resposta severa foi notada em nenhum dos grupos. Em 80 dias, embora uma reação leve tenha persistido, os materiais pareceram ser bem tolerados. Aposição de tecido ósseo ocorreu no grupo do ionômero de vidro com prata. Já no grupo do óxido de zinco e eugenol, fibrose foi identificada.

Concluíram que ambos os materiais podem ser utilizados em retrobturação devido à relativa biocompatibilidade e que as propriedades do Ketac-Silver, incluindo adesividade ao dente e radiopacidade são favoráveis.

SAFAVI et al, em 1989, desenvolveram um método para avaliar continuamente os efeitos biológicos das amostras dos materiais. Três cimentos com diversas características físicas e químicas utilizando uma nova câmara de cultura de células foram utilizados.

As amostras foram avaliadas imediatamente após a manipulação e após um período de tempo mais extenso.

Concluíram que um "ranking" pode ser feito a partir deste meio de cultura.

PASCON et al, em 1991, desenvolveram métodos e critérios para testar a biocompatibilidade de materiais endodônticos.

Cento e vinte e um dentes de bugios foram usados para testar três materiais: AH26, Pulp Canal Sealer e cloropercha. Sob condições de assepsia, acesso e preparação dos canais foram feitos com extensão aproximada de 1,0mm aquém do forame apical, para serem obturados com guta-percha e cimento pela técnica da condensação lateral.

A reação apical foi avaliada em 1, 7, 30, 365, 730 e 1095 dias. Levando-se em conta: 1- a transição entre os componentes remanescentes no canal radicular, debris, parede, e tecido periapical adjacente; 2- presença de atresamento e curvaturas do canal; 3- presença de aposição ou reabsorção nas paredes; 4- presença e localização de bactérias; 5- ocorrência de inflamação aguda ou crônica; 6- presença de partículas em macrófagos; 7- degeneração de células inflamatórias; 8- alterações vasculares.

Os métodos e critérios usados foram adequados para estabelecer um "ranking" de biocompatibilidade dos materiais testados em pequenos e longos intervalos de tempo. Uma observação a curto prazo (1 a 7 dias) do AH26 mostrou severa reação, já o Pulp Canal Sealer e cloropercha causaram uma moderada e leve reação, respectivamente. No período de 2 a 3 anos o "ranking"

foi: AH26 e Pulp Canal Sealer com moderada reação; cloropercha com severa reação.

Concluíram que uma direta correlação dos resultados deste estudo com outros não pode ser estabelecida e que não é possível um "ranking" dos materiais, em médias.

MOLLOY et al, em 1992, avaliaram a resposta do tecido conjuntivo de ratos aos cimentos resinosos. Os materiais testados foram uma resina experimental, resina experimental com prata, comparados com os controles Sealapex, Kerr sealer, AH26, cimento Roth.

Dez ratos foram anestesiados com éter e a área do implante tricotomizada. Após a desinfecção com povidine, incisões de 10 mm foram realizadas, 2 nas escápulas, 2 no quadril, e 2 no abdômen, para que bolsas fossem confeccionadas e tubos de polietileno preenchidos com os materiais fossem implantados. Sendo que os materiais tiveram 24 horas para tomarem presa antes da implantação.

Dois ratos foram sacrificados a cada período de tempo 3, 10, 20, 30, e 60 dias, quando os blocos do tecido foram removidos contendo o tubo e fixados em formalina para processamento histológico com inclusão em parafina, cortes de 6 micrômetros e coloração HE.

Em cada período de tempo praticamente não houve diferenças na reação dos cimentos; em 60 dias houve uma cura com pouca inflamação, o que indica uma boa biocompatibilidade.

ECONOMIADES et al, em 1995, estudaram a biocompatibilidade de 4 cimentos obturadores, 2 à base de hidróxido de cálcio (CRCS e Sealapex), 1 à base de óxido de zinco e eugenol (Roth 811) e 1 à base de resina epóxica (AH26). Estudaram também a influência dos componentes dos materiais na concentração de cálcio e zinco dos órgãos do rato.

Setenta e sete ratos foram anestesiados com pentobarbital de sódio (0,026g/Kg de peso do animal). Após a tricotomia e desinfecção com 5% de iodo em etanol, foram feitas incisões no dorso do animal e 2 bolsas preparadas com 15mm de profundidade. Tubos de teflon com 5mm de comprimento e 1,6mm de diâmetro interno contendo os materiais em teste foram implantados no interior das bolsas já preparadas, tomando o cuidado para evitar que o material se espalhasse pelo tecido. Tubos vazios foram utilizados como controle e as incisões foram suturadas com fio cirúrgico.

Os períodos de observação foram de 7, 14 e 21 dias, quando os animais foram sacrificados pela inalação de éter, os tubos removidos juntamente com o tecido adjacente e fixados em formalina 10% para posterior processamento histológico com inclusão em parafina. Os cortes seriados foram de 6 micrômetros de espessura e a coloração foi HE e Brown e Brenn. A reação foi graduada em leve, moderada e severa.

Para a análise e determinação do cálcio e zinco, 25 animais foram sacrificados em 1 semana após a implantação o fígado, cérebro, rins e útero foram removidos e congelados a -18°C até a análise.

Aos 7 dias, o material mais irritante foi o AH26, contudo esta reação diminuiu com o tempo. O Roth 811 e o Sealapex causaram de moderada a

severa reação, enquanto o CRCS causou de leve a moderada. O CRCS e o Roth 811 induziram distribuição de zinco para o tecido e o AH26 induziu mudanças no conteúdo de cálcio nos órgãos.

MITTAL; CHANDRA; CHANDRA, em 1995, avaliaram a resposta do tecido de ratos a quatro cimentos endodônticos: óxido de zinco e eugenol, Tubliseal, Sealapex e Endoflas.

Quinze ratos foram anestesiados e cinco círculos foram feitos no dorso de cada animal. As áreas foram tricotomizadas e limpas com água e sabão e então álcool absoluto, para a injeção de 0,1mL de cada cimento com agulha G-18.

Dois animais foram sacrificados a cada intervalo de tempo, que foram de 48 horas 7 dias, 14 dias 1 mês e 3 meses por super dose de éter. Então os blocos de tecido foram removidos e fixados em formalina 10%, para processamento histológico padrão. , com inclusão em parafina.

A reação inflamatória foi graduada dependendo do número de células inflamatórias. Grau 0 - nenhuma célula; grau 1 - até 24 células, grau 2 - 25 a 125, grau 3 - acima de 125. A predominância de células, localização e difusão da inflamação, presença de necrose, edema, densidade de fibroblastos e formação de cápsula fibrosa também foram tabulados.

O exame do tecido revelou que todos os cimentos mostraram alguma inflamação que decresceu com o tempo, exceto o óxido de zinco e eugenol que aumentou a inflamação de 48 horas para 7 dias e depois decresceu. O Sealapex mostrou a menor reação inflamatória, moderada em 48 horas e leve nos demais

períodos. Nenhuma resposta foi vista em 3 meses em relação a nenhum cimento.

KOLOKURIS et al, em 1996, estudaram comparativamente a biocompatibilidade entre o Ketac-Endo e o Tubliseal.

Para tanto, 44 ratos foram anestesiados com pentobarbitol de sódio (0,026g/Kg de peso do animal). Após a tricotomia e desinfecção com 5% de iodo em etanol, foram feitas incisões no dorso do animal e 2 bolsas preparadas com 15mm de profundidade. Tubos de teflon com 5mm de comprimento e 1,6mm de diâmetro interno contendo os materiais recém manipulados foram implantados no interior das bolsas já preparadas, tomando o cuidado para evitar que o material se espalhasse pelo tecido. Tubos vazios foram utilizados como controle e as incisões foram suturadas com fio cirúrgico.

Ao final de 5, 15, 60, e 120 dias 5 animais foram sacrificados, os tubos removidos juntamente com o tecido adjacente e fixados em formalina 10% para posterior processamento histológico com inclusão em parafina. Os cortes seriados foram de 6 micrômetros de espessura e a coloração foi HE e Brown e Brenn. A reação foi graduada em leve, moderada e severa.

Uma reação leve foi observada com o Ketac-Endo em 5 dias, sendo que o tecido adjacente apresentava plasmócitos, linfócitos e macrófagos. A intensidade da reação diminuiu em 15 dias e continuou progressivamente diminuindo em 60 e 120 dias. Já ao Tubuliseal o tecido apresentou severa inflamação com diferentes extensões de necrose em 5 e 15 dias, apresentando-se irritante em 60 e 120 dias.

Concluíram que o Ketac-Endo é um material compatível e bem tolerado pelo tecido.

COSTA et al, em 1997, estudaram comparativamente a biocompatibilidade das resinas TPH e Herculite XR, quando implantadas através de tubos de polietileno no tecido subcutâneo dorsal de ratos.

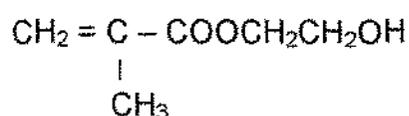
Vinte ratos foram anestesiados com hidrato de cloral a 10%, 14mL/100g de peso corpóreo do rato, intraperitonealmente. Após a tricotomia a região dorsal do rato recebeu 1 incisão na linha média e duas bolsas foram criadas por divulsão com 25mm de profundidade cada uma. Logo após as resinas foram introduzidas no interior de tubos de polietileno, o qual teve uma das extremidades fechada a quente. Então, os tubos foram implantados nas bolsas já preparadas de forma a ficarem paralelos à incisão.

Após 7, 15, 30 e 60 dias, 5 animais para cada intervalo de tempo foram sacrificados por inalação de éter sulfúrico e novamente tricotomizados para que a área dos implantes fosse removida e fixada em formalina 10% para posterior processamento histológico com inclusão em parafina. Os cortes seriados foram de 6 micrômetros de espessura e a coloração foi HE e Brown e Brenn. Procurou-se identificar áreas de necrose, neutrófilos células inflamatórias mononucleares, células gigantes, fibroblastos e formação de cápsula junto a abertura tubular.

Concluíram que os materiais precisam ter avanços nas propriedades biológicas, as quais ainda estão a desejar.

GLICOL METACRILATO

ROSENBERG; BARTL; LESKO, em 1960, descreveram um procedimento de inclusão de tecido biológico em glicol metacrilato, o qual é um monômero completamente miscível em água., cuja fórmula é :



Os procedimentos de inclusão são os seguintes:

- 1- desidratação em concentração crescente de monômero de 20% a 97%, sendo que as peças foram deixadas por 1 hora em cada solução e em condição refrigerada, contudo, na última, foram deixadas por uma noite toda.
- 2- Polimerização em solução aquosa diluída de monômero (3-20% v/v), saturado de 1 a 12 horas em solução de GMA mais concentrada (cerca de 40% v/v), e novamente polimerizada. O mesmo procedimento é repetido com as soluções de 60% e 80%, e finalmente transferido para solução de 95-97%(v/v), após a polimerização final está pronto para o seccionamento.

A fixação anterior ao processo de inclusão pode ser feito por qualquer fixador. A coloração pode ser feita por vários corantes (KmnO_4 , Uo_2Ac , OsO_4) e por três procedimentos diferentes:

- a) coloração comum após a fixação

- b) coloração durante a transferência na série de concentração gradual ou durante a polimerização após a solução de 80-95% (v/v) de GMA.
- c) Coloração na grade de espécimes. Este procedimento é possível pela característica hidrofílica do GMA. Sendo que os resultados obtidos por este procedimento são superiores em qualidade aqueles obtidos com os dois primeiros procedimentos. O primeiro passo é a colocação das espécimens por vários segundos em solução diluída de permanganato de potássio. Após a lavagem em água, foram expostos por 30 minutos a vapor de OSO_4 , e finalmente colocados em solução de 1% de UO_2Ac . Desta forma os cortes exibem o máximo de contraste e refinamento das estruturas.

O corte ultrafino das estruturas foi realizado com um ultramicrotomo construído por Rosenberg, utilizando lâmina de vidro. As secções foram coletadas em uma solução 0,5M de BaCl_2 , assim se reduz a tumefação das secções ao mínimo. As secções se espalharam bem na solução o que evitou a formação de dobras quando observadas em microscópio eletrônico.

FLAX; CAULFIELD, em 1962, descreveram uma técnica de utilização do metacrilato para microscopia óptica. Para o estudo foram utilizados rim, pele, linfonodo, e tecido de tireóide, fixados com formalina 10% e tetróxido de ósmio. As peças foram, então desidratadas em bateria de álcool em concentrações crescentes de 25% a 95%), transferidas para uma mistura 1:1 de álcool e monômero, em seguida banhadas em monômero de n-butil metacrilato,

infiltradas em monômero com catalisador e incluída em cápsulas de gelatina para polimerização. As peças foram seccionada na espessura de 0,5 a 2 micrômetros de espessura, coradas pelo método de Giemsa e as secções contendo timidina ou I^{131} autorradiografadas com filme Kodak AR10.

Puderam observar que o metacrilato aumenta a possibilidade de visualização da morfologia detalhada com pequena distorção das estruturas, devido principalmente à fina espessura dos cortes e à pequena taxa de distorção.

ASHLEY; FEDER, em 1966, reportaram os conceitos do uso do glicol metacrilato em histologia. Para o experimento foi utilizado tecido de fígado que após serem fixados e estocados em formol tamponado de Lillie por período acima de oito meses, foi incluído em parafina, glicol metacrilato e Epon.

Para a inclusão em parafina os blocos, os quais mediam 15X15X2 mm, foram processados usando-se dioxane para desidratação e secções de 6 micrômetros foram feitas e coradas com hematoxilina e eosina. Para a inclusão em glicol metacrilato os blocos, os quais mediam 2 X 2 X 2 mm, foram desidratado em álcool metílico com intervalo de 30 minutos entre as quatro trocas sucessivas, banhados pela solução do monômero plástico renovando-se uma vez a solução após 1 hora, incluídos em solução de inclusão para posteriormente serem cortados em secções de 1 a 2 micrômetros. Para a Epon os tecidos, os quais mediam 2 X 2 X 2 mm, foram desidratados em álcool etílico e incluídos em mistura de Epon 50:50 pela técnica usual. Secções foram

realizadas de 0,25 á 1,0 micrômetros de espessura com lâmina diamantada e coradas com azure II e azul de metileno.

Concluíram que o procedimento não foi mais difícil que o da parafina e que as secções feitas nos blocos incluídos em glicol metacrilato preservaram melhor o tecido e as estruturas celulares.

LEDUC; BERNHARD, em 1967, apresentaram os procedimentos de rotina para inclusão de tecido em glicol metacrilato. A mistura final para a inclusão consiste de 97% de GMA para 3% de água mais 3 partes de butil metacrilato não desestabilizado adicionado de 2% Luperco. Para aumentar a velocidade de polimerização e reduzir a formação de artefatos, os tecidos são impregnados com uma mistura de solução de inclusão que já tinha sido parcialmente polimerizada (prépolímero). Os passos para preparação do tecido foram:

- 1- Fixação em glutaraldeído de 15 minutos a 1 hora
- 2- Lavagem opcional em solução tamponada de 1 hora a noite toda
- 3- Desidratação por 20 minutos em cada solução de 80% e 97% de monômero de GMA e então, 20 minutos em mistura de prépolímero não polimerizado.
- 4- Impregnação em pré-polímero por uma noite.
- 5- Para inclusão, preencheu-se a cápsula de gelatina com pré-polímero fresco, deixou-se a cápsula aberta por 30 minutos para eliminar bolhas de ar e tampou-se a cápsula tentando deixar o mínimo de ar em seu interior

6- As cápsulas devem deixar passar a luz ultravioleta ($>3150 \text{ \AA}$) para permitir a polimerização do glicol metacrilato. A polimerização foi concluída em 1 dia de exposição, mas pode levar até 3 dias.

7- O seccionamento foi realizado com lâmina de vidro ou diamante

8- As secções foram coradas com solução aquosa saturada de urânio acetato por 30 minutos seguido por citrato por 1 minuto.

Todos os procedimentos de fixação, desidratação, inclusão, e final polimerização foram realizados em temperatura de 3°C , ou as soluções foram deixadas em refrigerador e então feitas as trocas.

Como resultados foram obtidas secções amplas, as quais puderam ser facilmente coradas pelos métodos de rotina, a preservação da ultraestrutura foi boa, pois as membranas aparecem em imagem negativa, as estruturas contendo ácido nucleico aparecem muito densas e estruturas com proteínas aparecem em diversas densidades. Ocorreram certos artefatos e em certos tecidos como o de fígado as células foram deslocadas e os núcleos tornaram-se distorcidos. Não somente os tecidos, mas também culturas de células e bactérias foram bem preservadas.

FEDER; O'BRIEN, em 1968, propuseram um novo método para histologia óptica de plantas, tal método não é somente mais simples que muitos outros métodos tradicionais, mas também aumentam significativamente a preservação das estruturas celulares. Os procedimentos para preparação das peças foram os seguintes:

1- Fixação em glutaraldeído 3% por 12 a 24 horas.

- 2- Desidratação com metoxietanol e transferências sucessivas para etanol, n-propanol e n-butano todos a 0°C por 1 dia, ou somente em etanol com resultados mais pobres.
- 3- Infiltração com mistura de monômero.
- 4- Colocação das espécimens em cápsula de gelatina preenchidas com mistura de monômero. Aquecimento a 40°C por 1 a 2 dias e então, a 60°C por 1 dia. A mistura de monômero foi polimerizada em estufa para dar dureza ao bloco.
- 5- Montagem e seccionamento dos blocos. Montagem das secções na lâmina.
- 6- Coloração e aplicação da lamínula.

Observou-se uma boa preservação das estruturas celulares do tecido. Notou-se a ausência de artefatos, tais como plasmólise, distorções e colapso de paredes celulares. A maioria das organelas e inclusões citoplasmáticas foram preservadas, com exceção de algumas células de troca. O plástico também não adere bem a paredes celulares espessamento cutinizadas, o que provoca uma separação do plástico durante o corte.

ZAMBERNARD et al, em 1969, descreveram uma modificação da técnica de inclusão utilizando metacrilato. Os procedimentos para preparação das espécimens foram:

- 1- Fixação com fixadores usuais como Bouin, paraformaldeído, formalina 10%, glutaraldeído e outros. O tempo de fixação variou de acordo com a espessura da peça. A maioria das peças examinadas foram fixadas

em formol de Zenker por 1 a 3 horas. Os fixadores foram removidos em água corrente e fria por 15 a 45 minutos

- 2- Desidratação e Inclusão: os tecidos foram desidratados em bateria de álcool etílico de 75% até álcool absoluto, passando por uma concentração de 95%, por pelo menos 20 a 40 minutos de pendendo da espessura do bloco. A desidratação final foi feita com acetona anidra. A infiltração do plástico foi iniciada pela colocação das peças desidratadas em monômero por 20 minutos, renovada a solução, permaneceram mais 20 minutos e então colocada em solução de iguais partes de monômero e solução de infiltração por 60 minutos e por fim em solução de infiltração por no máximo 48 horas, a partir da qual haverá polimerização à temperatura ambiente.
- 3- Para a polimerização utilizou-se um molde de aproximadamente 2 cm de profundidade, contendo uma camada de 1 a 3mm de solução de infiltração previamente polimerizada. O molde foi preenchido completamente com a solução infiltração. Para a polimerização se processou com a utilização de luz ultravioleta por 4 horas e com complementação de mais 4 horas à temperatura de 56°C.
- 4- Seccionamento: os blocos foram colocados diretamente no micrótomo e seccionados. As secções foram colocadas em uma lâmina contendo uma gota de 95% de etanol e postas para secar em uma plataforma aquecida a 45°C. As secções secas foram inundadas com óleo de cravo para clarear. O óleo foi removido com três trocas de álcool etílico 95%.

Concluíram que os blocos puderam ser cortados com lâminas de aço na espessura de 2 a 4 μm e peças maiores com 4 a 6 μm . As secções podem ser coradas com os corantes de rotina desde que o plástico seja removido por xilol durante o procedimento de coloração.

HOSHINO; KOBAYASHI, em 1971, encontraram que glutaraldeído (fixador) e glicol metacrilato (material de inclusão) podem ser usados em microscopia óptica para demonstração da atividade da fosfatase ácida sem a remoção do material de inclusão.

Para tanto, tecido de fígado e rim de camundongos foram fixados em cacodilato tamponado e glutaraldeído a 2% complementado com 3% de paraformaldeído a 4°C por 30 a 60 minutos. Os tecidos foram lavados em água por uma noite, para então serem desidratados e incluídos em GMA, a uma temperatura de 4°C. A polimerização final foi efetuada com a utilização de luz ultravioleta. Secções de 0,5-1,5 μm de espessura foram realizadas e montadas em lâminas. As secções foram secas e encubadas a 37°C em glicerofosfato por um período de 30 minutos a 6 horas. O método de coloração utilizou fosfato de naphтол-AS-MX por 30 minutos a 8 horas. Depois de lavadas, as secções foram montadas com glicerina.

Concluíram que a localização da atividade enzimática foi idêntica àquela reportada anteriormente com secções congeladas de material incluído em parafina. Além disso, as secções com glicol metacrilato deram maior precisão na localização da atividade enzimática, em ambos os níveis citológico e histológico, quando comparada com secções em parafina e congeladas. Bem como, a

remoção do plástico é dispensada para que se possa proceder a coloração, minimizando, assim, os danos aos tecidos. A polimerização do glicol metacrilato pode ser feita em baixas temperaturas e desta forma preserva a atividade enzimática.

ASHFORD; ALLAWAY; McCULLY, em 1972, reportaram modificações nos métodos prévios de inclusão em glicol metacrilato, de forma a controlar a temperatura e aumentar a resolução da atividade enzimática e propiciar uma boa preservação estrutural. Para tanto, as peças foram fixadas por 3 a 12 horas em glutaraldeído 3%, desidratadas em bateria crescente de mistura de monômero de glicol metacrilato á baixa temperatura passando por 5, 10, 20, 0, 60 e 80% de solução aquosa de mistura de monômero de glicol metacrilato a 0°C; e 90 e 95% a -25°C, sendo que três horas foram necessárias para cada passo, com exceção da solução de 60% que levou uma noite. Os espécimes foram infiltradas em mistura de monômero de 100% a -25°C. A polimerização foi realizada com auxílio de lâmpada fluorescente e em seguida, foram colocadas em pratos de alumínio num banho de solução aquosa de etileno glicol a 56% e refrigerados com Freon 502 conectado a unidade de refrigeração. A polimerização foi completada dentro de 36 horas e os blocos armazenados a -25°C até o seccionamento, quando as secções foram montadas em lâmina para a coloração.

Concluíram que o valor da técnica está na precisa localização da atividade enzimática pela resolução da microscopia de luz, a localização

enzimática é comparável àquela obtida com o congelamento mas com excelente preservação estrutural.

COLE ; SYKES, em 1974, descreveram os procedimentos de rotina para o uso do glicol metacrilato como material para inclusão de tecido para exame em microscópio de luz. Foram utilizadas peças medindo 1 x 3 x 3 mm de rato, coelho, sapo e larva. Várias soluções de fixação foram utilizadas, o glicol metacrilato foi preparado de forma modificada (100,00 ml glicol metacrilato, 5,00 ml polietileno glicol 400, e 0,15 ml benzoil peróxido) para que pudesse ser cortado com lâmina de aço inoxidável. Esta mistura foi pré-polimerizada e a cada 100,00mL desta solução foi acrescentado 5,00mL de polietileno glicol 400; a solução final foi, então, homogeneizada e armazenada a – 20°C até o uso.

As peças fixadas em fixadores aquosos foram infiltradas por 30 minutos em glicol metacrilato aquoso 80%, em seguida em glicol metacrilato aquoso 97% por 30 minutos, e por fim em glicol metacrilato 100% por 12 horas ou mais. Já as peças fixadas em fixadores não aquosos foram lavados em álcool absoluto, em seguida passados por banhos de 30 minutos em solução etanólica de glicol metacrilato a 20, 40, 60, e 80 % e finalmente imersos em 3 banhos de glicol metacrilato 100%, sendo que os primeiros 2 banhos foram de 30 minutos e o último de 12 horas. As peças foram então incluídas com auxílio de uma cápsula gelatinosa e aparelho de luz ultravioleta, sendo que o sistema teve que ser mantido á –20°C para compensar o calor das lâmpadas e manter o glicol metacrilato entre 0 e 4°C. O tempo de polimerização foi de 12 a 24 horas.

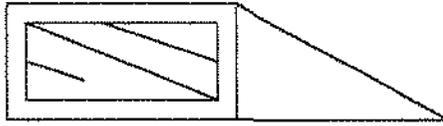
Secções foram realizadas entre 0,5 a 3,0 micrômetros espessura e corados com azure B, fuccina ácida ou azul de metileno ácido.

Os resultados revelaram que os fixadores convencionais para parafina também podem ser utilizados para o glicol metacrilato; o glicol metacrilato é miscível em água e esta não precisa ser totalmente removida do tecido para a infiltração, não necessita de desidratação e nem de clareadores, portanto minimiza os artefatos e economiza tempo; como a infiltração e inclusão se dão entre 0 e 4°C, ocorre uma maior preservação de estruturas tremoláveis quando se compara aos processos de infiltração e inclusão em parafina.

SIMS, em 1974, descreveu um método modificado para cortes histológicos de 1 a 2 μm de blocos de tecido maiores de 3 x 2 cm incluídos em glicol metacrilato. Os procedimentos para tal método foram os seguintes:

- 1- Desidratação do tecido usando bateria de álcool
- 2- Infiltração do tecido em solução de infiltração com várias trocas, sendo que o tecido torna-se totalmente transparente quando totalmente infiltrado (de 4 a 48 horas dependendo do tamanho da peça)
- 3- Para inclusão foi necessário um molde de alumínio contendo a solução de inclusão. Para dispersar o calor produzido o molde foi parcialmente imerso em água fria. A polimerização normalmente ocorreu dentro de 30-45 minutos, quando o tecido tornou-se transparente, sendo que áreas opacas indicaram uma incompleta infiltração

4- O formato do molde de alumínio proposto deve ser o seguinte:



- 5- Para o corte uma parte não usada da lâmina é selecionada e a secção é transferida para um recipiente contendo água fria utilizando para tanto, a ponta triangular da secção. As secções foram apanhadas com uma lâmina e secas em um bico de Bunsen
- 6- Para a coloração foram utilizados os métodos comuns com pequenas modificações.

BENNET et al., em 1976, descreveram modificações no método de utilização do glicol metacrilato para torná-lo mais simples e rápido. Propuseram como vantagens da utilização do glicol metacrilato :

- 1- baixa distorção, mas não totalmente ausente ao nível de microscopia óptica (distorção da mielina dos nervos; hemólise parcial das hemoglobinas na periferia dos blocos)
- 2- mais informações após a coloração
- 3- não reage quimicamente (ligações covalentes) com os grupos importantes para a coloração
- 4- refinamento na visualização detalhes histológicos
- 5- distinção clara de tecido muscular e conjuntivo
- 6- permite aplicação de métodos de localização imunohistoquímica
- 7- clareza e consistência não visualizada com parafina
- 8- secções podem ser feitas com até 0,2 μm .

O princípio de inclusão do glicol metacrilato é a infiltração de moléculas de monômero de etileno glicol monoéster do ácido metacrilato no tecido as quais se ligam formando uma trama tridimensional. Os procedimentos sugeridos foram:

- 1- fixação: glutaraldeído a 3% com paraformaldeído 4% em várias proporções, bem como outros fixadores são administrados tanto na forma de perfusão como na de imersão, com preferência desta última. Este processo foi realizado à temperatura ambiente.
- 2- Desidratação: feita em concentração gradual de álcool etílico à temperatura ambiente e em seguida para o álcool misturado ao monômero sem passar pelo clareador. O glicol metacrilato por ser miscível em água pode ser utilizado como agente de desidratação no lugar do etanol, exceto em tecidos com muitas células de gordura, pois o monômero não as dissolveu e não infiltrou adequadamente.
- 3- Infiltração: o tecido desidratado foi colocado em solução de infiltração fazendo 2 a 3 trocas de 30 minutos a 1 hora cada, o tempo pode aumentar para peças maiores
- 4- Inclusão: o tecido é colocado em um molde de tamanho proporcional, coberto com isolador de oxigênio e colocado em estufa à temperatura de 38° a 40°C por 15 a 96 horas, ou deixado em temperatura ambiente por vários dias. É necessário controlar a polimerização para que não ocorram bolhas de gás que são responsáveis por distorções (defeitos esféricos de 1µm de diâmetro no centro do bloco). Para tanto, é necessária a utilização de blocos pequenos.

- 5- Seccionamento: utilizou-se lâminas de vidro secas para o corte de 0,25 a 10 μm . Os cortes foram colocados na superfície de água à temperatura ambiente e montadas em lâmina em poucos minutos
- 6- Coloração: os métodos de coloração habituais para parafina podem ser utilizados para o glicol metacrilato com pequenas ou nenhuma modificação

Como desvantagens deste método encontraram :

- a) distorção da mielina
- b) longo tempo para polimerização (12-48 horas)
- c) risco de perda ou dano de grandes blocos (maiores que 1 cm), devido à formação de bolhas

TURNER, em 1980, utilizou hematoxilina toluidina azul-floxinado para a coloração de cortes de 2 micrômetros de olhos de pinto incluídos em glicol metacrilato comparados aos cortes de 5 micrometros do mesmo tecido incluído em parafina.

Para o experimento foram utilizados olhos de pinto perfundidos com fixador de Bodian. Após removido o corpo vítreo, os segmentos foram deixados em álcool 70% por 12 a 24 horas e desidratado em álcool 95% por 4 horas com 2 trocas de solução. As peças foram infiltradas em solução de infiltração de glicol metacrilato trocando-se a solução três vezes com intervalo de 8 a 12 horas. As secções foram feitas com lâmina de vidro na espessura de 2 micrômetros e corados com hematoxilina toluidina azul-floxinado. Como resultado foi obtido que houve qualidade e clareza dos cortes de tecido incluídos em glicol metacrilto

superior àquelas encontradas com a utilização da parafina. Esta técnica revela com sucesso os componentes estruturais celulares quando observados em microscópio óptico.

VAN DE VELDE, em 1980, utilizou o glicol metacrilato como material de inclusão para estudo de imunofluorescência. Para tanto, os espécimes foram fixadas em formol neutro tamponado a 10%, lavadas com água destilada, desidratadas com duas trocas em dimetoxipropano acidificado por 15 a 30 minutos entre cada troca.

Utilizaram para o processamento o Kit JB4 (Polysciences Inc), para tanto, as peças foram infiltradas com solução A ativada em dois banhos de 45 minutos cada, incluídas em solução de inclusão (Solução A ativada mais a solução B), e os blocos selados com parafina para evitar o contato com o ar. A polimerização foi completada num tempo de 2 horas à temperatura ambiente.

Para a imunofluorescência foram feitos cortes de 2 μ m, utilizando-se de lâmina de vidro. As secções foram colocadas em banho de água à temperatura ambiente contendo uma gota de hidróxido de amônia e secas por 30 minutos para serem encubadas em protease tipo V e lavadas com PBS. Foram então incubadas em isotiocinato fluorescente por 1 hora a 37°C seguido por 1 hora em temperatura ambiente.

Concluíram que a utilização do glicol metacrilato traz vantagens em relação à parafina pois diminui a distorção do tecido, aumenta a resolução microscópica, não necessita de técnicas especiais de coloração e o tempo gasto

para confeccionar amostras para estudos especiais é menor que aquele gasto com a parafina.

MOOSAVI et al., em 1981, estudaram modificações na técnica de coloração de secções feitas de medula óssea incluída em glicol metacrilato, para que pudessem ser perfeitamente coradas em HE, esterase cloroacetato, PAS, azul Prussianico, e prata.

Para o experimento, uma agulha para biópsia de osso foi utilizada, o material foi fixado em fixador de Karnovsky por 4 horas, transferido para solução de fosfato tamponado, onde permaneceu por 1 hora. As espécimens foram desidratadas em concentração crescente de álcool de 40 a 95% em refrigerador e terminada a desidratação em solução de 1:1 de álcool 100% e glicol metacrilato catalisado por benzoil peróxido (JB-4) por 3 horas. Após este período as peças foram transferidas para o plástico puro e deixado por mais 5 horas em refrigerador. As espécimes foram incluídas utilizando-se um molde preenchido com o plástico mais o endurecedor e cobertos com um bloco de alumínio selado com cera ou parafina para evitar o contato com o oxigênio do ar. As peças foram cortadas na espessura de 2 μm e coradas.

Para a coloração em HE as secções foram expostas á hematoxilina por 1 hora e lavadas em água deionizada três vezes, as secções foram azuladas em 0,2% de amônia aquosa por 2 minutos e lavadas em água deionizada 5 vezes. Foram então expostas á eritrosina B por 10 minutos e lavadas com água deionizada 3 vezes. Logo após, as peças foram colocadas rapidamente em álcool 95% por 3 vezes e então em álcool 100% para serem colocados em xilol e montados.

Para a coloração por naftol AS-D-Cloroacetato Esterase, as secções foram mergulhadas nesta solução por 30 minutos, lavadas em água por 5 minutos para serem colocadas em hematoxilina acidificada de Harris por 5 minutos, lavada com água destilada e clareadas com xilol para então serem montadas.

Para coloração por reticulina, as secções foram colocadas em permanganato de potássio acidificado por 3 minutos, lavadas com água destilada, reduzidas com metabissulfito de potássio 2% por 1 minuto, lavadas por três minutos em água corrente e por 4 banhos de água destilada. As secções foram expostas á prata amoniacal por 2 minutos, banhadas 3 vezes com água destilada e reduzidas em solução de formaldeído 37% para serem lavadas em água corrente por 3 minutos e por 2 banhos de água destilada. Por fim, as secções foram imersas em ouro clorado 0,2% por 30 segundos lavadas com água destilada e fixadas em tiosulfato de sódio por 1 minuto.

Para a coloração por PAS, as secções foram colocadas em ácido periódico por 15 minutos, lavadas em água destilada para serem colocadas em solução de Lillie por 30 minutos, lavados em água corrente por 30 minutos e em 2 banhos de água destilada. Por fim, as secções foram colocadas em hematoxilina ácida por 10 minutos, lavadas e colocadas em álcool em concentrações crescentes e banhadas em xilol para serem montadas.

Para a coloração por ferro, as secções foram colocadas em solução de ácido ferracinado hidrocloreídrico por 25 minutos.

Obtiveram como resultados que 16% das células de medula óssea embebida em parafina não puderam ser identificadas, já a inclusão em glicol

metacrilato permitiu a identificação virtual de 100% das células. Houve um aumento nos detalhes citológicos permitindo o diagnóstico preciso de células tumorais nas peças incluídas em glicol metacrilato. Foi possível também avaliar a morfologia dos canais Haversianos, osteoclastos, osteoblastos, osso laminar, arteríolas, vênulas, que embora sejam similares á inclusão em parafina, com o glicol metacrilato as estruturas estavam bem mais preservadas. Uma grande vantagem do glicol metacrilato é a de não se necessitar da descalcificação das peças ao contrário da parafina.

KING; KAMMLADE; MURPHY, em 1982, desenvolveram uma técnica de re-inclusão de secções plásticas. Os procedimentos foram os seguintes:

- 1- limpar a superfície descoberta pela lamínula
- 2- selecionar a secção de interesse
- 3- preencher cápsulas com Epon ou equivalente. Inverter a cápsula sobre a seção selecionada
- 4- colocar as cápsulas com as lâminas em estufa a 60°C até que o plástico esteja firme, mas não completamente polimerizado (entre 12 e 24 horas).
- 5- Ajustar a estufa para 80-90°C até que se equilibre a temperatura entre a cápsula e lâmina e o forno. Com uma força lateral as cápsulas podem ser removidas da lâmina
- 6- Retornar as cápsulas contendo as secções re-incluídas à estufa para permitir a completa polimerização (60°C por 48 horas)

7- Remover os blocos da cápsula e resecioná-los para microscopia eletrônica.

YEUNG; LAW, em 1987, sugeriram uma modificação na técnica de inclusão utilizando LKB Historesin para permitir a formação de fita de secção. Para tanto, Polietileno Glicol (PEG) foi adicionado à Historesin. Inicialmente seccionou-se somente o bloco de resina sem tecido em seu interior, acrescentou-se neste estudo preliminar 0,05-0,40 ml a cada 5,0 ml de LKB. O bloco foi seccionado na espessura de 3,0-5,0 μm no micrótomo AO e a 2 μm no LKB Historange. Após a determinação da concentração correta de PEG para cada micrótomo, tecido vegetal foi incluído no bloco polimerizado. O tecido foi fixado em solução de glutaraldeído a 4%, desidratado em metil celulose seguido por duas trocas de álcool absoluto. As espécies foram então infiltradas com solução de inclusão LKB e colocadas em molde (6 x 13 mm) para a inclusão com solução de inclusão LKB com a quantidade correta de PEG. As secções foram colocadas em água, depois na lâmina e cobertas com adesivo, secas no calor e coradas usando ácido de Schiff e contrastado com azul de toluidina.

Concluíram que as ótimas concentrações de PEG para produzir a fita de seccionamento no LKB Historange e micrótomo AO foram respectivamente 0,20 e 0,25-0,35 ml para cada 5mL de solução, sem nenhum efeito adverso na qualidade de secção.

MURRAY; EWEN, em 1989, desenvolveram uma nova técnica para biópsias usando congelamento e subsequente inclusão á baixa temperatura em

glicol metacrilato. As peças foram obtidas no Departamento de Patologia da Universidade de Aberdeen. Os blocos foram dimensionados em 1,0 x 0,5 x 0,2 cm. Os espécimes foram rapidamente congelados em diclorofluormetano e então substituído por acetona á -30°C por 24-48 horas. Terminada a substituição as peças foram infiltradas por glicol metacrilato (JB-4) á 30°C negativos contendo 0,9% de peróxido de benzoila. Para inclusão, as peças foram imersas em solução de glicol metacrilato quimicamente polimerizado com a adição de 0,05 ml de solução B por 1,25mL de monômero resinoso e cortadas com lâmina de vidro na espessura de 2,0 micrômetros. Os cortes foram corados pela HE, ácido periódico, azul de Alcian, e outros corantes e então feito o estudo imuno-histoquímico.

Puderam concluir que o método de congelamento e inclusão em glicol metacrilato mostrou excelente morfologia celular, com maior preservação dos tecidos quando comparado ao processo convencional, além disso as secções em plástico permitiram uma resolução detalhada da citologia celular. Os corantes convencionais foram utilizados para as secções plásticas e houve uma melhor preservação de estruturas como a micina, glicogênio e RNA que aquela obtida com a fixação com formol e inclusão em parafina.

SCHWARTZ et al, em 1989, descreveram uma modificação na técnica de coloração de Brown e Hopps, a qual permitiu uma decisiva diferenciação dos microorganismos Gram-positivos e negativos em tecido incluído em glicol metacrilato. Para tanto, tecidos infectados foram fixados com formaldeído tamponado a 4%, desidratados em álcool, infiltrados por 8 horas em glicol

metacrilato e polimerizados. Secções semi-finas foram feitas na espessura de 3 µm com lâmina de vidro. O procedimento de coloração foi o seguinte:

- 1- imersão em cristal violeta por 1 minuto
- 2- lavagem em água e secagem
- 3- imersão em solução de iodo de Gram por 1 minuto
- 4- lavagem em água e secagem
- 5- diferenciação em acetona
- 6- lavagem em água destilada com agitação e secagem
- 7- imersão em fuccina básica por 1 minuto
- 8- lavagem em água
- 9- diferenciação em solução de Gallego por 5 minutos
- 10- lavagem em água por 10 segundos e secagem
- 11- três mergulhos em acetona
- 12- três mergulhos em ácido pícrico
- 13- três mergulhos em acetona com leve agitação
- 14- 5 mergulhos em solução de igual parte de acetona e xilol
- 15- 10 mergulhos em xilol
- 16- 10 mergulhos em xilol e montagem

Concluíram que este método produz superior diferenciação na coloração de Gram para vários microorganismos, podendo ser mostrados detalhes dos microorganismos e acreditaram ser este método superior à parafina.

SHIMOTSUMA; SCHOEFL, em 1992, descreveram um método de inclusão de finas membranas em Historessin (Leica), o que permite uma orientação fácil para o seccionamento de grandes áreas paralelo á superfície.

Para o experimento foram utilizadas finas camadas de emento fixadas em formol tamponado. A área seleccionada para o exame foi processada em Historessin. Para o seccionamento paralelo á superfície. Uma área foi cortada com tesoura e colocada num molde de Teflon e o bloco foi montado para o seccionamento.

Para o seccionamento transversal, uma área foi cortada, dividida e orientada no sentido do corte, colocada num molde de silicone preenchido com Historessin e coberto com um pedaço de filme de silicone.

Os resultados mostraram que as secções feitas paralelas e transversais á superfície foram bem sucedidas. Esta técnica oferece como vantagens o corte de grandes áreas de interesse paralelo à superfície.

OGBORN; SAREEN, em 1995, determinaram uma ótima condição de coloração para detectar EGF em glândula submandibular de rato.

Blocos de tecido de 2mm foram fixados em paraformaldeído por 15 minutos, desidratados em etanol, incluídos em glicol metacrilato. A polimerização se deu dentro de 48 horas, quando foram seccionados na espessura de 1,5 μ m para que as secções fossem coradas para imunohistoquímica.

Concluíram que o uso do glicol metacrilato aumenta o número de secções disponíveis de pequenos blocos e aumenta o detalhe anatômico.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

ANIMAIS

Para o experimento foram utilizados 3 ratos "Wistar" (*Rattus norvegicus*), adultos, da mesma linhagem, pesando em média 250 gramas, provenientes do biotério da Universidade de Campinas-Unicamp, mantidos em gaiolas coletivas, recebendo água "ad-libitum" e alimentação constituída de ração balanceada.

CIMENTO

Foi utilizado o Endomethasone (Specialites Septdont-França) com a seguinte composição e proporção:

ENDOMETHASONE

óxido de zinco	471,0mg
dexametasona	0,1mg
acetato de hidrocorisona	10,0mg
di-iodotimol	250,0mg
paraformaldeído	22,0mg
óxido de chumbo	50,0mg
sulfato de bário	1,0g
estearato de magnésio	1,0g
subnitrato de bismuto	1,0g

TUBOS DE POLIETILENO

Foram utilizados tubos de polietileno com 1,5mm de diâmetro interno, 2,0mm de diâmetro externo e 10,0mm de comprimento, esterilizados em autoclave.

ANESTÉSICO

Para anestesia dos animais foi utilizado pentobarbital de sódio 65mg/ml com injeção intraperitoneal na dose de 5,1mg/100g de peso do animal.

MÉTODOS

Os animais foram anestesiados com pentobarbital de sódio 65mg/ml com injeção intraperitoneal na dose de 5,1mg/100g de peso do animal. Para a implantação dos tubos, foi feita antissepsia de toda região dorsal do animal com tintura de iodo a 2% antes e após a tricotomia, que foi realizada com tesoura e loção depilatória (One Touch – E.U.A.)

Os Tubos de polietileno, esterilizados em autoclave, tiveram uma das extremidades seladas a quente para serem, então, preenchidos com o cimento.

Para a preparação dos corpos de prova, o cimento foi manipulado na consistência espessa utilizando-se a proporção de uma colher de medida do material restaurador provisório IRM contendo Endométhasone para cada gota de líquido de eugenol (4), e introduzido no interior do tubo com auxílio de uma seringa Centrix (DFL Indústria e Comércio – Brasil).

Uma punção foi feita de cada lado da linha média do dorso do animal para que um instrumento rombo fosse inserido com o objetivo de divulsionar o tecido, separando o tecido cutâneo do conjuntivo, tomando-se o cuidado de não perfurar ou dilacerar os tecidos. Então, os corpos de prova foram levados para a intimidade da loja cirúrgica com auxílio de um trocar e o local das incisões suturados com fio seda 4.0 (Ethicon).

Após a implantação, os ratos foram colocados em gaiolas e mantidos no laboratório até a completa recuperação do efeito anestésico, e levados ao biotério até que se completasse o período de observação, que foi de 30 dias.

Decorrido o período pré-determinado, os animais foram sacrificados utilizando-se doses excessivas de pentobarbital de sódio com injeção intraperitoneal. Após antissepsia antes e após a tricotomia, os corpos de prova foram localizados por palpação e removidos em blocos contendo os tecidos epitelial, conjuntivo e muscular e fixados em solução de Bouin em temperatura ambiente por 24 horas, quando foram colocados em formol tamponado a 10% até o momento de serem processados para inclusão em parafina e glicol metacrilato.

Os tubos foram localizados no interior dos blocos e divididos com auxílio de lâmina de barbear em dois segmentos através de uma secção transversal, perpendicular ao longo eixo deste tubo tentando atingir a sua metade (Fig.1 e Fig.2). A metade do bloco que continha a extremidade selada do tubo foi desprezada. O outro segmento foi seccionado longitudinalmente, obtendo-se duas hemi-metades muito semelhantes, que permitiu uma exposição direta dos tecidos e do cimento do interior do tubo às soluções de processamento

histológico (Fig 3 e Fig.4). Cada hemi-metade foi processada de maneira diferente, perfazendo dois grupos, um deles incluído em parafina e outro em glicol metacrilato. Para o grupo da parafina o tubo de polietileno foi removido, e para o grupo do glicol metacrilato o mesmo não foi realizado.

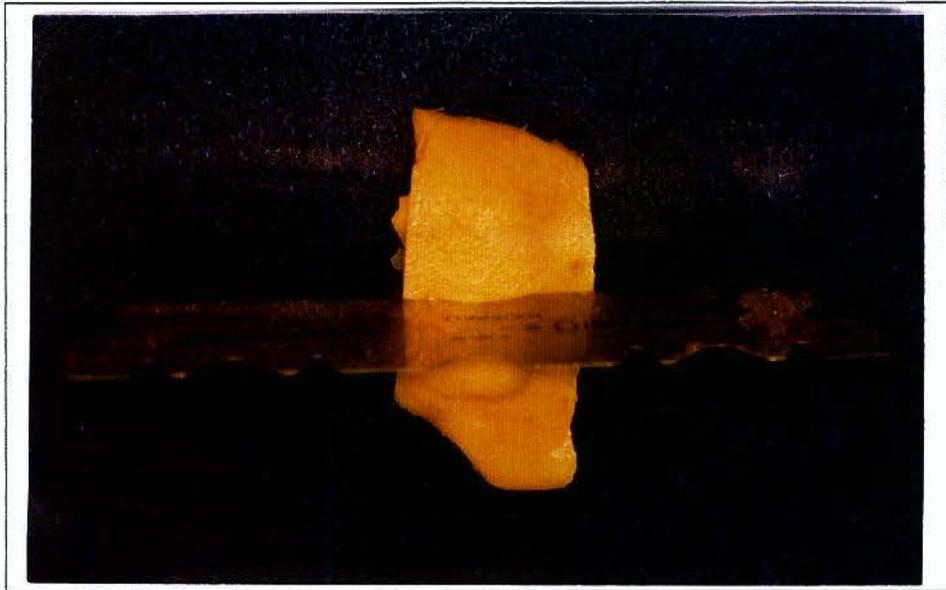


Fig.1- Corte transversal do bloco de tecido tentando atingir a metade do tubo.



Fig.2- Secção transversal do bloco de tecido atingindo a metade do tubo

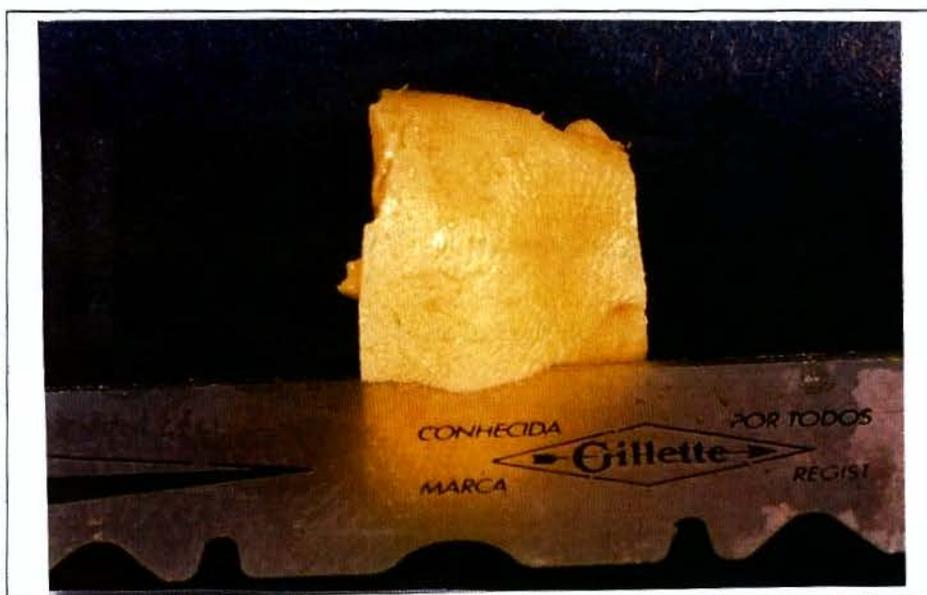


Fig.3- Corte longitudinal da metade desejada tentando atingir o longo eixo do tubo.



Fig.4- Secção longitudinal do tecido atingindo o longo eixo do tubo

INCLUSÃO EM PARAFINA

Os espécimes deste grupo foram lavados em água corrente pelo período de 5 horas para remoção da solução de fixação e desidratados em álcool em

concentrações crescentes: álcool 70% pelo período de uma noite, no dia seguinte, álcool 90% em 3 trocas de 30 minutos e álcool absoluto em 3 trocas de 30 minutos.

As peças foram clareadas em xilol em 3 trocas de 30 minutos e infiltradas por parafina à temperatura de 59°C por 4 banhos de 30 minutos cada e, em seguida, incluídas em parafina levando-se em consideração a orientação para que se pudesse seccioná-las no sentido longitudinal do tubo.

Cortes de 6µm feitos em micrótomo comum com lâmina de aço foram colocados em água a 45°C para posterior colagem com albumina-glicerizada de Meyer em uma lâmina. As secções foram coradas pela hematoxilina e eosina e pelo tricrômico de Mallory. A montagem das lamínulas foi feita com bálsamo do Canadá, e as lâminas mantidas em estufa à 37°C para completa secagem.

INCLUSÃO EM GLICOL METACRILATO

Os espécimes deste grupo foram lavados em água corrente pelo período de 5 horas para remoção da solução de fixação e desidratados em álcool em concentrações crescentes: álcool 70% pelo período de uma noite, no dia seguinte, álcool 90% em 3 trocas de 30 minutos e álcool 95% em 3 trocas de 30 minutos.

Para o método de inclusão em glicol metacrilato foi utilizado o Kit JB4 (Polysciences Inc), que é constituído de Solução A, Ativador e Solução B. As peças desidratadas foram então, colocadas na Solução A ativada (0,9 mg de

Ativador para cada 100mL de Solução A) e deixadas para infiltrar à temperatura ambiente por 72 horas, quando foram levadas para inclusão.

Para inclusão, moldes de plástico de 1,0mL de capacidade foram cobertos com uma camada de Teflon em "spray", o que impede a adesão do glicol metacrilato ao molde e controla o aquecimento durante a polimerização. Os moldes foram preenchidos pela solução de inclusão (0,04 mL da solução B para cada mL da Solução A ativada).

As peças foram colocadas no interior dos moldes já cobertos pelo Teflon para o preenchimento com a solução de inclusão. Cada molde foi coberto com resina autopolimerizável para evitar o contato do glicol metacrilato com o oxigênio do ar, pois este dificulta a reação normal da resina. Sob os moldes foi colocada uma barra de gelo para que a reação exotérmica pudesse ser controlada, desta forma, evitou-se a formação de bolhas no interior da resina.

Aguardou-se 2 horas para que a polimerização se completasse totalmente, quando os blocos de glicol metacrilato contendo os espécimes foram cortados com lâmina de tungstênio em micrótomo comum na espessura de 3 μ m, de forma longitudinal ao longo eixo do tubo.

Os cortes foram colocados diretamente sobre a lâmina contendo uma gota de água deionizada para que espalhassem sem necessidade de passar por água quente e sem necessidade de albumina para prendê-los à lâmina. As secções foram corados pelo métodos de Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Mallory com uma pequena modificação, ou seja, o tempo de permanência nas soluções foi aumentado.

Os cortes obtidos pelos dois métodos de inclusão foram analisados comparativamente em relação à qualidade de imagem, produção de artefatos, detalhe de estruturas celulares e execução do procedimento histológico.

RESULTADOS

A execução dos procedimentos histológicos para inclusão em glicol metacrilato e parafina foram muito similares. Contudo, algumas diferenças já descritas marcaram as peculiaridades de técnica de cada método. É necessário, contudo, ressaltar algumas diferenças básicas (Tabela 1).

Tabela 1. Diferenças básicas entre os procedimentos histológicos dos métodos de inclusão em Glicol Metacrilato e Parafina.

Procedimento	Glicol Metacrilato	Parafina
Desidratação	até álcool 95%	até álcool absoluto
Infiltração	temp. ambiente	a quente 56°C
Inclusão	temp. ambiente	a quente 56°C
Secção	3µm	6µm
Estiramento das secções	água fria	água quente
Remoção do material de inclusão	não necessária	Necessária
Coloração	demorada	Rápida
Processo de inclusão	Demorado	Demorado

As características inerentes às técnicas de inclusão e aos materiais de inclusão propriamente ditos culminaram com resultados finais de observação histológica diferentes, quando se levou em conta a qualidade das imagens, detalhe de estruturas celulares e produção de artefatos.

Como os cortes de tecido incluído em Glicol Metacrilato podem ser realizados em uma espessura inferior àquela utilizada na rotina do método em Parafina, podemos ter uma imagem mais nítida, com menos sobreposição de estruturas.

As secções de tecido subcutâneo de ratos incluídos em Glicol Metacrilato, cortados a $3\mu\text{m}$ e corados com H.E. e Tricrômico de Mallory mostraram uma preservação do tecido e das células superior àquela obtida com a parafina. Desta forma, virtualmente podemos identificar quase a totalidade das células, muito importante para uma análise quantitativa de um processo inflamatório.

O maior benefício da técnica de inclusão em metacrilato é o aumento da definição morfológica das células e tecidos em consequência da diminuição da distorção quando comparada com o método de inclusão em parafina, principalmente em aumentos microscópicos maiores.

Como ilustração das vantagens do método de inclusão do tecido subcutâneo de rato em glicol metacrilato, podemos visualizar a maior preservação tecidual quando da utilização dos procedimentos histológicos para este método de inclusão em glicol metacrilato. Percebe-se ainda, em primeira observação, melhor nitidez de imagem, propiciando uma identificação dos tecidos muscular e conjuntivo com mais facilidade com o método de inclusão em Glicol Metacrilato. Com mais atenção nota-se uma maior continuidade do tecido, com menos artefatos, ou seja, sem os espaços que dão uma solução de continuidade do tecido (Fig.5 e Fig.6).

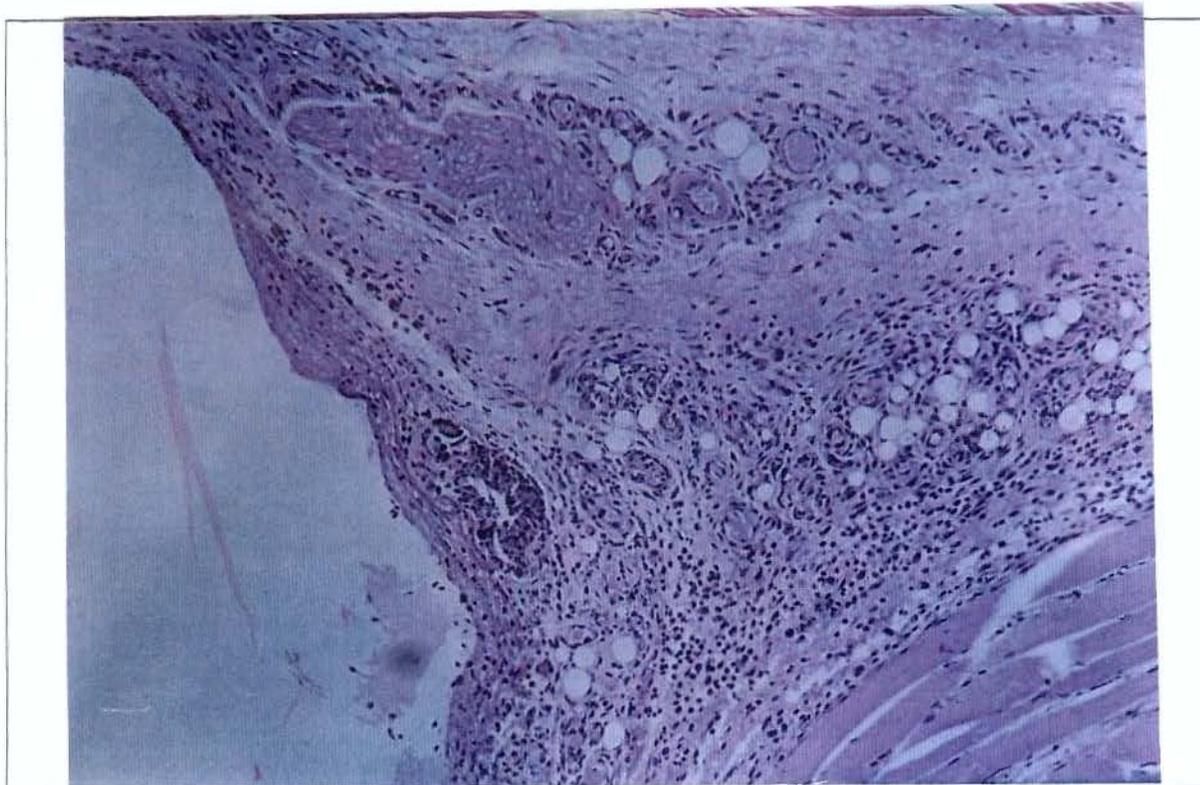


Fig.5- Fotomicrografia da região de abertura do tubo. Notar definição e nitidez da imagem; facilidade de distinção entre tecido muscular e conjuntivo e o infiltrado inflamatório. (Glicol Metacrilato; H.E. 10X)

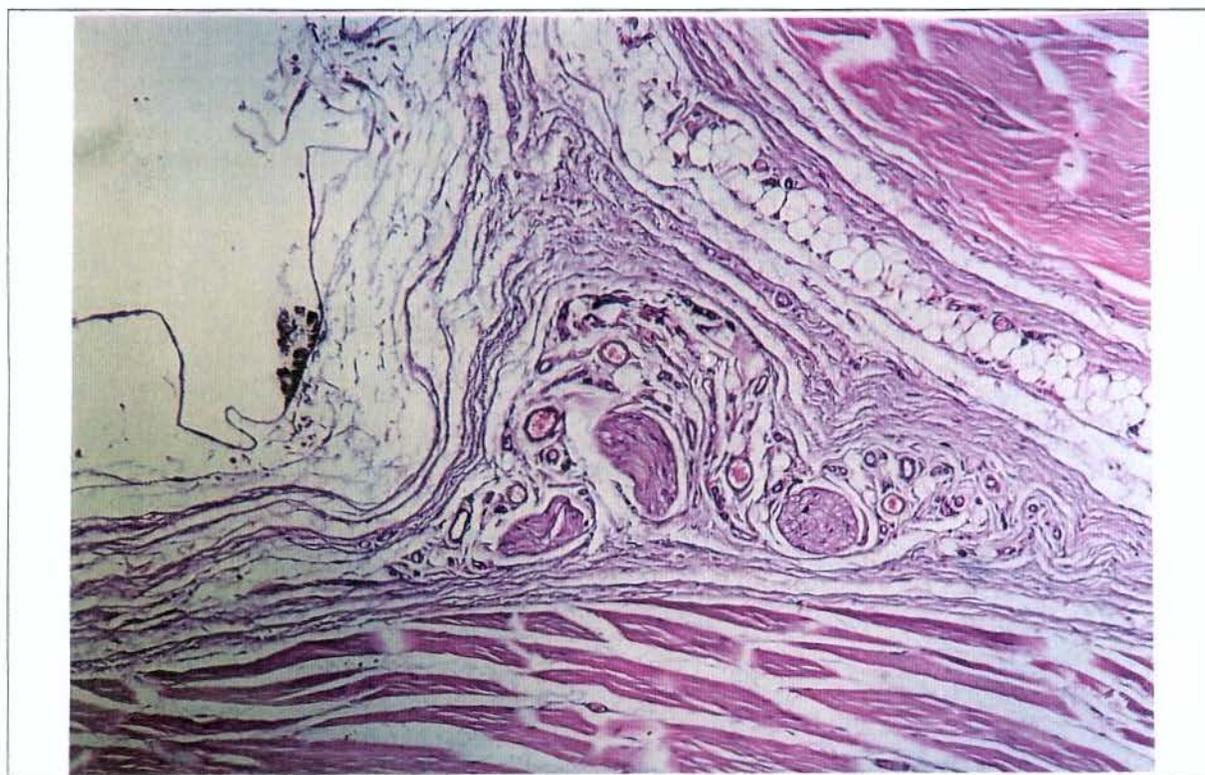


Fig.6- Fotomicrografia da região de abertura do tubo. Notar falta de definição e nitidez da imagem; maior dificuldade de distinção entre tecido muscular e conjuntivo. (Parafina, H.E., 10X)

Utilizando-se da coloração de Tricrômico de Mallory podemos observar mais nitidamente a continuidade do tecido incluído em Glicol Metacrilato, bem como a nitidez da imagem favorecendo a sua análise e interpretação (Fig.7 e Fig.8).

Em maior aumento, ficam ainda mais evidentes as diferenças quanto à qualidade da imagem, seja ela em relação à nitidez da imagem, identificação celular devido à preservação das estruturas e diminuição dos artefatos. Percebe-se com mais facilidade as características celulares, o que torna a sua identificação mais precisa, bem como a identificação de vasos sangüíneos, matriz extracelular, fibras extracelulares (Fig.9; fig.10; Fig.11 e Fig.12).

Quando o tecido é incluído em parafina, algumas células não são identificadas sem que se utilize a objetiva de 100x com técnica de imersão. E mesmo neste aumento, algumas células não são facilmente identificadas podendo causar dúvidas mesmo para um observador experiente. Pelo contrário, esta dificuldade é muito pequena para os cortes de tecidos incluídos em Glicol Metacrilato. (Fig.13; Fig.14; Fig.15 e Fig.16).

Parece evidente que a qualidade da imagem do método de inclusão em Glicol Metacrilato é muito superior a da Parafina (Fig.17; Fig.18; Fig.19; Fig.20; Fig.21; Fig.22 e Fig.23) sendo, portanto, o método de escolha quando da necessidade de um maior detalhe histológico, principalmente quando de um estudo quantitativo de células.

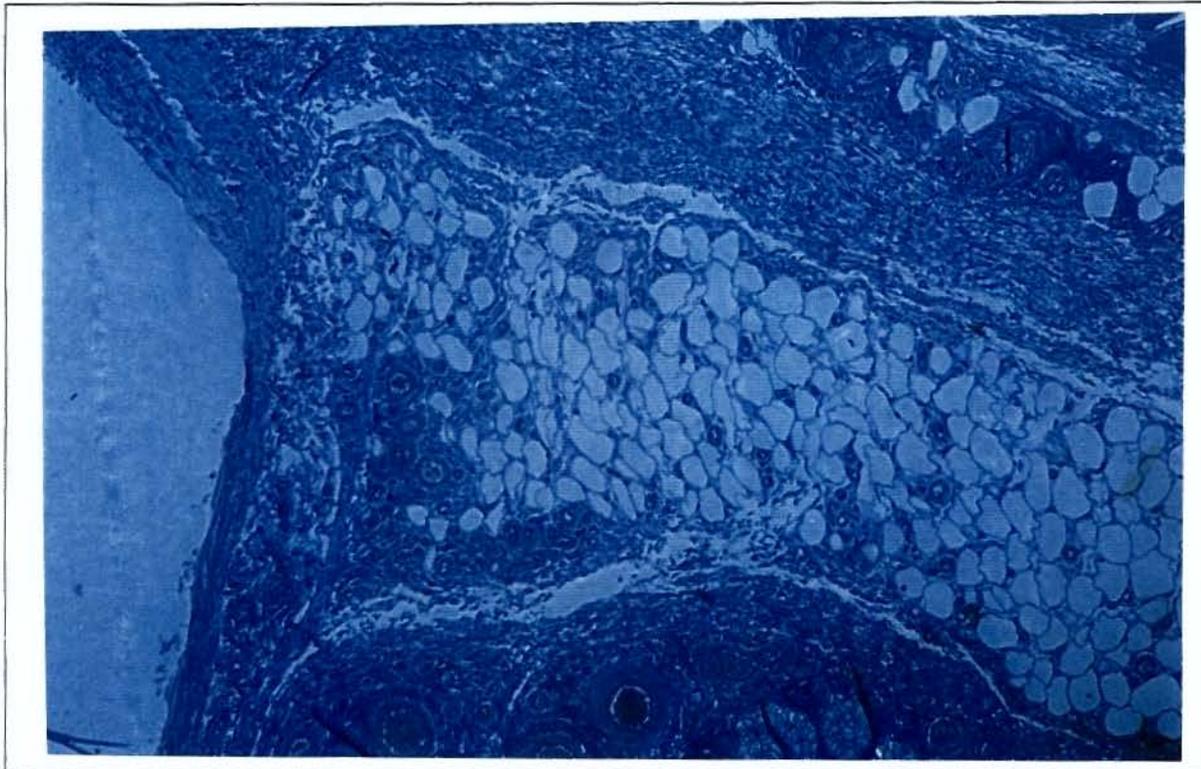


Fig.7- Fotomicrografia da região de abertura do tubo. Notar a continuidade do tecido, mostrando a preservação das estruturas após os procedimentos histológicos (Glicol Metacrilato, Tricrômico de Mallory, 10X)

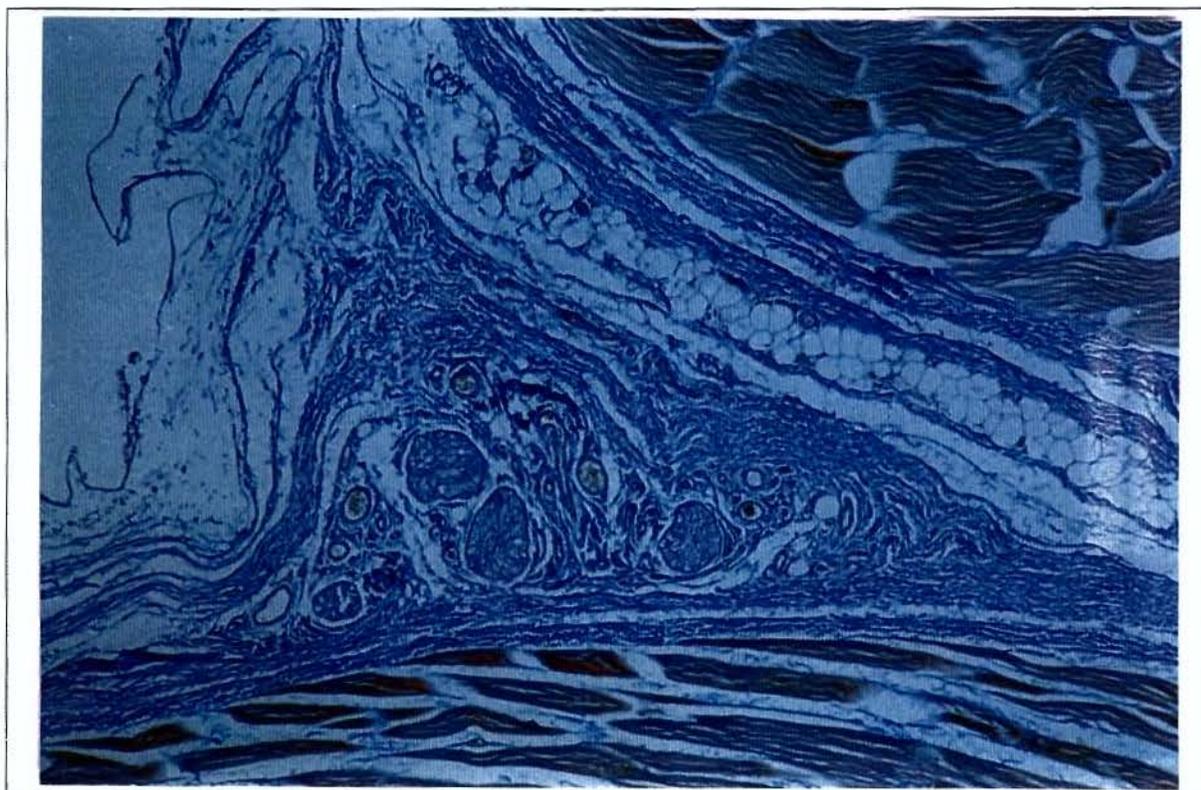


Fig.8- Fotomicrografia da região de abertura do tubo. Notar presença de espaços no interior do tecido devido aos artefatos de técnica durante o processamento histológico (Parafina, Tricrômico de Mallory, 10X)

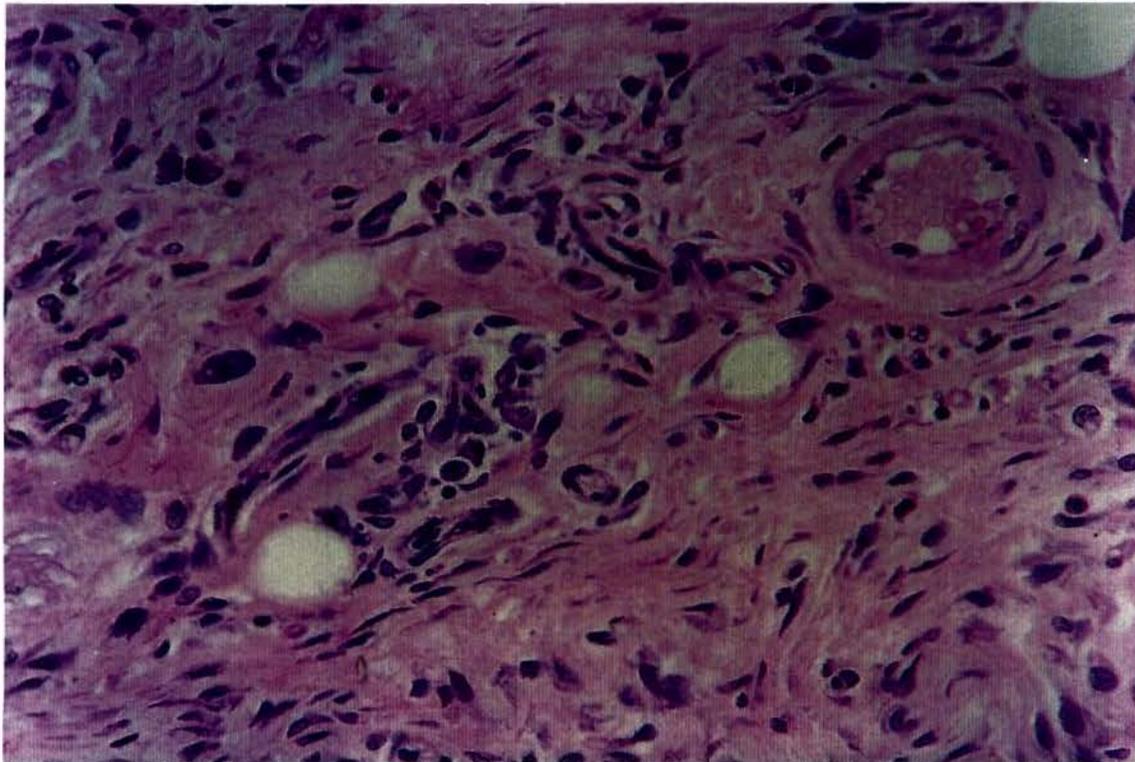


Fig.9- Fotomicrografia da região de tecido conjuntivo. Observar nitidez da imagem; identificação de estruturas celulares (núcleo, eucromatina, heterocromatina, nucléolo, citoplasma, grânulos citoplasmáticos; identificação de um vaso bem definido(Glicol Metacrilato; H.E., 40X)

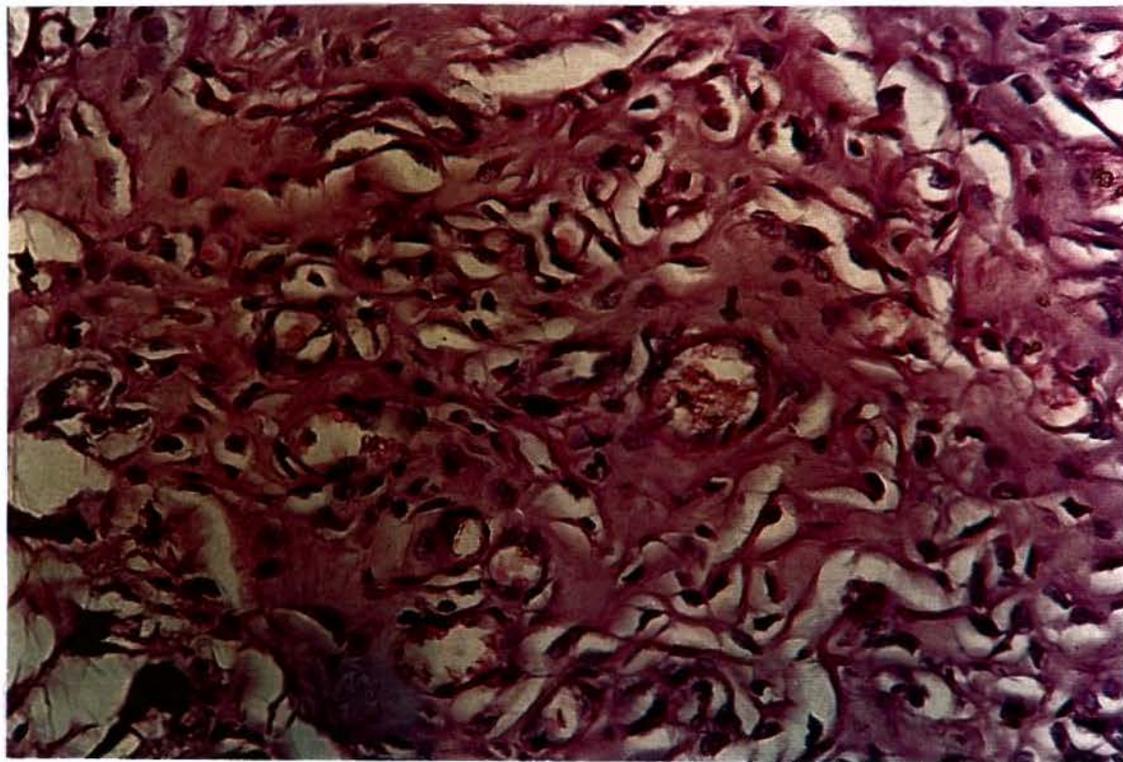


Fig.10- Fotomicrografia da região de tecido conjuntivo. Observar falta de nitidez da imagem; identificação de estruturas celulares mais pobres; características mais pobres de um vaso sanguíneo em relação à imagem anterior (seta) (Parafina, H.E., 40X)

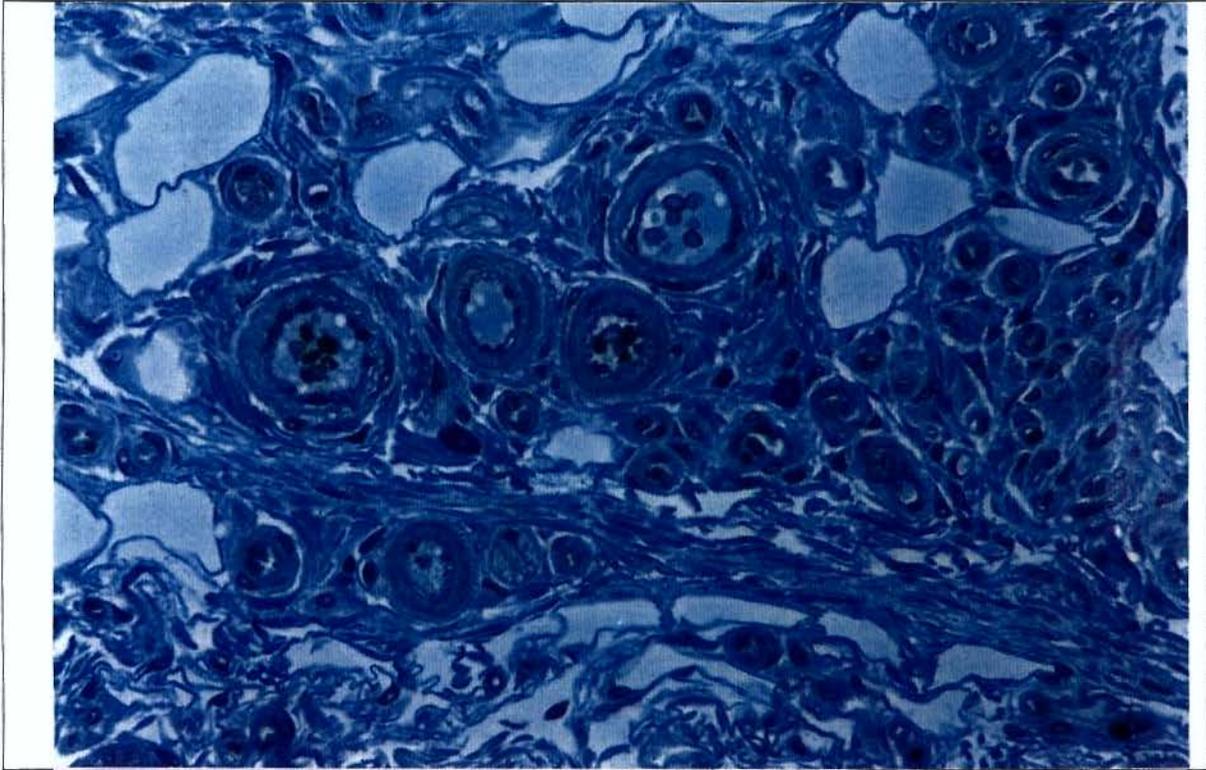


Fig.11- Fotomicrografia da região de tecido conjuntivo. Observar nitidez da imagem; trama de fibras colágenas bem preservadas; consistência do tecido com poucos artefatos de técnica (Glicol Metacrilato; Tricrômico de Mallory 40X)

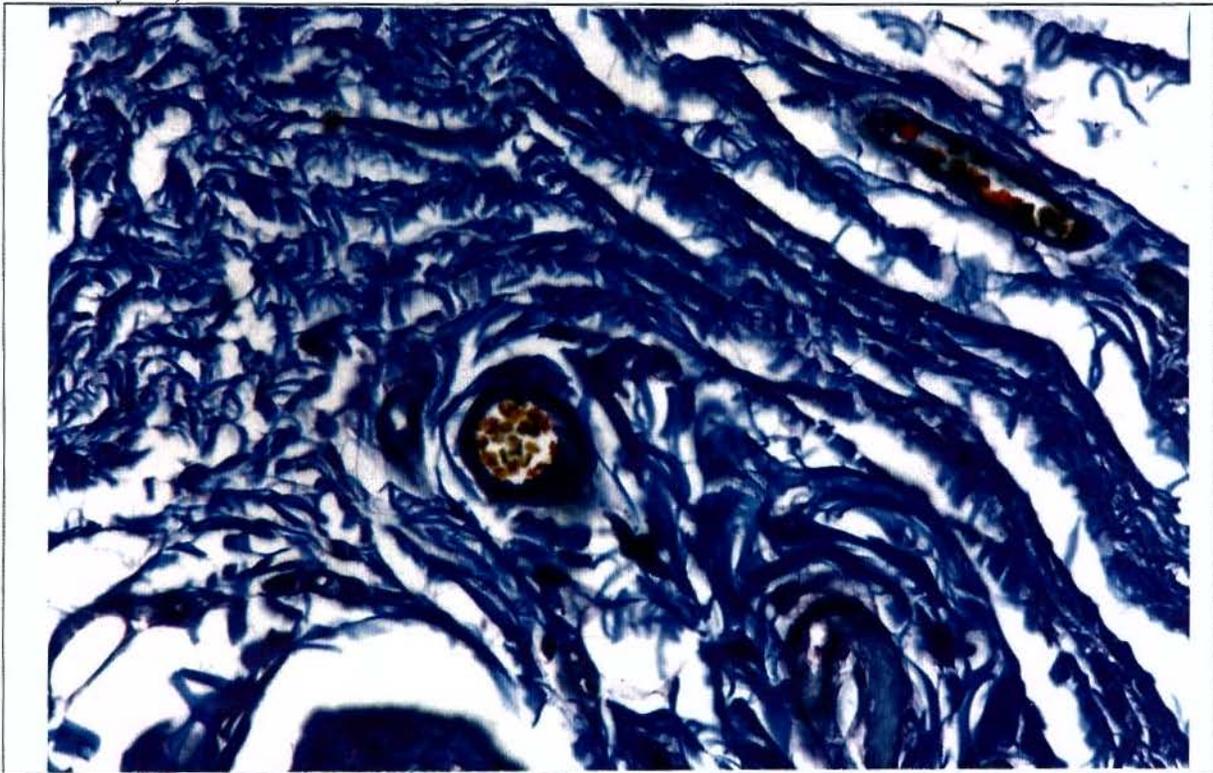


Fig.12- Fotomicrografia da região de tecido conjuntivo. Notar falta de definição e nitidez da imagem; fibras colágenas menos preservadas; falta de continuidade do tecido com muito esgarçamento das fibras colágenas. (Parafina, Tricrômico de Mallory, H.E., 40X)

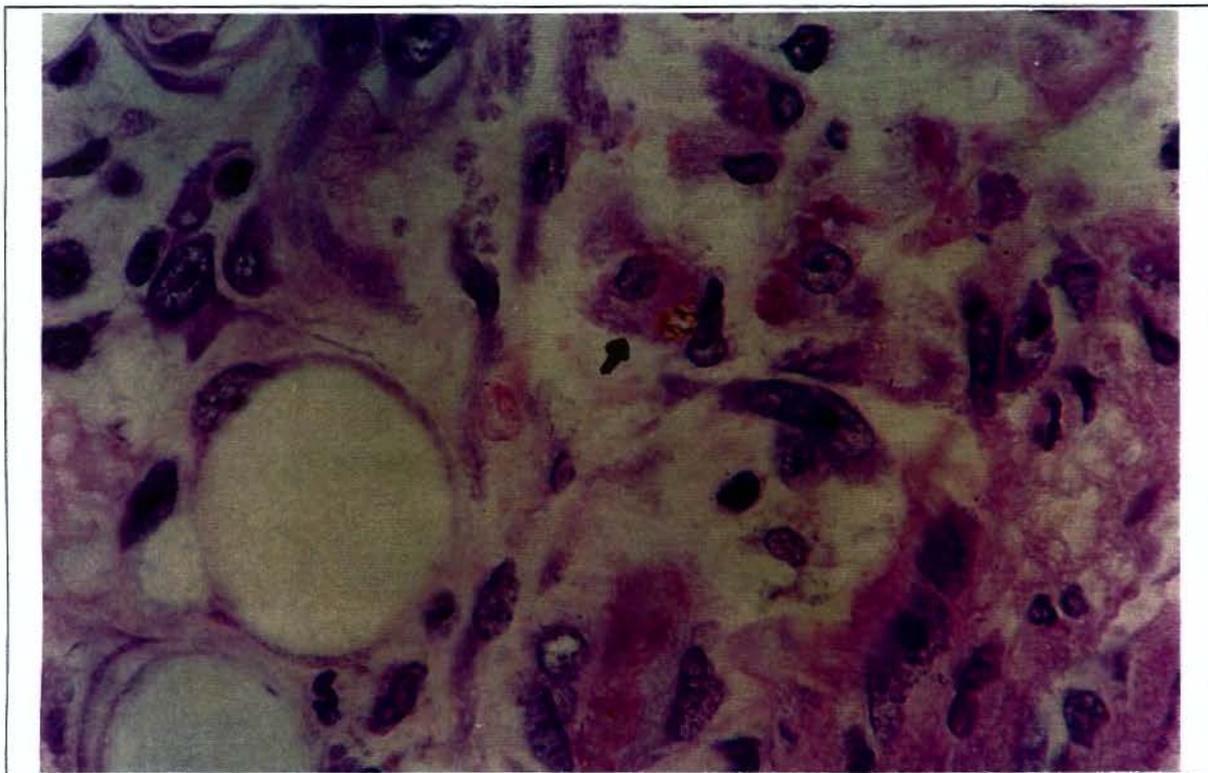


Fig.13- Fotomicrografia da região de tecido conjuntivo. Observar nitidez da imagem; identificação de estruturas celulares possibilitando o reconhecimento das células (observe uma célula característica de um macrófago com material fagocitado - seta); continuidade do tecido com poucos artefatos de técnica (Glicol Metacrilato; H.E. 100X)

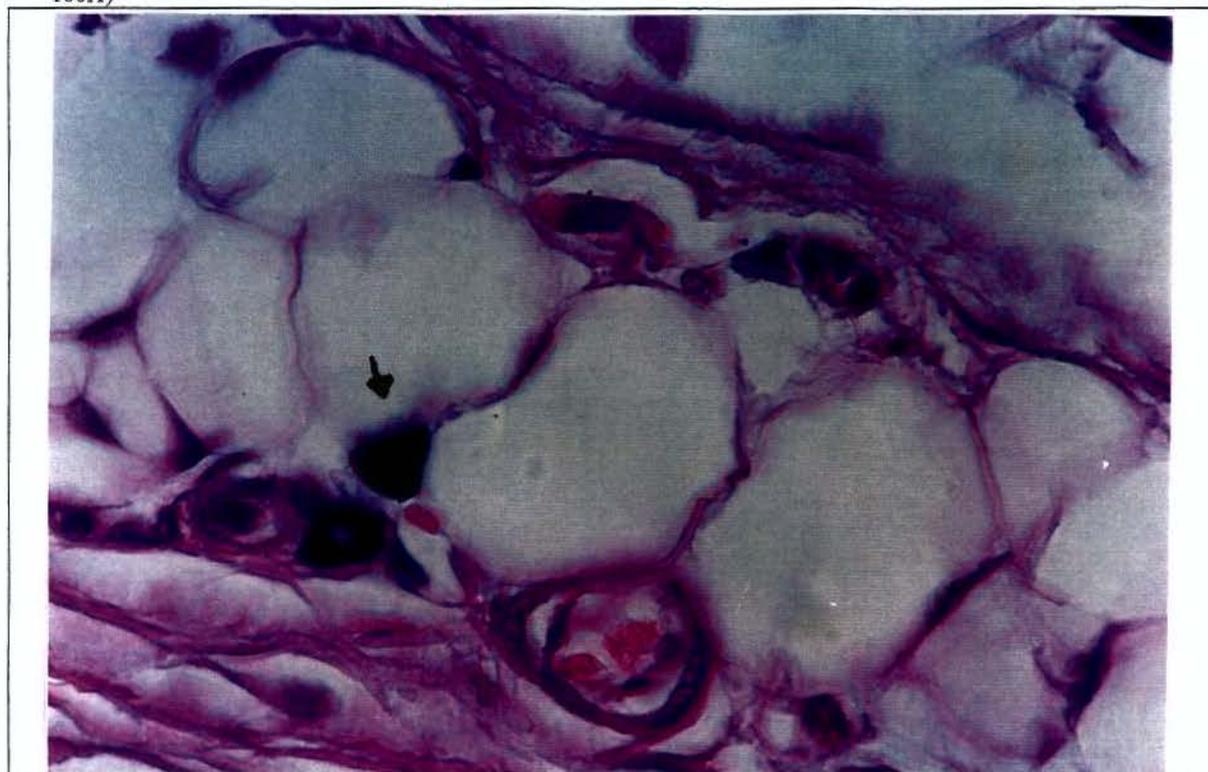
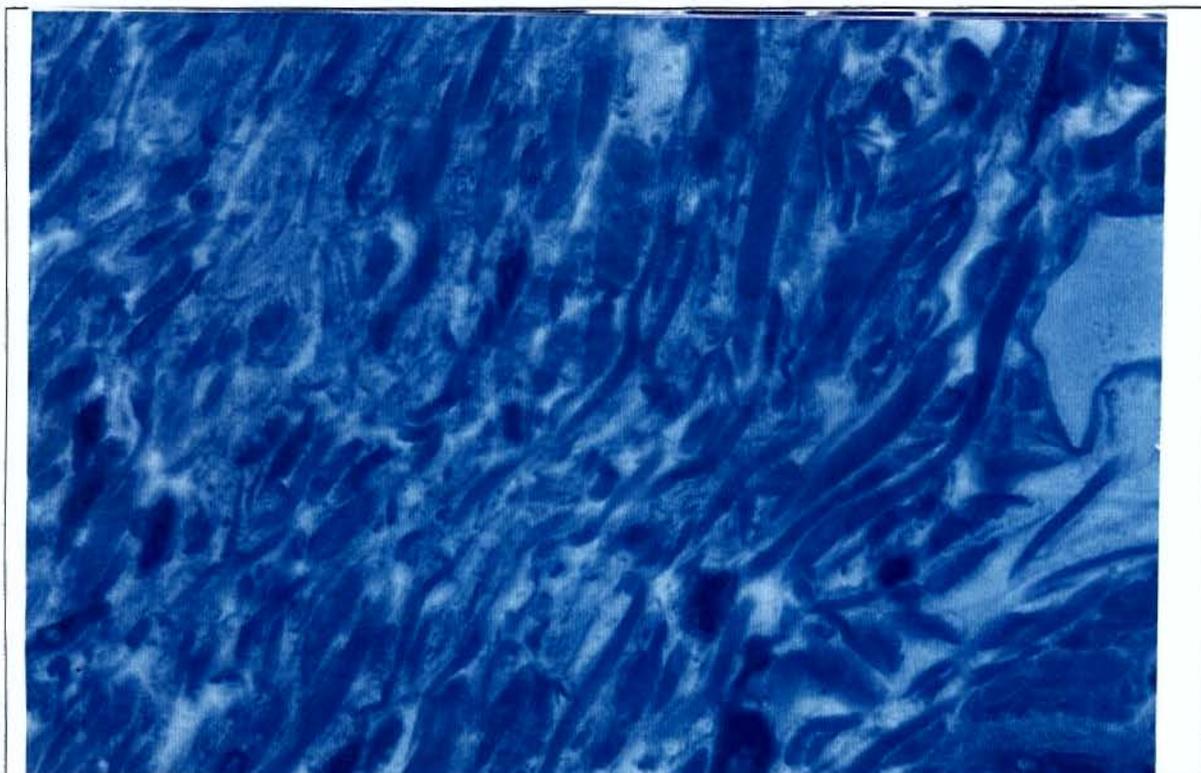


Fig.14- - Fotomicrografia da região de tecido conjuntivo. Observar falta de continuidade do tecido com áreas de artefato de técnica; Mastócito, podendo ser confundido com precipitação de corante(seta). (Parafina; H.E. 100X)



) Fig.15- Fotomicrografia da região de tecido conjuntivo. Observar a consistência do tecido; trama de fibras colágenas bem preservada(Glicol Metacrilato; Tricrômico de Mallory, 100X

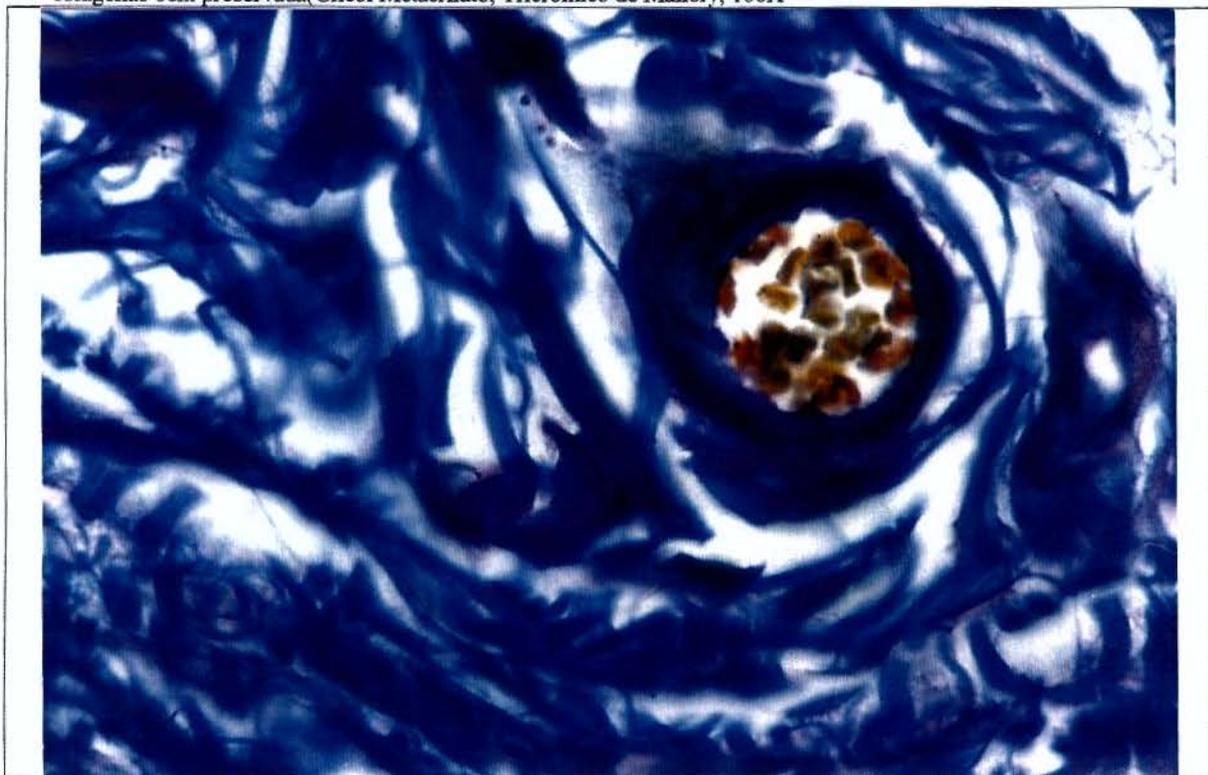


Fig.16- Fotomicrografia da região de tecido conjuntivo. Observar a descontinuidade do tecido com grande número de artefatos entre as fibras colágenas (Parafina; Tricrômico de Mallory. 100X)

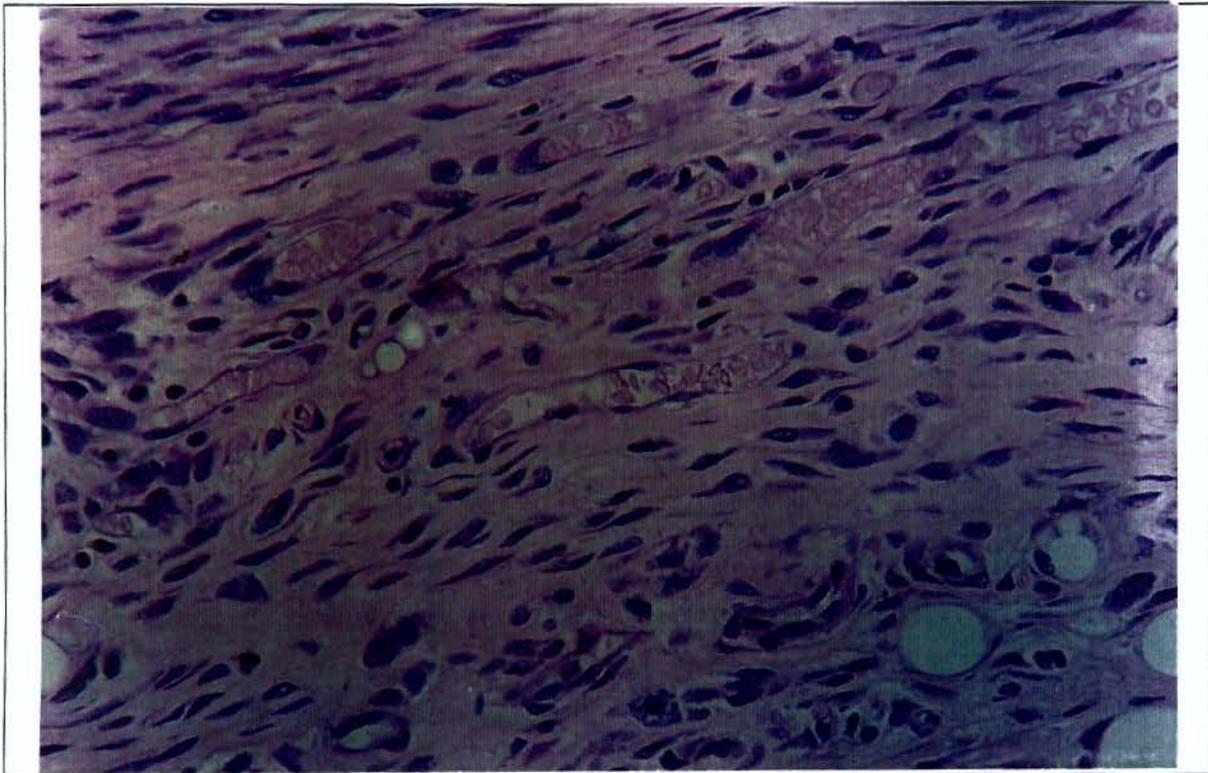


Fig.17- Fotomicrografia da região de tecido conjuntivo. Notar definição e nitidez da imagem; corte longitudinal de vasos sanguíneo, continuidade do tecido, identificação de características celulares. (Glicol Metacrilato; H.E. 40X)

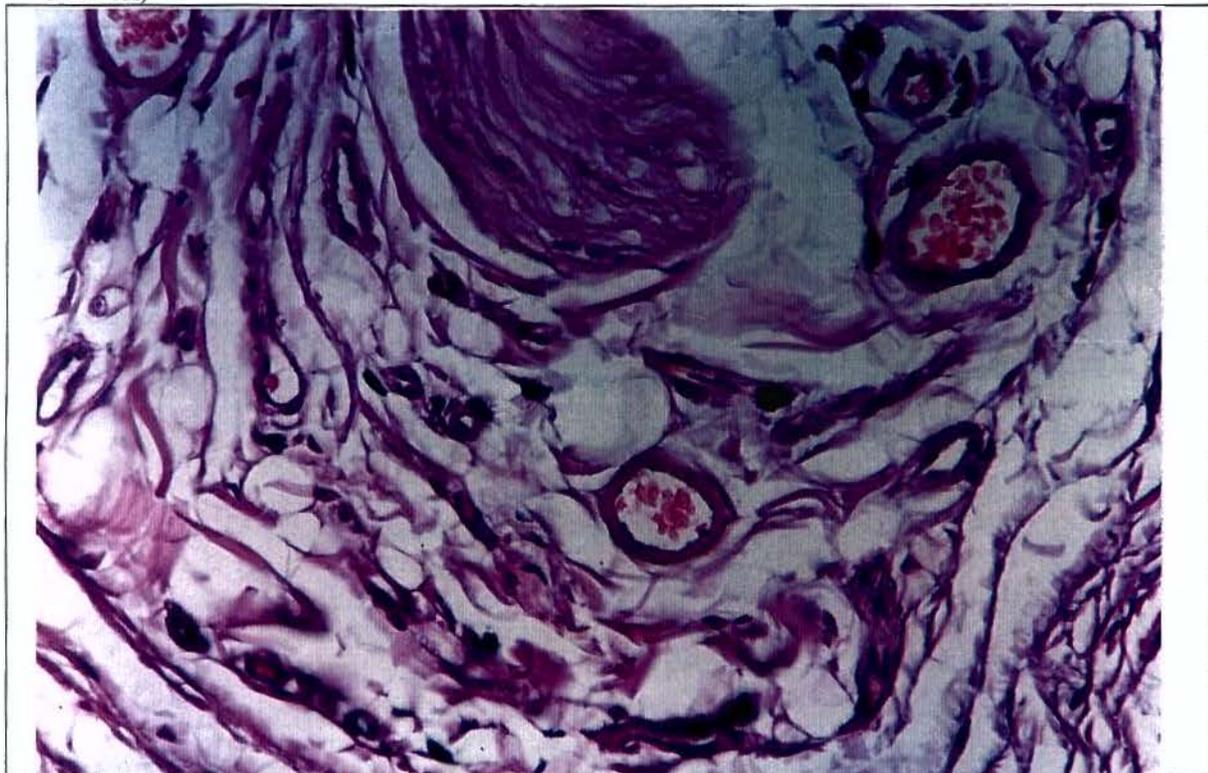


Fig.18- Fotomicrografia de região fibrosa. Notar falta de definição e nitidez da imagem; falta de preservação do tecido com muito espaçamento entre as fibras (Parafina, H.E., 40X)

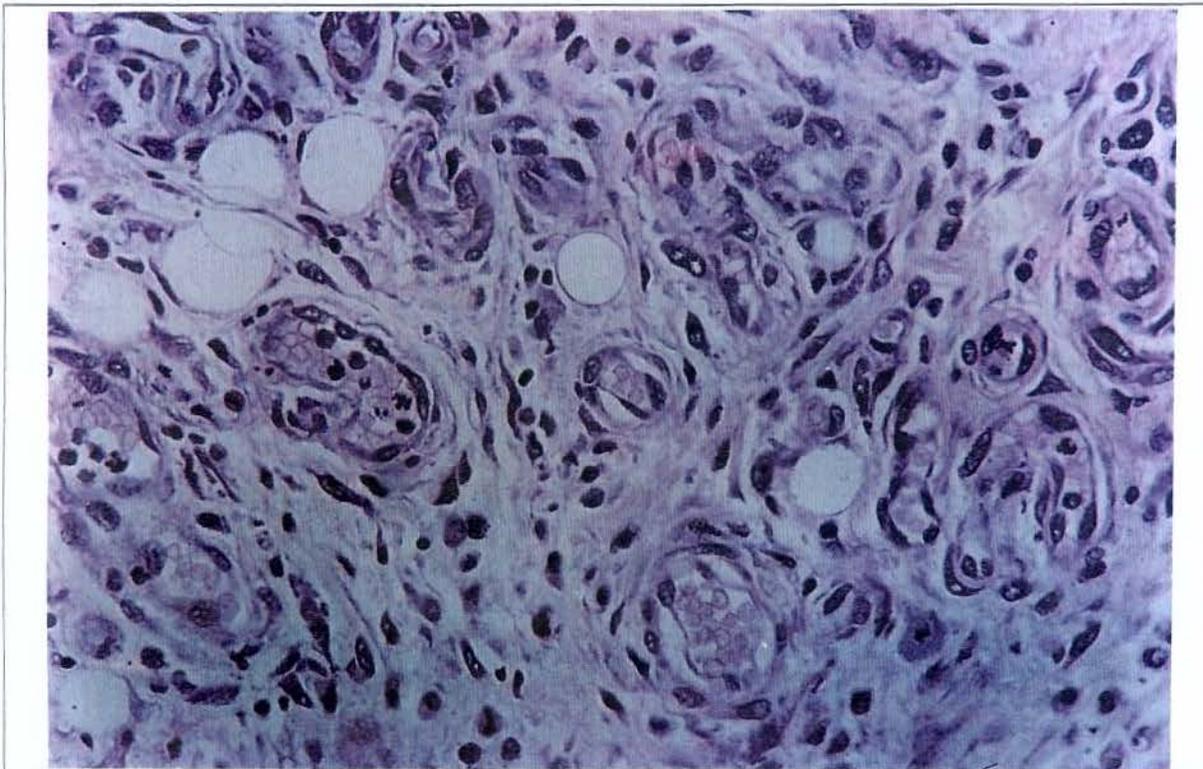


Fig.19- Fotomicrografia da região de conjuntivo. Observar definição e nitidez da imagem; facilidade de identificação celular(Glicol Metacrilato; H.E. 40X)

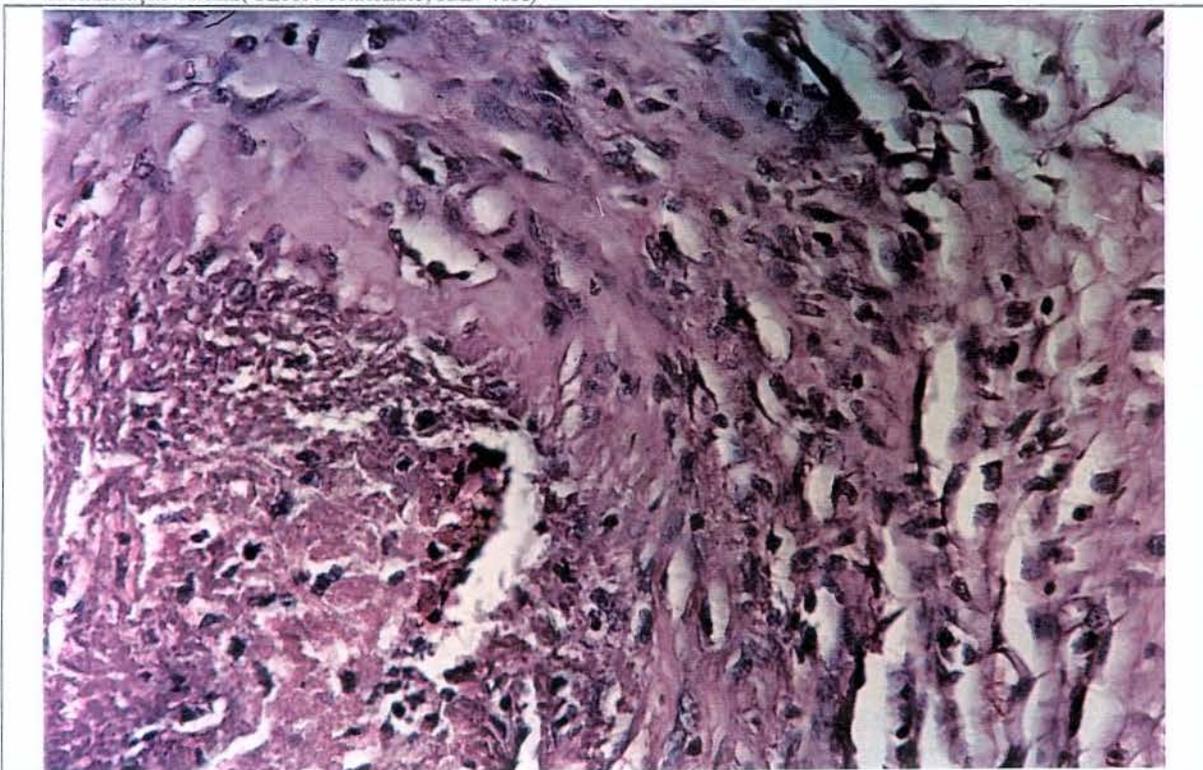


Fig.20- Fotomicrografia da região de abertura do tubo. Notar falta de definição e nitidez da imagem, dificuldade de identificação celular. (Parafina, H.E., 40X)

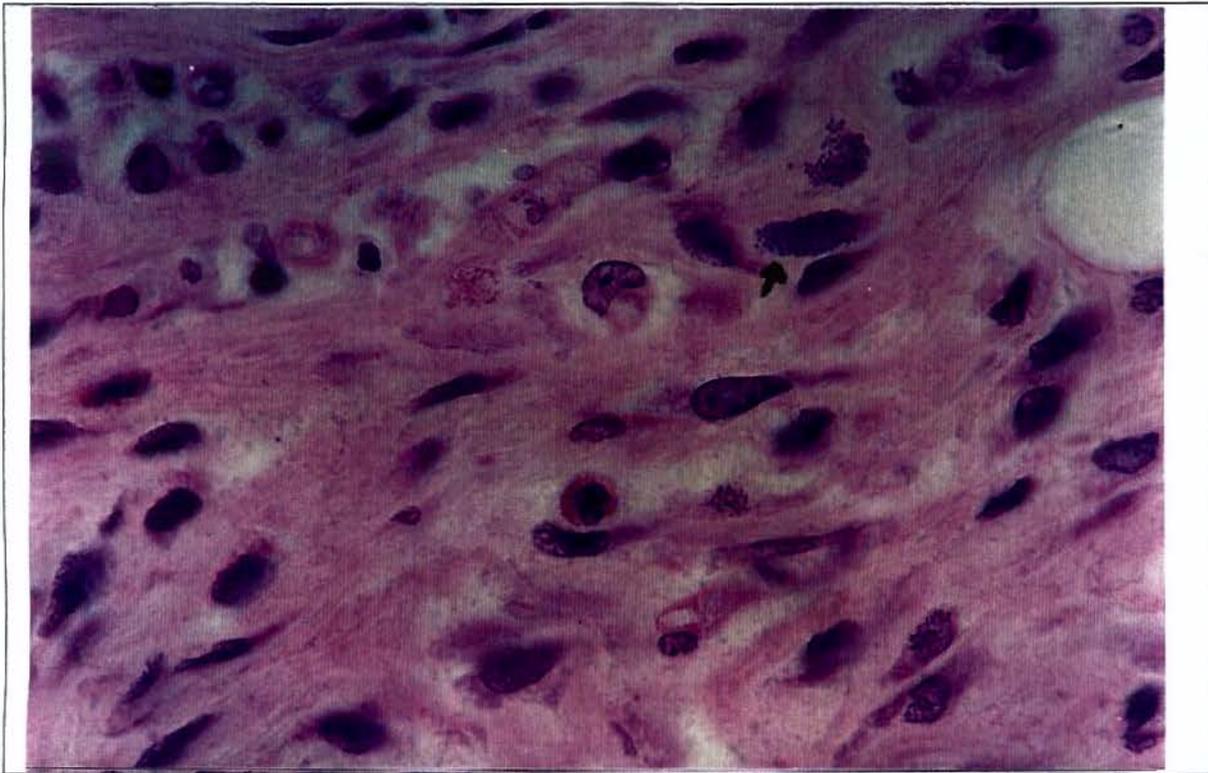


Fig.21- Fotomicrografia de região de conjuntivo. Notar clareza de detalhes da morfologia das células; possibilidade de identificação do citoplasma celular com grânulos citoplasmáticos devido à pequena espessura do corte (seta) (Glicol Metacrilato; H.E. 100X)

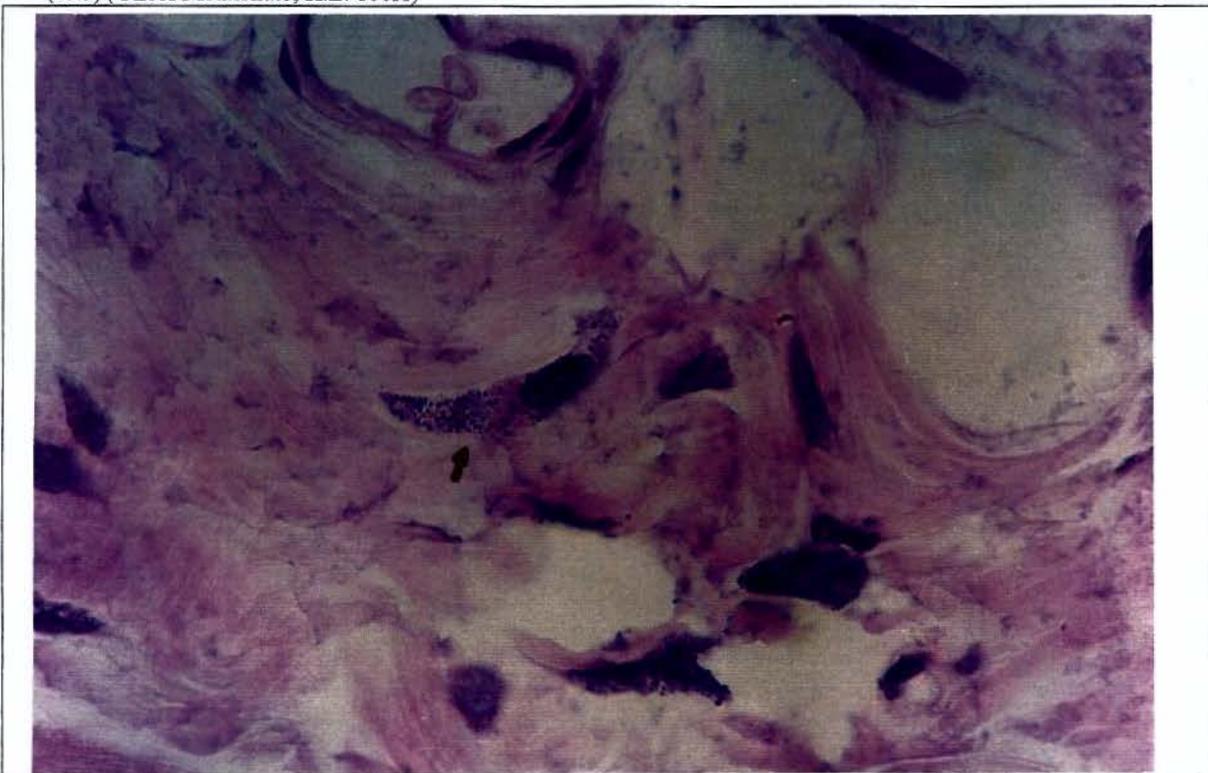


Fig.22- Fotomicrografia de região de conjuntivo. Notar clareza de detalhes da morfologia das células; célula característica de mastócito pela presença de grânulos no citoplasma celular (seta) (Glicol Metacrilato; H.E. 100X-imersão)



Fig.23- Fotomicrografia da região de tecido muscular. Observar definição e nitidez da imagem; perceber as estrias transversais do músculo estriado (Glicol Metacrilato; H.E. 40X)

DISCUSSÃO

Utilizando da revisão de literatura vasta na área de biocompatibilidade biológica de cimentos endodônticos, constatamos, em grande parte dos trabalhos, a utilização de implantes de tubos de polietileno preenchidos por cimento endodôntico no tecido subcutâneo de ratos e a utilização do método de processamento dos tecidos em Parafina para análise histopatológica(5-13).

Estes trabalhos relacionados à biocompatibilidade de materiais odontológicos, mais precisamente aqueles de uso na prática endodôntica, trazem imagens histológicas que deixam muito a desejar, no que se refere à qualidade da imagem, preservação de detalhes celulares com produção de artefatos, pois utilizam o método de inclusão dos blocos de tecido em Parafina(5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 18; 19; 22; 24; 25; 27; 28; 30; 31; 33; 35; 36; 37; 38; 40; 46; 47; 48).

Em um estudo piloto, foi utilizada esta metodologia, ou seja, o método de inclusão dos blocos de tecido em parafina. Em primeira instância perceberemos a dificuldade de se obter bons cortes em um micrótomo convencional, pois o aproveitamento das secções foi muito pequeno devido ao esgarçamento dos tecidos, além da qualidade final de imagem indesejável; muito embora, esta qualidade estivesse de acordo com os achados da literatura.

Muitos espécimes deste trabalho inicial foi perdido em função da má qualidade das secções obtidas e acreditamos que um padrão de qualidade dificilmente seria alcançado. A partir deste ponto, começamos a pesquisar uma alternativa para solucionar o problema da qualidade final das imagens e tentar

atingir um padrão que pudesse superar aquele encontrado na literatura científica.

Quando então, os trabalhos ligados à área específica de Histologia nos ajudaram a escolher um outro método de inclusão para tecido subcutâneo de ratos que não o convencional, no qual se utiliza a parafina. Observou-se então, que o método de inclusão em glicol metacrilato já vem sendo utilizado em histologia desde 1960, quando Rosenberg et al. (39) consideraram tal material apropriado para a preparação de secções ultrafinas para análise em microscopia eletrônica.

Com o aprimoramento das técnicas foi possível em 1962, utilizar o Glicol Metacrilato em microscopia de luz (15), contudo, nesta data, sua utilização ainda era muito restrita. Em 1974, finalmente foi consagrada a sua utilização como material de inclusão de tecidos animais para estudo em microscopia óptica (9).

Nesta época, o glicol metacrilato era fabricado em laboratório com auxílio de fórmulas descritas em trabalhos anteriores, o que dificultava a execução rotineira de inclusão. Hoje, existem fórmulas prontas vendidas comercialmente como é o caso da Historesin (Leica) e JB4 (Polysciences).

As características que fazem do glicol metacrilato (GMA) um desejável material para inclusão de tecido animal para estudo em microscopia óptica segundo Cole e Sykes (9) incluem:

- a) habilidade para infiltrar no tecido sem a completa remoção da água;
- b) seu monômero é miscível em água e etanol;

- c) tecido mole e tecido duro são bem infiltrados e suportados pelo GMA;
- d) a temperatura pode ser mantida entre 0-4°C, o que reduz artefatos provocados pela temperatura
- e) os cortes são feitos de 0,5-3,0 micrômetros de espessura, proporcionando uma grande capacidade de identificação celular;
- f) a remoção do polímero do tecido previamente à coloração não é necessário.

Bennet et al, em 1967 (3), propuseram ainda como vantagens do glicol metacrilato:

- 1-baixa distorção, mas não totalmente ausente ao nível de microscopia óptica (distorção da mielina dos nervos; hemólise parcial das hemoglobinas na periferia dos blocos)
- 2-mais informações após a coloração
- 3-não reage quimicamente (ligações covalentes) com os grupos importantes para a coloração
- 4-refinamento na visualização de detalhes histológicos
- 5-distinção clara de tecido muscular e conjuntivo
- 6-permite aplicação de métodos de localização imunohistoquímica
- 7-clareza e consistência não visualizada com parafina
- 8-seções podem ser feitas com até 0,2 µm.

Contudo, até o momento, ainda não temos nenhum trabalho utilizando o Glicol Metacrilato como material de inclusão de tecido subcutâneo de ratos

contendo tubos de polietileno preenchidos por cimento, visando a avaliação de sua biocompatibilidade. Desta forma lançamos mão de um estudo sobre a utilização do Glicol Metacrilato como material de inclusão de tecido subcutâneo de ratos que serviram para a implantação de cimento endodôntico.

Os resultados obtidos revelaram vantagens significantes para o Glicol Metacrilato desde o processamento histológico até a qualidade final da imagem para estudo histopatológico quando comparado à Parafina.

Durante o processamento histológico tivemos algumas diferenças básicas compiladas na tabela 1 da secção de Resultados. Tais diferenças foram consideradas fundamentais para que a qualidade final da imagem fosse diferente entre os métodos de inclusão em Parafina e Glicol Metacrilato.

Para que possamos realizar uma correta infiltração da parafina é necessária uma desidratação total do tecido, porque só assim a parafina que é imiscível em água pode penetrar pela intimidade do tecido. Por outro lado, o Glicol Metacrilato é hidrossolúvel e pode penetrar um tecido não totalmente desidratado. Tal fato é de grande importância pois a desidratação é um dos fatores que leva à produção de artefatos celulares, podendo causar plasmólise e colapso de paredes celulares em tecidos delicados já, tecidos densos e não vacuolados são praticamente imunes à desidratação. Além disso, os efeitos da desidratação são bastante minimizados quando se utiliza de uma bateria crescente em concentração do desidratante (9; 14)

O clareamento com xilol não é um passo necessário no método de inclusão em glicol metacrilato, mas fundamental no método que utiliza a Parafina

(3), fato que também pode gerar alguma distorção na imagem final dos cortes de Parafina, pois representa um passo a mais durante o processamento.

A infiltração e inclusão são procedimentos semelhantes entre os dois métodos com uma diferença – a temperatura dos líquidos. Para infiltração e inclusão em parafina é necessário que ela esteja fluida à temperatura de 56°C, já o glicol metacrilato se mantém fluido a uma temperatura de até 40°C negativos, desta forma temos maior preservação dos tecidos termolábeis, bem como contração de polimerização menor que a parafina, proporcionando melhor preservação da integridade dos tecidos (1;3; 9; 21; 32; 39). Além disso, o monômero de glicol metacrilato, provoca menos distorção no tecido que a parafina, durante o processo de infiltração. A diminuição na distorção ocorre porque o glicol metacrilato é um material que possui alta polaridade, ao contrário da parafina que é altamente apolar (hidrófobo). O tecido geralmente se enrugua quando colocado em um fluido de polaridade relativamente menor. Desta forma um material polar, como é o caso do Glicol Metacrilato, é menos apto a causar distorção que um apolar, como é a parafina. (14).

Alguns cuidados são necessários quando da polimerização do Glicol Metacrilato. O oxigênio do ar interfere na reação de polimerização, não permitindo que ela ocorra, ou pelo menos aumentando o tempo de presa do material. Para tanto, é necessário proteger a resina do ar utilizando resina acrílica autopolimerizável, parafina ou cera, desta forma a reação se processa naturalmente (1; 2; 3; 9; 14; 15; 23; 26; 29; 52). Um outro cuidado que se deve tomar durante a reação de polimerização diz respeito ao controle da temperatura, pois a reação é exotérmica e o excesso de calor pode provocar

bolhas no interior da resina e prejudicar a imagem final, sendo comum em blocos de tecido maiores que 2X2 mm pois é mais difícil de controlar a reação. Para o controle da reação utiliza-se redução da temperatura da solução de inclusão, resfriamento durante o processo de presa do material, ou ambas as técnicas (1; 3; 9; 29; 32; 49). Nós preferimos utilizar o resfriamento durante a inclusão com uma barra de gelo sob os moldes, desta forma conseguimos controlar a reação exotérmica de polimerização sem aumentar em muito o tempo de presa.

A secção dos blocos incluídos em glicol metacrilato pode ser feita de 0,25 a 4 μ m , enquanto a parafina rotineiramente é seccionada de 6 a 10 μ m (1; 3; 15). Tal diferença é significativa, pois um corte mais espesso pode mostrar uma sobreposição de estruturas mais freqüentemente. Desta forma percebe-se uma imagem final mais nítida com o glicol metacrilato facilitando a análise e interpretação da imagem posteriormente (1; 2; 9; 21,42; 34).

Para que se consiga cortes finos o bastante e com o máximo de qualidade, uma lâmina nova, ou pelo menos, uma área nova da lâmina deve ser utilizada para os cortes (9; 14, 44; 42). Existe uma variedade de material que compõem as lâminas para micrótomo, contudo a lâmina mais utilizada é a de vidro por provocar menos artefatos de técnica (1; 9; 3; 15, 26; 29; 32; 42; 39; 49; 50;). Mas também encontra-se autores que preferem utilizar lâminas de aço por ser de uso mais rotineiro em um laboratório comum de histologia (2; 51; 52). Nós preferimos a utilização de lâminas de tungstênio, por proporcionar rotineiramente cortes de boa qualidade em nosso laboratório de histologia.

Durante o seccionamento dos blocos incluídos em glicol metacrilato não se percebe a formação da fita que é comum nos cortes de blocos incluídos em

parafina (9; 14; 44). Contudo, podemos consegui-la, quando necessário, pela adição de Polietileno Glicol ao glicol metacrilato na proporção ideal de 0,20mL para cada 5mL de solução (52). Outros autores utilizam o recobrimento do bloco polimerizado com cera para que uma secção se una a outra (9; 14; 44).

O material glicol metacrilato é muito mais duro que a parafina (9; 14), além disso apresenta uma resiliência que suporta a ação da navalha do micrótomo diminuindo os riscos de se provocar um artefato de técnica durante este procedimento. O glicol metacrilato dá bom suporte para as estruturas celulares minimizando o deslocamento durante o processo de seccionamento (14; 21). Tais características também possibilitam o corte do tecido sem que se remova o tubo de polietileno de seu interior, desta forma, tem-se uma maior fidelidade da reação provocada pelo material inserido no tubo.

Para o estiramento das secções dos blocos incluídos em glicol metacrilato utiliza-se água fria sem a necessidade de albumina na lâmina para que haja uma adesão mais efetiva (9; 14; 29; 44; 50). Por outro lado a parafina necessita ser estirada em água quente e este procedimento pode esgarçar o tecido pela falta de resistência da parafina

Um outro fator de diferenciação técnica entre os dois métodos de inclusão é a remoção do material de inclusão para que se processe a coloração. No método de inclusão em parafina, o material de inclusão deve ser removido para permitir a penetração e ligação do corante, já o glicol metacrilato por ser não cristalino, hidrossolúvel, homogêneo e transparente, não necessita ser removido para que se proceda a coloração. Muitos artefatos vistos na secção de parafina já corada pode ser devido ao fato da matriz de parafina que suportava as

estruturas ter sido removida (14; 21). Tal fato também é visualizado quando o glicol metacrilato é removido por xilol antes da coloração (15).

Um grande número de corantes podem ser utilizados na coloração de secções feitas de blocos incluídos em glicol metacrilato (2; 9; 14; 15; 21; 32; 39; 44; 50). Inclusive as colorações convencionais utilizadas para coloração de secções incluídas em Parafina (3; 14; 44; 51). Algumas colorações especiais também foram desenvolvidas ou modificadas para se obter boas imagens histopatológicas como é o caso da hematoxilina toluidina azul-fluxinada (29) e a modificação da técnica de Brown e Hopps para identificação de bactérias Gram positivas e negativas (42).

Quando examinamos um corte de glicol metacrilato em microscópio de luz, notamos que a espessura do corte influencia diretamente na intensidade de coloração, pois a quantidade de corante depende da densidade de estruturas presentes na área a ser examinada(3). Desta forma podemos inferir que os cortes de glicol metacrilato coram menos que os de parafina. Para que possamos ter um bom contraste, utilizando os corantes e técnicas de coloração convencionais, podemos aumentar o tempo de permanência nas soluções de corante ou mesmo aumentar a temperatura para que as ligações dos corantes se processem mais rapidamente (14; 21).

Além disso, o glicol metacrilato serve para incluir peças que contenham, tanto tecido mole quanto tecidos mais resistentes ao corte (9). Desta forma pudemos utilizá-lo como material de inclusão do tecido subcutâneo do rato contendo em seu interior o tubo preenchido por cimento, sem que este tubo

necessitasse ser removido, já na parafina o tubo necessitou ser removido para que os cortes pudessem ser realizados com um padrão de qualidade melhor.

Como se pode perceber, as características técnicas de processamento histológico são favoráveis à utilização do glicol metacrilato e quando não, podemos lançar mão de alternativas para solucionar as eventuais dificuldades como é o caso da formação de fita e da coloração. A característica mais importante é sem dúvida a qualidade da imagem histopatológica dos cortes feitas de tecidos incluídos em glicol metacrilato, que unanimemente é superior à da Parafina (1; 2; 3; 9; 14; 15; 21; 26; 29; 32; 34; 39; 42; 49; 50; 51). Podendo ser utilizado com grandes vantagens em estudos citológicos de tecidos animais e vegetais, histoquímica, imunohistoquímica, microbiologia e por fim em estudos de biocompatibilidade biológica de cimentos endodônticos no interior de tecido subcutâneo de ratos.

Os nossos resultados mostraram, nas secções de glicol metacrilato, facilidade de distinção entre os tecidos e nitidez de estruturas celulares superiores àquelas encontradas com parafina, o que está de acordo com outros autores pesquisados (2; 9; 29; 32; 34). O aumento da nitidez é fundamental para a identificação precisa das células, principalmente quando se pretende realizar um estudo quantitativo de células inflamatórias. Quando se utiliza o método de inclusão em Parafina, um terço das células não podem ser identificadas (29) prejudicando, portanto, a análise quantitativa do processo inflamatório, a partir da contagem de células.

A produção de artefatos foi bastante reduzida, resultando em aumento da qualidade da imagem e melhora da preservação dos tecidos. Assim como,

tivemos uma redução na distorção e movimentação das estruturas durante o corte a partir dos blocos incluídos em glicol metacrilato. Um bom exemplo de redução no número de artefatos é conseguido com a técnica de coloração de Tricrômico de Mallory, que somada a técnica de HE, mostram a continuidade do tecido, ou seja, ausência dos espaços intercelulares, bastante visíveis em cortes de tecido processados pelo método da parafina.

Esta melhor qualidade de estruturas teciduais e celulares, redução no número de artefatos e preservação tecidual dos blocos incluídos em glicol metacrilato é conseguida pela somatória dos passos do processamento histológico, bem como das próprias características físico-químicas do material de inclusão. Sendo que a falta ou negligência de qualquer um dos passos pode levar a uma perda da qualidade final da imagem.

Esta alta qualidade de imagem sugere que o glicol metacrilato seja um material apropriado para inclusão de tecido subcutâneo de ratos com implantes de tubos de polietileno contendo cimentos endodônticos, assim como o é para outros tecidos; pois todos os procedimentos do método de inclusão em glicol metacrilato levam a uma preservação tecidual superior àquela proporcionada pelo método de inclusão em Parafina, resultando em uma melhor qualidade final da imagem histopatológica.

Contudo, é necessário salientar que este método de inclusão é uma alternativa a aquele de inclusão em parafina, haja vista, que a rotina da parafina é muito mais conhecida, acessível, barata e proporciona dados coerentes para uma análise que não exija uma qualidade mais refinada. O método que utiliza o glicol metacrilato é de grande valia para pesquisas científicas quando se deseje

ou se necessite de maior qualidade para identificação e contagem de células e análise mais detalhada dos tecidos.

É importante salientar que o glicol metacrilato é um material relativamente novo na microscopia de luz e que mais trabalhos devem ser feitos para aprimorar a sua utilização neste campo da histologia, para que tenham a capacidade de aumentar a resolução e o detalhamento tecidual nos estudos de histopatologia que necessitem destes refinamentos de técnica.

CONCLUSÕES

Deste trabalho obteve-se como conclusão geral que o método de inclusão em glicol metacrilato foi superior ao da parafina pois:

- 1- A qualidade de imagem das secções feitas a partir de blocos de tecidos incluídos em Glicol Metacrilato foi muito superior ao da Parafina;
- 2- Houve uma redução de artefatos quando o Glicol Metacrilato foi utilizado como material de inclusão;
- 3- Os detalhes celulares foram melhor identificados em Glicol Metacrilato que em Parafina.
- 4- Houve uma maior preservação tecidual com a Utilização do método de inclusão em Glicol Metacrilato.
- 5- A execução dos procedimentos histológicos do método de inclusão em Glicol Metacrilato foi muito semelhante ao da Parafina com algumas peculiaridades de cada técnica;

Desta forma pudemos constatar que o glicol metacriulato é um material alternativo par inclusão de tecido subcutâneo de ratos em estudo de biocompatibilidade de cimentos endodônticos

BIBLIOGRAFIA

- 1- ASHFORD, A.E.; ALLAWAY, W.G.; McCULLY, M.E. Low temperature embedding in glycol methacrylate for enzyme histochemistry in plant and animal tissues. **J. Histchem.Citochem.** v.20, n.12, p.986-90, May, 1972.
- 2- ASHLEY, C.A.; FEDER, N. Glycol methacrilate in histopatology. **Arch. Path.** V.81, p. 391-7, May, 1966.
- 3- BENNETT, H.S. et al. Science and art in preparing tissue embedding in plastic for lighth microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives and simple stain. **Stain Tech.** V.51, n.2, p.71-97, March, 1976.
- 4- BERBERT, C.C.V. Reação dos tecidos periapicais a sobreobturações com diferentes cimentos endodônticos em duas consistências histologia em dentes de cães. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba-Uniocamp.1996
- 5- BLACKMAN, R.; GROSS, M.; SELTZER, S. An evaluation of biocompatibility of a glass ionomer-silver cement in rat connective tissue. **J. Endod.** v.15, n.2, p.76-9, Feb., 1989.
- 6- BRATEL, L. et al. Effect of the root canal sealers on the immunocompetent cells in vitro and in vivo. **Int. Endod. J.** v.31, p.178-88, 1998.
- 7- BROWNE, R.M.; FRIEND, L.A. An investigation into the irritant properties of some root filings materials. **Arc. Oral Biol.** v.13, p. 1355-69, 1968.
- 8- CALLIS, P.D.; SANTINI, A. Tissue response to retrograde root filings in the ferret canine: A comparission of a glass ionomer cement and guta-percha with sealer. **O. Surg O. Med O.Pathol** v. 64, n.4, p.475-9, Oct., 1987.

- 9- COLE, M.B.; SYKES, S.M. Glycol methacrylate in light microscopy: a routine method for embedding and sectioning animal tissues. **Stain Tech.** V.49, n.6, p.387-400, 1974.
- 10- COSTA, C.A.S. et al. Estudo preliminar da compatibilidade biológica das resinas compostas prisma TPH e Herculite XR. Avaliação histológica de implantes subcutâneo em ratos. **Rev. Paulista Odontol.** n.3, p.10-4, Maio-Jun., 1997.
- 11- CRANE, D.L. et al. Biological and physical properties of an experimental root canal sealer without eugenol. **J. Endod.** v.6, n.2, p.438-45, Feb., 1980.
- 12- DE SOUZA, V. et al. Reaction of rat connective tissue to the implant of calcium hydroxide. **Rev. Fac. Odon. Araçatuba** v.6, n.1e2, p.69-76, 1977.
- 13- ECONOMIADES, N. et al. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. **J. Endod.** v.21, n.3, p.122-7, March, 1995.
- 14- FEDER, N.; O'BRIEN, T.P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **Amer. J. Bot.** V.55, n.1, p.123-42, Jan., 1968.
- 15- FLAX, M.H.; CAULFIELD, J.B. Use of methacrylate embedding in light microscopy. **Arch. Pathol.** V.74, p.387-95, Oct., 1962.
- 16- GOMES, B.P.F.A. An investigation into the root canal microflora. **PhD thesis.** University of Manchester, UK, 1995.
- 17- GOMES, B.P.F.A.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to the biomechanical procedures. **Int. Endod. J.** v.29, p.235-41, 1996.

- 18-GROSSMAN, L.I.; EDWARD, T.L. Assessment of irritation potential of essential oils for root canal cement. **J. Endod.** v.8, n.5, p.208-12, May, 1982.
- 19-GUTUSO, J. Histopathologic study of rat connective tissue response to endodontic material. **O. Surg O. Med O.Pathol** v. 16, n.6, p.713-27, June, 1963.
- 20-HARTY, F.J.; SANDOOZI, A.E. the status of standardised endodontic instruments. **J.Britsh. Endod. Soc.** V.6, p.57, 1972.
- 21- HOSHINO, M.; KOBAYASHI, H. The use of glycol methacrylate as an embedding medium for the histochemical demonstration of acid phosphatase activity. **J. Histchem.Citochem.** v.19, p.575-77, 1971
- 22-KETTERING, J.D.; TORABINEJAD, M. Cytotoxicity of root canal sealers: a study using HeLa cells and fibroblasts. **Int. Endod. J.** v.17, p.60-6, 1984.
- 23-KING, D.G.; KAMMLADE, N.; MURPHY, J. A simple method to help re-embed thick plastic sections. **Stain Tech.** V.57, n.5, p.307-10, 1982.
- 24-KOLOKURIS, I. et al. Experimental study of the biocompatibility of a new glass ionomer root canal sealer (Ketac-Endo). **J. Endod.** v.22, n.8, p.395-8, Aug, 1996.
- 25-LANGELAND, K.; OLSSON, B.; PASCON,A. Biological evaluation of Hydron **J. Endod.** v.7, n.5, p.196-204, May, 1981.
- 26-LEDUC, E.H.; BERNHARD, W. Recent modifications of glycol methacrylate embedding procedure. **J. Ultrast. Res.** V.19, p.196-9, Jan., 1967.
- 27-MITTAL, M.; CHANDRA, S.; CHANDRA, S. Comparative tissue evaluation of four endodontic sealer. **J. Endod.** v.21, n.12, p.622-4, Dec., 1995.

- 28-MOLLOY, D. et al. Comparative tissue tolerance of a new endodontic sealer.
O. Surg O. Med O.Pathol v.73, n.4, p.490-3, April, 1992.
- 29-MOOSAVI, H.; et al. Plastic-embedded human marrow biopsy specimens.
Arch. Pathol. Lab. Med. v.105, p.269-273, May, 1981.
- 30-MORSE, D.R. et al. A comparative tissue toxicity evaluation of guta-percha root canal sealers. Part I. six hour findings. **J. Endod.** v. 10, n.6, p.246-9, Oct., 1984.
- 31-MORSE, D.R. et al. A comparative tissue toxicity evaluation of the liquid components of guta-percha root canal sealers. **J. Endod.** v.7, n.12, p.545-50, Dec., 1981.
- 32-MURRAY, G.I.; EWEN, S.W.B. a novel method for optimum biopsy specimen preservation for histochemical and immunohistochemical analisys. **Am. J. Clin. Pathol.** V.95, n.2, p.131-6, Feb., 1989.
- 33-OGBORN, M.R.; SAREEN, S. Immunohistochemical detection of epidermal growth factor in glycol methacrylate embedded tissue. **Biotech. & Histochem.** V.70, n.4, p.202-4, 1995.
- 34-OLSSON, B.; SLIWKOWSKI, A.; KAARE, L. subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials **J. Endod.** v.7, n.8, p.355-69, Aug. 1981.
- 35-ORSTAVIK, K.D.; MIJÖR, I.A. Histopatoloy and x-ray microanalysis of the subcutaneous tissue response to endodontic sealers **J. Endod.** v.14, n.1, p.13-23, Jan., 1988.

- 36-PASCON, E.A. et al. Tissue reaction to endodontic materials: methods, criteria, assessment and observations. **O. Surg O. Med O.Pathol** v.72, n.2, p.222-37, Aug., 1991.
- 37-PHILLIPS, J.M. Rat connective tissue response to hollow polytilene tube implants. **J. Canad. Dent. Ass.** v.33, n.2, p.59-64, 1967.
- 38-PITT FORD, T.R. Relation between seal of root fillings and tissue response. **O. Surg O. Med O.Pathol.** v.55, n.3, p.241-4, March, 1983.
- 39-ROSENBERG,M.; BARTL, P.; LESKO, J. Water-soluble methacrylate as an embedding medium for the preparation of ultrathin sections. **J. Ultrast. Res.** V.4, p.289-330, May, 1960.
- 40-ROWE, A.H.R. Effect of root filling materials on the periapical tissues. **Br. Dent. J.** v.7, p.98-102, Feb., 1967.
- 41-SAFAVI, K.E. et al. An in vitro method for longitudinal evaluation of toxicity of endodontic sealers. **J. Endod.** v.15, n.10, p.484-6, Oct., 1989.
- 42-SCHWARTZ, D.A. et al. A modified Brown and Hopps stain for identification of gram-positive and gram-negative microorganisms in glycol methacrylate embedded tissues. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v.113, p.181-3, Feb., 1989.
- 43-SHIMOTSUMA, M.; SHOEFL, G.I. A method for embedding thin membranes in Histo-resin. **Biothec. Histochem.** V.67, n.6, p.377-9, 1992.
- 44-SIMS, B. A simple method of preparing 1-2 μ m sections large tissue blocks using glycol methacrylate. **J.Microsc.** v.101, pt 2, p.223-7, July, 1974.
- 45-SPANGBERG,L.; LANGELAND, K. Biological effects of dental materials. **O. Surg O. Med O.Pathol.** v.35, n.3, p.402-14, Mar, 1973.

- 46-TANZLLI, J.P.; NEUINS, A.J.; BORDEN, B.G. The reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implantsfilled with Hydron or guta-percha. **O. Surg O. Med O.Pathol.** v.55, n.5, p.507-13, May, 1983.
- 47-TORNEC, C.D. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. **O. Surg O. Med O.Pathol** v.21, n.3, p.379-87, Mar., 1966.
- 48-TORNEC, C.D. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. **O. Surg O. Med O.Pathol** v.24, n.5, p.674-83, Nov., 1967.
- 49-TURNER, K.W. Hematoxyliin toluidine blue-phloxinate staining of glycol methacrylate sections of retina and other tissues. **Stain Tech.** V.55, n.4, p.229-33, 1980.
- 50-VAN DE VELDE, S. Fluorescent microscopy of glycol methacrylate-embedded tissue. **Am. J. Clin. Pathol.** V.73, n.1, Jan., 1980.
- 51-ZAMBERNARD, J. et al. An adaptation of methacrylate embedding for routine histopathologic use. **Blood** v.33, n.3, March, 1969.
- 52-YEUNG, E.C.; LAW, S.K. Serial sectioning techniques for a modified LKB Histoiresin. **Stain Tech.** V.62, n.3, p.147-53, 1987.