

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E DA
BIOCOMPATIBILIDADE DE CIMENTOS
ORTODÔNTICOS MODIFICADOS POR
CLOREXIDINA**

Gêisa Aiane de Moraes Sampaio

SAPIENTIA AEDIFICAT

2015

GÊISA AIANE DE MORAIS SAMPAIO

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E DA
BIOCOMPATIBILIDADE DE CIMENTOS ORTODÔNTICOS
MODIFICADOS POR CLOREXIDINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Ciências Odontológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Lacerda dos Santos

João Pessoa

2015

S192a Sampaio, Gêisa Aiane de Moraes.
 Análise das propriedades mecânicas e da
 biocompatibilidade de cimentos ortodônticos modificados por
 clorexidina / Gêisa Aiane de Moraes Sampaio.- João Pessoa,
 2015.
 69f.
 Orientador: Rogério Lacerda dos Santos
 Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
 1. Odontologia. 2. Cimento de Ionômero de vidro.
 3. Clorexidina. 4. Propriedades mecânicas.
 5. Biocompatibilidade.

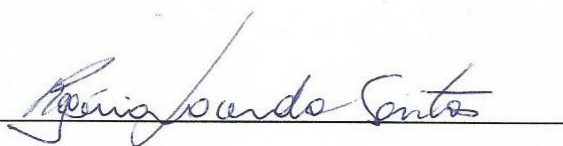
UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

GÊISA AIANE DE MORAIS SAMPAIO

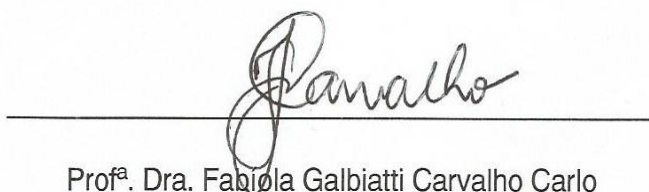
**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS E DA
BIOCOMPATIBILIDADE DE CIMENTOS ORTODÔNTICOS
MODIFICADOS POR CLOREXIDINA**

Banca Examinadora



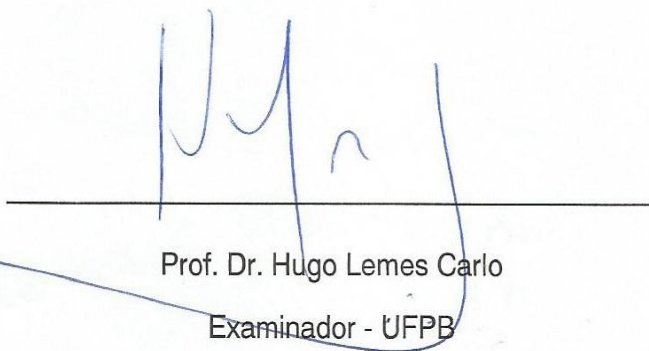
Prof. Dr. Rogério Lacerda dos Santos

Orientador - UFPB



Prof^a. Dra. Fabíola Galbiatti Carvalho Carlo

Examinador - UFPB



Prof. Dr. Hugo Lemes Carlo

Examinador - UFPB

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antônio e Lourdes, dedico esta e todas as minhas conquistas, pois sem o seu carinho, apoio e incentivo elas não seriam possíveis.

Ao meu sobrinho Anthony, que me proporciona a alegria que é ser tia.

A minha afilhada Lorrany Vitória.

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu senhor e melhor amigo, com quem divido todas as minhas alegrias, angústias e aflições, agradeço pelo dom da vida, pela minha família, por esta oportunidade, por ter abençoado meus caminhos e por me dá força e coragem para enfrentar os desafios cotidianos.

Aos meus pais, Antônio da Silva Sampaio e Maria Lourdes L. de Moraes Sampaio, por todo amor, carinho e dedicação, pela ótima educação que me deram, me ensinando a ser uma pessoa boa, íntegra e dedicada. Obrigado por sempre acreditarem em mim, por nunca terem medido esforços para que meus sonhos pudessem ser realizados, pelo incentivo e apoio nas horas de dificuldade.

Às minhas irmãs Geane e Girlândia, meus avós e toda a minha família, pelo amor, companheirismo, apoio incondicional e por estarem sempre torcendo por mim.

Ao meu noivo Allan Charles, que esteve ao meu lado durante a minha caminhada, pelo seu amor, carinho, apoio e compreensão, por escutar os meus lamentos nos momentos difíceis, por estar sempre ao meu lado e pelo incentivo aos meus projetos profissionais.

Ao meu orientador Rogério Lacerda, pela orientação deste e de outros trabalhos, por todo o conhecimento repassado, incentivo, paciência e dedicação. Pela confiança e por ter acreditado no meu potencial. És uma pessoa ímpar e meu maior exemplo de profissional dedicado e apaixonado pelo que faz, desejo que Deus continue abençoando você e sua família.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante o mestrado, em especial ao professor Hugo Lemes Carlo e as professoras Pollianna Muniz Alves e Fabíola Galbiatti Carvalho, pela contribuição acadêmica, competência, e dedicação.

Aos meus companheiros de turma, pelo apoio e companheirismo. Em especial Izaura Menezes, que me acompanhou durante a realização desse trabalho, muito obrigada pela ajuda, pela amizade e companheirismo. Isabella Medeiros, bem como a sua família, obrigada pela amizade sincera e pelo apoio na realização deste trabalho. Mirella Liberato e Maialla Liberato, muito obrigada pelo apoio e amizade.

Aos amigos do biotério do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, obrigada pelo apoio, dedicação, amizade e contribuição neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Histopatologia Oral do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, obrigada pela amizade, paciência, carinho e dedicação, além da contribuição neste trabalho, que Deus abençoe a todos.

A todos os amigos, que compartilharam da minha caminhada e àqueles que mesmo distantes torceram por mim.

Finalmente, a todos que fizeram parte desta etapa de minha vida, os meus mais sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

“Aquele que habita no abrigo do
Altíssimo e descansa à sombra do
Onipotente, pode dizer do Senhor:
Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a
minha fortaleza, e nele confiarei”.

Salmos 91:1,2

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar as propriedades mecânicas e a biocompatibilidade de CIVs ortodônticos com adição de digluconato de clorexidina (CX) em concentrações de 10% e 18%. Os materiais foram distribuídos em sete grupos (n=12): C (Controle, Polietileno), M (Meron Controle), M10 (Meron, CX10%), M18 (Meron, CX18%), KC (Ketac Cem Controle), KC10 (Ketac CX10%) e KC18 (Ketac CX18%). Para análise biológica foram utilizados 84 ratos Wistar machos, os cimentos foram inseridos no tecido subcutâneo dos ratos e as biópsias realizadas após 7, 15 e 30 dias. As amostras teciduais foram analisadas morfolologicamente quanto à presença de eventos celulares inflamatórios (infiltrado inflamatório, edema, necrose, tecido de granulação, células gigantes, fibroblastos jovens e fibras colágenas) e uma análise imuno-histoquímica (IH) quanto à quantidade de células CD68+. Análises de resistência à tração diametral (TD), compressão (RC) e resistência de união por cisalhamento (CS) foram realizadas através de uma máquina universal de ensaios. Após a realização do ensaio de resistência ao cisalhamento, a superfície vestibular de cada corpo de prova foi avaliada em lupa estereoscópica para a quantificação do Índice de Remanescente do Adesivo (IRA). A Microdureza Vickers foi realizada com carga de 200g ao longo de 15s. Para as avaliações morfológicas e imuno-histoquímica foram utilizados o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn ($P<0,05$). Na análise estatística das avaliações das propriedades mecânicas foi utilizada ANOVA *one-way* seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey ($P<0,05$). O estudo morfológico dos tecidos, apresentou infiltrado inflamatório com diferença significativa entre os grupos C e KC18, em 7 ($P=0,013$) e 15 ($P=0,032$) dias. O tecido de granulação demonstrou diferença significativa entre os grupos C e M18 ($P=0,029$), com 7 dias. As células gigantes (CG) demonstraram diferença entre os grupos C e M18, em 7 dias ($P=0,013$) e o grupo KC18 demonstrou menor quantidade de fibroblatos jovens ($P=0,031$) e fibras colágenas ($P=0,044$), em 7 dias. Na análise imuno-histoquímica, as CG apresentaram diferença significativa entre o Grupo M18 e os Grupos C, M10 e KC ($P=0,001$), em 7 dias, e entre KC18 e os demais grupos ($P=0,001$), em 30 dias. Macrófagos foram mais expressivos no período de tempo de 7 dias nos Grupos M18 e KC18, com diferença significativa com os outros grupos ($P=0,001$). O teste TD demonstrou diferença significativa entre todos os Grupos do cimento Meron ($P=0,001$) e entre o Grupo KC18 com os Grupos KC e KC10 ($P=0,001$). O teste RC demonstrou diferença

significativa entre todos os Grupos do cimento Meron ($P=0,001$), e entre o Grupo KC com os Grupos KC10 e KC18 ($P=0,001$). O teste CS não demonstrou diferença significativa entre os Grupos do cimento Meron ($P=0,385$), porém houve diferença entre o Grupo KC com os Grupos KC10 e KC18 ($P=0,001$). A adição de clorexidina modificou de forma negativa as propriedades mecânicas de resistência à tração diametral e resistência à compressão. A análise de histocompatibilidade evidenciou que a intensidade das alterações histológicas nos cimentos com CX demonstraram ser concentração-dependente, notoriamente a 18%. O cimento Meron-CX-10% foi o que apresentou os melhores resultados de biocompatibilidade e o Ketac-CX-18% influenciou mais no processo inflamatório com uma reparação tecidual mais lenta.

Palavras-chave: Cimento de Ionômero de Vidro, Clorexidina, Propriedades Mecânicas, Biocompatibilidade.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the mechanical properties and biocompatibility of orthodontic GICs with the addition of chlorhexidine digluconate (CX) in 10% and 18% concentrations. The materials were divided into seven groups ($n = 12$): C (control, Polyethylene), M (Meron Control), M10 (Meron, CX10%), M18 (Meron, CX18%), KC (Ketac Cem Control), KC10 (Ketac CX10%) and KC18 (Ketac CX18%). For biological analysis were used 84 Wistar rats, the cements were inserted into the subcutaneous tissue of rats and biopsies taken after 7, 15 and 30 days. Tissue samples were analyzed morphologically for the presence of inflammatory cellular events (inflammatory infiltrate, edema, necrosis, granulation tissue, giant cells, young fibroblasts and collagen fibers) and immunohistochemical analysis (IH) as the amount of CD68+ cells. Resistance analyzes the diametrical traction (DT), compression (CR) and Shear Bond Strength (SBS) were performed through an universal machine. After completion of the shear strength test, the labial surface of each specimen was evaluated in stereoscopic magnifying glass to quantify the Remnant Index Sticker (RIS). Vickers Microhardness tests were performed using 200g load over 15s. For the morphological and immunohistochemical evaluations were used the nonparametric Kruskal-Wallis and Dunn's test ($P < 0.05$). For evaluation of mechanical properties was used one-way ANOVA followed by multiple comparison test of Tukey ($P < 0.05$). The morphological study of tissues, had inflammatory infiltrated with significant difference between the groups C and KC18 at 7 ($P = 0.013$) and 15 ($P = 0.032$) days. Granulation tissue showed a significant difference between the groups C and M18 ($P = 0.029$), with 7 days. Giant cells (GC) showed differences between the groups C and M18 at 7 days ($P = 0.013$), and KC18 group showed smaller number of young fibroblasts ($P = 0.031$) and collagen fibers ($P = 0.044$) at 7 days. In immunohistochemical analysis, the CG showed significant difference between the M18 group and Groups C, M10 and KC ($P = 0.001$) at 7 days, and between KC18 and the other groups ($P = 0.001$) at 30 days. Macrophages were more expressive in the time period of 7 days in the Groups M18 and KC18, with significant differences with groups M, M10, KC, KC10 and control ($P = 0.001$). TD test showed significant difference between all groups of Meron cement ($P = 0.001$) and between Group KC with groups KC10 and KC18

($P=0.001$). The CS test showed no significant difference between the cement Groups of Meron cement ($P=0.385$), but there was difference between the KC Group with KC10 and KC18 groups ($P=0.001$). The addition of chlorhexidine modified negatively the mechanical properties of diametral tensile strength, and compressive strength. The histocompatibility analysis showed that the intensity of histological changes in the cements with CX shown to be concentration-dependent, notably 18%. The Meron-CX-10% cement showed the best results of biocompatibility and Ketac-CX-18% more influence in the inflammatory process with a slower tissue repair

Keywords: Glass Ionomer Cement, Chlorhexidine, Mechanical Properties, Biocompatibility

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Cimentação de bandas ortodônticas	16
2.2 Cimento de ionômero de vidro	17
2.3 Adição de clorexidina ao CIV	18
2.4 Efeitos da clorexidina nas propriedades mecânicas de CIVs	20
2.5 Testes de biocompatibilidade	21
2.6 Métodos de avaliação da biocompatibilidade	23
2.6.1 Avaliação da resposta inflamatória	23
2.6.2 Avaliação imuno-histoquímica	24
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Caracterização do estudo	27
4.2 Local do estudo	27
4.3 Considerações éticas	28
4.4 Manipulação dos cimentos	28
4.5 População e amostra	28
4.5.1 Grupos experimentais	28
4.5.2 Estudos das propriedades mecânicas	28
4.5.3 Estudo laboratorial <i>in vivo</i>	30
4.5.4 Critérios de inclusão e exclusão	31
4.6 Testes de tração diametral e de resistência a compressão	32
4.7 Análise da microdureza	33
4.8 Teste de resistência ao cisalhamento	33
4.9 Estudo laboratorial <i>in vivo</i>	34
4.10 Estudo morfológico	35
4.11 Estudo imuno-histoquímico	36
4.11.1 Método imuno-histoquímico	36
4.11.2 Análise imuno-histoquímica	37
4.12 Análise estatística	38
5 RESULTADOS	39

5.1 Teste de tração diametral	39
5.2 Teste de resistência a compressão	39
5.3 Análise da microdureza	40
5.4 Teste de resistência ao cisalhamento	41
5.5 Estudo morfológico	42
5.6 Análise imuno-histoquímico	47
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO 1 – Protocolo utilizado para confecção de lâminas para análise imuno-histoquímica	67
ANEXO 2 – Carta aceite do Comitê de Ética em Pesquisa	69

1 INTRODUÇÃO

As bandas ortodônticas auxiliam no suporte do aparelho fixo e desempenham um importante papel na terapia ortodôntica convencional. A cimentação de bandas em dentes posteriores é necessária para melhorar a ancoragem e a retenção dos aparelhos fixos (SFONDRINE et al., 2010; ENAM et al., 2013). Porém, a desmineralização do esmalte adjacente às bandas e bráquetes de pacientes com tratamento ortodôntico, é uma grande preocupação para os ortodontistas, especialmente em pacientes com má higiene oral (KASHANI et al., 2012).

Nas últimas décadas, os cimentos de ionômero de vidro (CIV) estão sendo muito utilizados para a cimentação de bandas ortodônticas devido as suas várias propriedades clínicas, como a liberação de flúor e adesão a estrutura dental (TAKAHASHI et al., 2006; UYSAL et al., 2010; DU et al., 2012; HUANG et al., 2012; SANTOS et al., 2014; MARTI et al., 2014a). Com o advento do CIV para a cimentação de bandas, os índices de cárie e doença periodontal em pacientes ortodônticos diminuíram consideravelmente devido à menor quantidade de micro-infiltrações e sua liberação de flúor (FARRET et al., 2011a).

Entretanto, a fim de melhorar as propriedades antibacterianas desse material, a clorexidina tem sido adicionada a sua composição de modo a contribuir para a diminuição no número de bactérias próximas ao material. (TAKAHASHI et al., 2006; TURKUN et al., 2008; CASTILHO et al., 2013; MARTI et al., 2014a). A atividade antibacteriana da clorexidina contra algumas espécies de bactérias encontradas na cavidade oral é conhecida (LESSA et al., 2010; MONTEIRO et al., 2011; AHLUWALIA et al., 2012; DU et al., 2012). Além disso, vários estudos mostram que a incorporação de clorexidina aos CIVs tem a capacidade de aumentar significativamente a propriedade antibacteriana do material (SANDERS et al., 2002; PALMER et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2006; FRENCKEN et al., 2007; HOSZEK & ERICSON, 2008; FARRET et al., 2011a; TUZUNER et al., 2011; DU et al., 2012; HUANG et al., 2012; LEWINSTEIN et al., 2012; CASTILHO et al., 2013; KORKMAZ et al., 2013; MARTI et al., 2014a).

Soluções de 0,2% a 2,5% de digluconato de clorexidina foram incorporadas ao líquido de CIVs restauradores durante sua manipulação, e um

efeito antimicrobiano significativo contra *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Actinomyces viscosus* foi encontrado para os cimentos com soluções de clorexidina em concentrações maiores que 1,0% (TURKUN et al., 2008; CASTILHO et al., 2013; MARTI et al., 2014a). Quanto adição de clorexidina em CIV para cimentação ortodôntica, Farret et al. (2011a) sugeriram a incorporação de soluções de digluconato de clorexidina nas concentrações de 10% e 18% no líquido de CIV durante sua manipulação, e encontraram um efeito antimicrobiano significativo contra *Streptococcus mutans*.

Juntamente com o efeito antibacteriano, as propriedades mecânicas dos CIVs também são muito importantes para o sucesso clínico durante o tratamento ortodôntico (FARRET et al., 2011a). Entretanto, a incorporação de agentes antibacterianos nestes cimentos pode resultar em mudanças nas suas propriedades físicas e biológicas (TURKUN et al., 2008; CASTILHO et al., 2013). Além disso, a concentração do agente antibacteriano adicionado ao cimento tem um papel crucial no desempenho mecânico dos CIVs (TUZUNER et al., 2011). Por esse motivo, estudos foram feitos com o intuito de analisar as propriedades físicas dos CIVs contendo diferentes concentrações de clorexidina (SANDERS et al., 2002; TURKUN et al., 2008; FARRET et al., 2011a; TUNZUNER et al., 2011; AHLUWALIA et al., 2012; LEWINSTEIN et al., 2012; DURSUN et al., 2013; CASTILHO et al., 2013).

O primeiro nível de testes dentro da avaliação de biocompatibilidade é a determinação da citotoxicidade *in vitro* (ISO 10993-5, 2-7) que fornece informações a respeito da segurança do material estudado. Porém o uso de animais em pesquisas de biocompatibilidade permite uma maior riqueza de respostas sobre a ação do material sobre os tecidos (SEHNEM et al., 2012).

Em geral, os CIVs são considerados materiais biocompatíveis, porém a adição de agentes antimicrobianos pode modificar também as suas propriedades biológicas (TURKUN et al., 2008), uma vez que a clorexidina tem demonstrado um alto efeito citotóxico em cultura de células odontoblásticas (LESSA et al., 2010) e uma indução de reação inflamatória aguda intensa em tecido subcutâneo de ratos (MONTEIRO et al., 2011).

A análise da resposta inflamatória nos testes de biocompatibilidade de materiais geralmente é realizada por métodos histológicos, onde uma reação inflamatória mais intensa é observada na presença de materiais menos

compatíveis (MONTEIRO et al., 2011; SANTOS et al., 2014). A quantificação de macrófagos recrutados é considerada uma boa avaliação da intensidade da resposta inflamatória decorrente da ação dos biomateriais (ZHOU et al., 2011; IBRAGUIMOV et al., 2012), entretanto critérios quantitativos precisos dificilmente podem ser definidos através de análises morfológicas (MANOLEA et al., 2009; ZHOU et al., 2011). A imuno-histoquímica é um método que se destaca pela possibilidade de oferecer análises quantitativas de estruturas identificáveis, tornando-se uma importante ferramenta na prática anátomo-patológica (MANOLEA et al., 2009).

Diante do exposto, observa-se a importância de análises das propriedades físicas e das avaliações morfológicas e imuno-histoquímicas da biocompatibilidade dos cimentos ortodônticos de ionômeros de vidro modificados por clorexidina, uma vez que estes materiais são uma boa alternativa para a utilização rotineira na clínica odontológica e ortodôntica.

O objetivo do estudo foi, portanto, analisar as propriedades mecânicas e a biocompatibilidade de CIVs utilizados na cimentação de bandas ortodônticas, com adição de digluconato de clorexidina (CX) em concentrações de 10% e 18%.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CIMENTAÇÃO DE BANDAS ORTODÔNTICAS

A terapia ortodôntica utiliza vários acessórios como bráquetes, anéis e fios, para a aplicação de forças sobre os dentes, a fim de se obter movimentação ortodôntica e a correção de diversas maloclusões (FARRET et al., 2009). Dentre os principais componentes utilizados nessa terapia, as bandas ortodônticas constituem elementos de suporte ao aparelho fixo e desempenham um importante papel na terapia ortodôntica convencional (SFONDRINE et al., 2010).

As bandas ortodônticas são confeccionadas a partir de lâminas metálicas de espessura variável, adaptadas e cimentadas à coroa dental de molares e pré-molares. Nelas são soldados acessórios que recebem fios ortodônticos ou outros dispositivos, que, ao formarem um conjunto mecânico, são capazes de liberar forças armazenadas e promover a movimentação dos dentes (FERREIRA et al., 2013).

A cimentação de bandas ortodônticas inicialmente era realizada com cimento de fosfato de zinco, no entanto este material apresentava somente união mecânica ao esmalte e ao metal e apresentava ainda alta solubilidade no meio bucal. Com o surgimento dos CIVs, eles passaram a ser empregados para a cimentação ortodôntica, pois apresentavam várias características desejáveis como união química ao esmalte e ao aço inoxidável, biocompatibilidade e liberação e absorção contínua de flúor (FARRET et al., 2009).

Estas características tornam-se muito importante para fornecer uma resistência de união adequada entre o dente e banda e para reduzir a incidência de cáries e doenças periodontais em pacientes ortodônticos (FARRET et al., 2012), uma vez que, devido a grande quantidade de dispositivos e de sítios de acúmulo de biofilme, muitos pacientes apresentam dificuldade de higienização e a proliferação bacteriana se torna motivo de preocupação para Ortodontistas, principalmente nas regiões de anéis ortodônticos em dentes posteriores (CACCIAFESTA et al., 2006).

2.2 CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO

O cimento de ionômero de vidro (CIV) foi desenvolvido e patenteado no final da década de 1960 por Alan Wilson e colaboradores como uma alternativa para substituição dos cimentos de silicato (WILSON & BATCHELOR, 1967; WILSON & KENT, 1971). O ácido fosfórico foi então substituído por um ácido orgânico menos agressivo, o ácido poliacrílico, que também era utilizado nos cimentos de policarboxilato de zinco (ATKINSON et al., 1985).

Os CIVs são compostos de um pó de vidro íon lixiviável e um políácido líquido que são misturados em uma proporção pré-determinada. O pó é preparado a partir de um vidro de alumínio e silicato e serve como fonte de íons para as reações do cimento (BAIG et al., 2015).

Embora os primeiros CIVs tivessem propriedades físicas pobres, as suas propriedades de adesão à estrutura dental e liberação de íons fluoreto asseguraram a sua popularidade e incentivaram o desenvolvimento de CIVs com propriedades físicas melhores (SHARID et al., 2014). Atualmente, uma grande variedade comercial de CIVs estão disponíveis para o cirurgião dentista. Devido a variações na proporção pó/líquido e na viscosidade do material, os CIVs possuem várias aplicações clínicas, como agentes de cimentação, bases cavitárias, restauração de dentes anteriores e posteriores, entre outras (BAIG et al., 2015).

Algumas desvantagens dos CIVs convencionais que podem comprometer seu desempenho mecânico, como a susceptibilidade à umidade durante a reação de presa inicial, motivaram o desenvolvimento dos cimentos de ionômero de vidro modificados por resina (CIVMR), que tem a reação de geleificação ácido-base complementada por uma reação física pela adição de monômeros resinosos, reduzindo o tempo do processo e consequentemente a exposição à umidade (FARRET et al., 2012).

Considera-se que as propriedades cariostáticas do CIV se devem principalmente à incorporação na estrutura dental do fluoreto libertado pelo cimento, a remineralização dentária, tornando-a mais resistente ao ataque ácido bacteriano (NAKAJO et. al, 2009; MOURA et. al, 2006). A liberação de flúor a partir desses materiais restauradores durante a formação do biofilme permite que o cimento desempenhe um papel importante na diminuição da virulência de

biofilmes cariogênicos e subsequente formação de cáries secundárias (CHAU et al., 2015).

Efeitos antimicrobianos também têm sido encontrados nos CIVs (KLA et. al., 2014). Este potencial antimicrobiano ocorre devido ao efeito inibitório, em curto prazo, que os CIVs possuem sobre a queda do pH e a taxa de produção de ácidos por estreptococos orais (NAKAJO et. al, 2009). Outra propriedade importante dos CIVs é a sua biocompatibilidade, os mesmos têm se mostrado biocompatíveis em tecido subcutâneo de ratos (SANTOS et al., 2014), bem como, em fibroblastos gengivais humanos (RODRIGUEZ et al., 2013).

2.3 ADIÇÃO DE CLOREXIDINA AO CIV

O digluconato de clorexidina é um anti-séptico químico, com ação antifúngica e bactericida, utilizado em uma variedade de aplicações clínicas, devido à sua eficácia de amplo espectro que inclui bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas, bactérias não formadoras de esporos, leveduras e vírus (AFONSO et al., 2013; EDIMISTON et al., 2013).

A clorexidina está comercialmente disponível em uma variedade de concentrações e apresentações (AFONSO et al., 2013). Em baixas concentrações, o agente exerce um efeito bacteriostático, causando uma alteração do equilíbrio osmótico da célula bacteriana, resultando na inibição do crescimento. Em concentrações elevadas, o agente é um bactericida rápido, como resultado da precipitação do conteúdo citoplasmático da célula bacteriana (EDIMISTON et al., 2013)

O efeito antimicrobiano da clorexidina ocorre por meio da atração e a adsorção de moléculas catiônicas para a superfície das células, promovendo alteração na permeabilidade da membrana celular, resultando em perda de componentes intracelulares, desequilíbrio osmótico e consequente morte celular (RIBEIRO et. al, 2007; CHEUNG et. al, 2012; BONEZ et al., 2013). Ela também inibe a ação da enzima glicosiltransferase, responsável pelo acúmulo de bactérias na superfície dental e tem efeitos sobre o transporte de açúcar e produção de ácido pelas bactérias (RIBEIRO et. al, 2007). Além disso, a propensão para ligar-se à superfície dos tecidos oferece um efeito antimicrobiano de longa duração (CHEUNG et. al, 2012).

Na odontologia, ela foi utilizada pela primeira vez como um componente de colutórios bucais para bochechos e posteriormente foi incorporada a dentifrícios (FRENCKEN et al., 2007). Atualmente é amplamente utilizada na odontologia, devido a sua atividade antibacteriana contra várias espécies de bactérias encontradas na cavidade oral (LESSA et al., 2010; MONTEIRO et al., 2011; AHLUWALIA et al., 2012; DU et al., 2012), a mesma tem sido adicionada a composição dos CIVs, a fim de melhorar suas propriedades antibacterianas, uma vez que a liberação contínua de clorexidina contribui para a diminuição no número de bactérias próximas ao material (TAKAHASHI et al., 2006, AHLUWALIA et al., 2012; TURKUN et al., 2008; HOOK et al., 2014; MARTI et al., 2014a; CASTILHO et al., 2013). Ela pode ser facilmente incorporada ao cimento e sua liberação ocorre mesmo em baixas concentrações, porém ela é significativamente maior em concentrações maiores de clorexidina (PALMER et al., 2004).

A clorexidina pode ser usada em associação com CIV nas formas de digluconato (líquido) ou diacetato (pó). Vários estudos evidenciam que essa incorporação de clorexidina aos CIVs tem a capacidade de aumentar significativamente as propriedades antibacterianas do material (SANDERS et al., 2002; PALMER et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2006; FRENCKEN et al., 2007; HOSZEK & ERICSON, 2008; FARRET et al., 2011a; TUZUNER et al., 2011; DU et al., 2012; HUANG et al., 2012; LEWINSTEIN et al., 2012; CASTILHO et al., 2013; KORKMAZ et al., 2013; MARTI et al., 2014a)

A adição de clorexidina em concentrações acima de 2%, tem demonstrado resultados positivos em CIVs utilizados em tratamento restaurador atraumático (TRA) (MARTI et al., 2014a), em CIV para forramento, aplicado em dentina remanescente após o tratamento pulpar indireto (CASTILHO et al., 2013) e em CIVs utilizados para restauração de dentes posteriores (DU et al., 2012).

Na ortodontia, a desmineralização do esmalte adjacente às bandas e bráquetes de pacientes com tratamento ortodôntico é uma grande preocupação, especialmente em pacientes com má higiene oral (KASHANI et al., 2012). No entanto, tem se adicionado agentes antimicrobianos à composição de CIVs utilizados na cimentação ortodôntica, com o intuito de contribuir para a diminuição da formação de biofilme adjacente aos acessórios ortodônticos (FARRET et al., 2011b). Sugere-se a adição de uma solução com um mínimo de 10% de

clorexidina e ácido tartárico à 10% para que o líquido utilizado na manipulação do cimento contenha uma concentração final de 5% de clorexidina. E uma concentração máxima de 18%, pois o reagente apresenta-se em estado líquido com concentração máxima de 18%. A adição de soluções de digluconato de clorexidina nas concentrações de 10% e 18% ao líquido de CIVs ortodônticos demonstrou um efeito antimicrobiano significativo contra *S. mutans* (FARRET et al., 2011a).

2.4 EFEITOS DA CLOREXIDINA NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE CIVs

Através da análise das propriedades mecânicas de diferentes materiais dentários, pode-se inferir que material está mais adequado para executar funções clínicas, resistindo às forças mastigatórias, desgaste e aplicação de forças ortodônticas (FARRET et al., 2012). Embora a baixa resistência mecânica de alguns CIVs convencionais seja uma limitação para a utilização do material, já são desenvolvidos CIVs com propriedades físicas melhoradas, como uma manipulação mais fácil e mais rápida e uma maior viscosidade do produto (BECCI et al., 2014).

Apesar da adição de clorexidina aos CIVs ter uma ação antimicrobiana comprovada contra o *S. mutans* (DU et al., 2012; CASTILHO et al., 2013; MARTI et al., 2014a), são necessárias análises das propriedades físicas desses cimentos, para que não ocorra o comprometimento das suas principais características (TUZUNER et al., 2011). Uma vez que, dependendo da concentração utilizada, a incorporação de agentes antibacterianos em CIVs pode afetar a sua micro-estrutura e resultar em alterações nas suas propriedades físicas (DEEPALAKSHMI et al., 2010; MARTI et al., 2014b; BECCI et al., 2014).

Por esse motivo, alguns estudos foram realizados com o intuito de avaliar as propriedades físicas de CIVs restauradores contendo digluconato de clorexidina em diferentes concentrações (CASTILHO et al., 2013; DURSUN et al., 2013; MARTI et al., 2014a; MARTI et al., 2014b).

A microdureza, a resistência à tração, o tempo de presa, a porosidade e a resistência à compressão, de CIVs utilizados em tratamento restaurador atraumático (TRA) contendo digluconato de clorexidina nas concentrações de

0,5%, 1% e 2%, foram analisados e pôde-se observar que a atividade antibacteriana foi aumentada e as propriedades físicas do material mantiveram-se inalteradas (MARTI et al., 2014a; MARTI et al., 2014b). A resistência de união de um CIV para forramento, com clorexidina nas concentrações de 0,5% e 1%, também não foi afetada (BECCI et al., 2013) bem como, as propriedades de resistência à tração e à compressão, em um CIV com concentrações de até 2,5% de gluconato de clorexidina (CASTILHO et al., 2013).

Com relação à adição de clorexidina aos cimentos ortodônticos, a capacidade de retenção, o local predominante de falha da banda, a quantidade de cimento remanescente no dente após a remoção das bandas e o tempo de sobrevivência de bandas cimentadas com um CIV contendo digluconato de clorexidina a 10% foram comparadas a um CIV convencional, e verificou-se que o CIV modificado por clorexidina pode ter desempenho clínico comparável ao CIV convencional para a cimentação de bandas ortodônticas (MILLET et al., 2005).

A análise da resistência à compressão, resistência à tração diametral e microdureza são essenciais para verificação e comparação das propriedades mecânicas de diferentes materiais dentários. Além disso, sempre que possível, é interessante associar um teste, como resistência ao cisalhamento, para simular o tratamento ortodôntico e para verificar o desempenho de um material sob condições semelhantes ao ambiente bucal (FARRET et al., 2009).

As propriedades de microdureza, resistência à tração diametral, compressão e o cisalhamento de CIVs ortodônticos contendo digluconato de clorexidina nas concentrações de 10 e 18% também foram avaliadas e observou-se que a adição de clorexidina não modificou negativamente as propriedades físicas dos cimentos (FARRET et. al, 2011a). No entanto, torna-se necessária a realização de testes para a análise da biocompatibilidade de CIV modificados por digluconato de clorexidina utilizados para cimentação ortodôntica.

2.5 TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE

O fator mais importante que distingue um biomaterial de qualquer outro material é a sua capacidade de ser inerte em contato com os tecidos do corpo humano sem causar um grau inaceitável de dano a esse organismo (WILLIAMS, 2008). A biocompatibilidade refere-se à capacidade de um biomaterial de

executar a sua função no que diz respeito a uma terapia odontológica, sem provocar quaisquer efeitos indesejáveis, locais ou sistêmicos, ao beneficiário da terapia (GONÇALVES et al., 2014).

Atualmente, vários testes *in vitro* de cultura de células podem ser usados a fim de avaliar a citotoxicidade de materiais dentários (GONÇALVES et al., 2014). Entretanto, os testes de citotoxicidade com base em células aplicadas à superfície de biomateriais ativos são limitados, uma vez que os dados de tais estudos devem ser objeto de uma interpretação cuidadosa (HATTON et al., 2006). Isto nos alerta sobre a necessidade da correlação de testes laboratoriais *in vitro* com os testes *in vivo*, a fim de fornecer uma análise mais crítica em relação à biocompatibilidade (ZHOU et al., 2011; IZ et al., 2013).

Estudos em tecido subcutâneo de ratos tem sido o método mais comumente utilizado para testes de avaliação da biocompatibilidade dos biomateriais *in vivo*, esses animais são muito utilizados pelo fato de serem mamíferos de manuseio fácil e seguro, além de possuírem um metabolismo mais acelerado quando comparado a outros animais, o que permite obter resultados relevantes em um curto período de tempo (GARCIA et al., 2010; SANTOS et al., 2014). Embora essa metodologia não reproduza com fidedignidade as condições bucais, ela fornece informações preliminares sobre as propriedades biológicas dos materiais (BOAVENTURA et al., 2012).

Devido ao seu amplo espectro de atividade contra micro-organismos presentes na cavidade oral, o digluconato de clorexidina tem sido utilizado em uma variedade de procedimentos odontológicos, como tratamentos periodontais, irrigação intracanal e limpeza de cavidade (LESSA et al., 2010; MONTEIRO et al., 2011). No entanto, efeitos de toxicidade têm sido relacionados à clorexidina, em cultura de células odontoblásticas (SOUZA et al., 2007; LESSA et al., 2010) e em tecido subcutâneo de ratos (MONTEIRO et al., 2011).

Esse efeito tóxico é constituído pela indução de morte celular apoptótica e autofágica / necróticas e pela perturbação da função mitocondrial, aumento de Ca^{2+} intracelular e estresse oxidativo (GIANNELLI et al., 2012). O potencial citotóxico da clorexidina também pode ser relacionado à sua concentração e ao tempo de exposição do tecido (SOUZA et al., 2007). Uma avaliação da biocompatibilidade de chips de clorexidina (utilizados em tratamentos periodontais) implantados em tecido subcutâneo de ratos, mostrou

que os mesmos induziram uma intensa resposta inflamatória aguda no tecido e, portanto, não foram biocompatíveis (MONTEIRO et al., 2011).

A adição de 1% de diacetato de clorexidina a um CIV restaurador reduziu significativamente a viabilidade de fibroblastos L929 de camundongo (IZ et al., 2013). Presume-se que isso ocorra devido à liberação de clorexidina do CIV para o meio de cultura de células. Porém, devido às limitações dos testes *in vitro*, torna-se necessário realizar testes de biocompatibilidade *in vivo* de CIV contendo clorexidina, de forma a complementar os dados encontrados nos testes de citotoxicidade.

2.6 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE

2.6.1 Avaliação da resposta inflamatória

A inflamação é uma resposta fisiopatológica decorrente de fatores químicos, físicos ou biológicos; dentre estes, os biomateriais podem ser considerados agentes químicos capazes de desencadear reações inflamatórias e imunológicas nos tecidos circunjacentes (IBRAGUIMOV et al., 2012).

No momento em que o agente químico é detectado, algumas células inflamatórias, denominadas neutrófilos, migram para o tecido inflamado e através de quimiocinas inflamatórias liberadas, emitem sinais para o recrutamento de monócitos para os tecidos circundantes e em direção a superfície dos biomateriais (IBRAGUIMOV et al., 2012). Os monócitos, ao migrarem pela circulação e extravasarem para o tecido, se diferenciam em macrófagos (MO) ou em células dendríticas, os quais são responsáveis por potencializar a resposta pró-inflamatória (MURRAY et al., 2012). Os MO atuam na apresentação de antígenos, fagocitose de restos celulares e recrutamento de outros tipos de células, tais como fibroblastos (IBRAGUIMOV et al., 2012).

Os macrófagos, individualmente, são capazes de fagocitar partículas com um tamanho de até 5 μm . Se o tamanho das partículas é maior, os macrófagos se aglutinam para formar as células gigantes. Os macrófagos desempenham também um papel crítico na cicatrização de feridas e na regeneração do tecido. A fagocitose de detritos da ferida, a liberação de enzimas importantes para a reorganização do tecido e de citocinas e fatores de

crescimento, que induzem a migração e proliferação de fibroblastos, são mediados por macrófagos e constituem os passos iniciais para a regeneração de tecidos (FRANZ et al., 2011).

A análise da resposta inflamatória nos testes de biocompatibilidade é comumente realizada por métodos histológicos, nos quais uma reação inflamatória mais intensa é observada na presença de materiais irritantes ou menos compatíveis (BOAVENTURA et al., 2012).

2.6.2 Avaliação Imuno-histoquímica

A quantificação dos macrófagos recrutados é uma forma de avaliação da intensidade da resposta inflamatória decorrente da ação dos biomateriais, uma vez que essas reações são caracterizadas por um acúmulo substancial de fagócitos (ZHOU et al., 2011; IBRAGUIMOV et al., 2012). Porém, embora os elevados níveis de macrófagos presentes na inflamação sejam tipicamente observados através de análises histológicas, critérios quantitativos precisos dificilmente podem ser definidos por esse método. (MANOLEA et al., 2009; ZHOU et al., 2011).

A imuno-histoquímica é um método que se destaca pela possibilidade de oferecer análises quantitativas de estruturas identificáveis (MANOLEA et al., 2009). Essa técnica é utilizada na busca de antígenos em células ou tecidos, que vão desde aminoácidos e proteínas até agentes infecciosos e populações específicas (MATOS et al., 2010). Esse método é uma ferramenta valiosa para a identificação e visualização de antígenos de tecidos na pesquisa biológica e diagnósticos clínicos, uma vez que ela pode caracterizar vários processos biológicos ou patológicos, tais como cicatrização de feridas, a resposta imune, rejeição de tecidos, e interações entre o tecido e o biomaterial (AIKAWA, 2011).

A imuno-histoquímica abrange muitos métodos usados para determinar constituintes teciduais (os antígenos) com o emprego de anticorpos específicos. Os métodos que utilizam enzimas como substâncias propiciadoras da visualização do antígeno são os mais utilizados atualmente, pois permitem a visualização em microscópio ótico comum e possuem como principal vantagem à visualização da estrutura geral do tecido em simultâneo com a marcação imuno-histoquímica. (MATOS et al., 2010).

Reações antígeno-anticorpo específicas podem localizar moléculas-chave (por exemplo, citocinas, enzimas, fatores de transcrição) associadas com cada processo dentro dos tecidos (AIKAWA, 2011). O antígeno CD68 é uma glicoproteína com um peso molecular de 110kDa, expresso principalmente como uma molécula intracitoplasmática associado com grânulos lisossomais. Por isso o anti-CD68 é considerado como um marcador seletivo para monócitos e macrófagos e, portanto, comumente utilizado em estudos de patologia humana (MANOLEA et al., 2009). O anti-CD68 pode, assim, ser considerado um importante indicador da intensidade da resposta inflamatória decorrente de biomateriais, uma vez que expressa fortemente os macrófagos presentes nesse tipo de reação (YAMANAKA et al., 2011)

Estudos que avaliam a biocompatibilidade de materiais ortodônticos através de técnica imuno-histoquímica ainda são escassos na literatura. Isso demonstra a importância de uma análise imuno-histoquímica da biocompatibilidade de CIVs ortodônticos contendo digluconato de clorexidina.

3 PROPOSIÇÃO

Diante do exposto, este estudo se propôs a realizar uma análise das propriedades mecânicas de microdureza, resistência à tração diametral, resistência à compressão e resistência de união ao cisalhamento, bem como as características de biocompatibilidade, através de análises morfológica e imuno-histoquímica, de CIVs ortodônticos com adição de digluconato de clorexidina nas concentrações de 10% e 18%, como forma de averiguação de uma possível utilização desse material na clínica odontológica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

A primeira etapa do estudo caracteriza-se como um estudo laboratorial *in vitro*, consistindo em uma avaliação das propriedades mecânicas de resistência a tração, compressão, cisalhamento e microdureza de cimentos ortodônticos contendo soluções de clorexidina nas concentrações de 10% e 18%.

A segunda etapa caracteriza-se como um estudo laboratorial *in vivo*, consistindo em uma avaliação morfológica e imuno-histoquímica da biocompatibilidade de cimentos ortodônticos contendo soluções de digluconato de clorexidina nas concentrações de 10% e 18% em tecido subcutâneo de ratos, através de uma análise descritiva quantitativa e comparativa entre os grupos.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

A avaliação das propriedades mecânicas de resistência à tração, compressão, cisalhamento e microdureza, foram realizadas no Laboratório de Solidificação Rápida do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e no Laboratório Integrado de Biomateriais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa – PB

O estudo *in vivo* foi realizado no biotério da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas (UACB) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos-PB, onde foi realizada a seleção dos animais, a inserção dos materiais no tecido subcutâneo, o acompanhamento durante o período previamente estabelecido, a biópsia do tecido a ser avaliado e o sacrifício dos ratos.

Os estudos morfológico e imuno-histoquímico dos tecidos foram realizados no Laboratório de Histopatologia Oral do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande – PB.

4.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O experimento animal foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa Animal da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Campina Grande, UACB\UFCG, protocolo CEP/082011 (Anexo 2).

4.4 MANIPULAÇÃO DOS CIMENTOS

Foram testados dois CIVs utilizados para cimentação de bandas ortodônticas, Meron (VOCO, Cuxhaven, Alemanha) e Ketac Cem (3M/ESPE, Seefeld, Alemanha). Para os grupos controles (M e KC) eles foram manipulados segundo as instruções dos fabricantes (Quadro 1). Para os grupos testes, soluções de digluconato de clorexidina a 10% e 18% foram incorporadas ao líquido dos cimentos durante a sua manipulação em uma proporção de uma gota do líquido (ácido tartárico 10%) para uma gota da solução de clorexidina, utilizando o mesmo bico dosador, posteriormente espatulado com o pó do cimento para a obtenção de um material sólido (FARRET et al., 2011b).

4.5 POPULAÇÃO E AMOSTRA

4.5.1 Grupos experimentais

Os cimentos foram distribuídos em seis grupos de acordo com as concentrações de digluconato de clorexidina utilizadas: Grupo M (Meron, com ácido tartárico a 10%), Grupo M10 (Meron, com adição de clorexidina a 10%), Grupo M18 (Meron, com adição de clorexidina a 18%), Grupo KC (Ketac Cem, com ácido tartárico a 10%), Grupo KC10 (Ketac Cem, com adição de clorexidina a 10%), Grupo KC18 (Ketac Cem, com adição de clorexidina a 18%). Para os testes de biocompatibilidade adicionou-se o Grupo C (Controle, tubo de polietileno).

4.5.2 Estudo das propriedades mecânicas

Para as análises das propriedades de resistência à tração e à compressão foram confeccionadas 60 amostras dos cimentos para cada um dos testes. Para o teste de resistência de união por cisalhamento foram utilizados 60

incisivos bovinos e para o ensaio de microdureza forma confeccionadas 30 amostras dos cimentos. As amostras foram distribuídas de acordo com os grupos experimentais (n=10 para tração, compressão e cisalhamento e n=5 para microdureza) (Tabela 1).

Quadro 1 - Composição dos materiais testados.

CIVs	Composição	Fabricante	Lote
Merlon	Pó: Vidro de fluorsilicato de alumínio, ácido poliacrílico e pigmentos Líquido: Solução de ácido tartárico a 10%	VOCO, Cuxhaven, Alemanha	1123187
Ketac Cem	Pó: Vidro de flúor silicato de cálcio, alumínio e lantânio, eudragite, ácido tartárico, ácido sorbico, copolímero de ácido de acrílico e ácido maleico, ácido benzóico e pigmentos. Líquido: Solução de ácido tartárico a 10%	3M/ESPE, Seefeld, Alemanha	1322600597
Clorexidina 10%	Digluconato de Clorexidina 10%, Água destilada	Dilecta – Farmácia de manipulação e homeopatia	_____
Clorexidina 18%	Digluconato de Clorexidina 18%, Água destilada	Dilecta – Farmácia de manipulação e homeopatia	_____

Fonte: informações do fabricante

Tabela 1 - Distribuição das amostras dos testes de resistência à tração, compressão, microdureza e cisalhamento de acordo com os cimentos avaliados.

Grupos	Tração	Compressão	Cisalhamento	Microdureza
M	10	10	10	5
M10	10	10	10	5
M18	10	10	10	5
KC	10	10	10	5
KC10	10	10	10	5
KC18	10	10	10	5
TOTAL	60	60	60	30

4.5.3 Estudo Laboratorial *in vivo*

A população do estudo foi constituída de 84 ratos Wistar machos adultos com peso entre 200 e 300g pertencentes ao Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos-PB.

Os 84 ratos selecionados foram distribuídos em sete grupos de acordo com os CIVs e com as concentrações de digluconato de clorexidina utilizadas: Cada grupo foi constituído por 4 ratos para cada um dos períodos de acompanhamento (7, 15 e 30 dias), ou seja, 12 ratos por grupo. Cada rato recebeu dois implantes do material a ser analisado, tendo por resultado 24 amostras por grupo, totalizando 168 amostras de blocos parafinados para análise (Tabela 2).

O estudo foi randomizado e duplo-cego, cada material foi direcionado aos grupos I, II, III, IV, V, VI e VII, de forma que o examinador não tinha conhecimento de quais materiais foram implantados em cada grupo.

Tabela 2 - Distribuição das amostras do estudo clínico laboratorial de acordo com os materiais testados.

Grupos	Quantidade de ratos			TOTAL	Amostras de tecido			TOTAL
	7 dias	15 dias	30 Dias		7 dias	15 dias	30 dias	
C	4	4	4	12	8	8	8	24
M	4	4	4	12	8	8	8	24
M10	4	4	4	12	8	8	8	24
M18	4	4	4	12	8	8	8	24
KC	4	4	4	12	8	8	8	24
KC10	4	4	4	12	8	8	8	24
KC18	4	4	4	12	8	8	8	24
TOTAL	28	28	28	84	56	56	56	168

4.5.4 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo de biocompatibilidade ratos machos Wistar adultos com peso entre 200 e 300g pertencentes ao Biotério da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos-PB. Foram excluídos os ratos que não estavam no peso apropriado durante a inserção dos materiais ou que vieram a óbito durante os procedimentos ou acompanhamento nos períodos pré-estabelecidos.

Os materiais biológicos provenientes das biópsias excisionais que não apresentaram quantidade ou qualidade suficiente para a realização da análise morfológica e imuno-histoquímica também foram excluídos do estudo.

Para os testes de microdureza, resistência à tração diametral e resistência à compressão foram descartadas as amostras que apresentaram imperfeições em sua superfície.

Para o teste de cisalhamento foram excluídos os dentes que apresentaram fraturas, sulcos profundos e manchas na superfície do esmalte.

4.6 TESTE DE RESISTÊNCIA À TRAÇÃO DIAMETRAL E DE RESISTÊNCIA À COMPRESSÃO

Um total de 60 espécimes foi utilizado para cada um dos testes, sendo 10 para cada grupo. Para os testes de tração diametral (TD) e de resistência à compressão (RC) as amostras de cada material foram preparadas através da inserção do material em moldes de silicone (4 mm de diâmetro × 2 mm de altura para TD, e 4 mm de diâmetro × 8 mm altura para RC). Após a inserção do material, uma tira de poliéster foi colocada sobre a superfície superior e uma placa de vidro foi pressionada manualmente para se obter uma superfície regular do espécime. Depois de 5 minutos (tempo de presa inicial), as amostras foram armazenadas a 37 °C em umidade relativa por 24 horas. Antes dos ensaios mecânicos, todos os espécimes foram checados quanto a medida com um paquímetro digital (Mitutoyo Corp, Aurora, IL) (FARRET et al., 2011a).

Os ensaios mecânicos foram realizados em uma máquina universal de ensaios modelo AG-IC (Shimadzu - Kyoto, Japão) com velocidade de 0,5 mm/min (Figura 1). A carga foi aplicada ao longo do diâmetro da amostra e a força máxima antes da ruptura foi registrada. Em seguida, as equações subsequentes foram aplicadas a cada amostra para se obter os resultados dos testes de TD e RC sendo, $TD = 2F/\pi dt$ e $RC = 4F/\pi d^2$, em que F é a carga de ruptura (N), d é o diâmetro (mm) e t a altura (mm) dos espécimes (FARRET et al., 2011a).



Figura 1 – Ensaios de resistência à tração diametral e à compressão

4.7 ANÁLISE DE MICRODUREZA

Para os testes de microdureza cinco amostras de cada cimento avaliado foram preparadas através da inserção do material em moldes cilíndricos de silicona (4 mm de diâmetro × 2 mm de altura), seguidos dos mesmos procedimentos para a manipulação, inserção e tempo de presa anteriormente descritos. As medições de microdureza Vickers foram realizadas utilizando-se um microdurômetro HMV® (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) com 200g de carga ao longo de 15 s (Figura 2). Em cada amostra, foram realizados três indentações e, por conseguinte, foram obtidas 15 medições para cada grupo (FARRET et al., 2011a).



Figura 2 – Ensaio de Microdureza Vickers

4.8 TESTE DE RESISTÊNCIA AO CISALHAMENTO

Para o teste de cisalhamento foram utilizados 60 incisivos bovinos, que foram mantidos em solução de timol a 0,1% até o momento do experimento. Foram confeccionadas matrizes cilíndricas utilizando tubos de PVC (25 x 20 mm). Os dentes foram incluídos verticalmente nas matrizes com resina acrílica (VIPIFlash, Pirassununga, Brasil), de tal forma que apenas suas coroas ficaram expostas (PITHON et al., 2011).

Na inclusão, as superfícies vestibulares dessas coroas foram posicionadas perpendicularmente à base do troquel com o auxílio de esquadro de vidro em ângulo de 90°, visando possibilitar correto ensaio mecânico. Após a polimerização da resina, as superfícies vestibulares foram polidas com taça de

borracha (Viking, KG Sorensen, Barueri, Brasil), e pedra-pomes (S.S. White, Juiz de Fora, Brasil) em baixa rotação por 10 segundos, lavadas e secas, pelo mesmo tempo, e distribuídas igualmente entre os diferentes grupos (PITHON et al., 2011).

Matrizes metálicas (n = 60) para bandas ortodônticas (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil), com 4 mm de altura x 5 mm de largura, foram cortadas, e braquêtes metálicos (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil) foram soldados sobre elas. Os CIVs foram manipulados e cada matriz foi cimentada no centro da superfície da coroa. Após 5 min de tempo de presa inicial, as amostras foram armazenadas a 37 °C em umidade relativa durante 24 horas (FARRET et al., 2011a).

Os testes de resistência ao cisalhamento foram realizados em uma máquina universal de ensaios modelo AG-IC (Shimadzu - Kyoto, Japão) usando uma ponta em forma de cinzel a uma velocidade de 0,5 mm/min. Os resultados de resistência ao cisalhamento foram obtidos em Kgf, transformados em N e divididos pela área da base do braquete, fornecendo resultados em Mpa.

Após a realização do ensaio, a superfície vestibular de cada corpo de prova foi avaliada em lupa estereoscópica (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) com aumento de 8 vezes, para ser quantificado o Índice de Remanescente do Adesivo (IRA): 0 = nenhuma quantidade de cimento aderido ao esmalte; 1 = menos de metade do cimento aderido ao esmalte; 2 = mais de metade do cimento aderido ao esmalte; 3 = todo o cimento aderido ao esmalte (PITHON et al. 2011).

4.9 ESTUDO LABORATORIAL *IN VIVO*

Os ratos foram anestesiados utilizando injeção intraperitonal de tiopental sódico (50 mg/kg) (Cristália, Campinas, São Paulo, Brasil). Foi realizada tricotomia da região dorsal de cada animal com lâminas de barbear para eliminação dos pêlos (4 x 4 cm). Para anti-sepsia do campo operatório foi utilizado digluconato de clorexidina a 4% e para anestesia local foi utilizada Lidocaína com vasoconstritor. Na linha média, equidistante da inserção da cauda e da cabeça do animal, foram realizadas duas incisões de aproximadamente 8 mm de comprimento utilizando lâmina de bisturi nº 15 adaptada a um cabo de bisturi (SANTOS et al., 2014).

Com o auxílio de uma tesoura de ponta romba, o tecido subcutâneo foi divulsionado lateralmente promovendo uma tunelização no sentido lateral,

formando uma loja cirúrgica, com aproximadamente 18 mm de profundidade cada uma. Cada rato recebeu dois implantes de tubo de polietileno (0,8 cm de comprimento e 0,5 cm de diâmetro interno; previamente mantidos em álcool 70% por 120 minutos, lavados com água deionizada e finalmente autoclavados à temperatura de 110⁰ C por 20 minutos) que foram utilizados como veículos de inoculação dos materiais testados (SANTOS et al., 2014).

Os CIVs foram introduzidos nas aberturas das extremidades de tubo de polietileno, com auxílio de seringa (Centrix, Connecticut, USA). Para grupo controle, foram utilizados tubos de polietileno vazios que correspondem ao trauma induzido e possível contaminação dos mesmos (SANTOS et al., 2014).

Após o implante dos materiais, as lojas cirúrgicas foram suturadas com fio de sutura agulhado 4.0 (Ethicon, Jonhson&Jonhson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) e em seguida os animais receberam injeção de 0,2 ml de pentabiótico veterinário via intramuscular (Wyeth Laboratory, New York, NY, EUA), e uma injeção de dipirona sódica (0,3 ml/100g, Novalgina, São Paulo, SP, Brasil). Todos os procedimentos do presente estudo foram realizados em conformidade com o guia *Canadian Council on Animal Care* (1981). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais a uma temperatura variando de 22°C a 26°C sob um ciclo de luz claro-escuro de 12 horas, sob condições adequadas, com ração apropriada e água *ad libitum*.

Após 7, 15 e 30 dias, os animais foram anestesiados para obtenção das biópsias excisionais das áreas dos implantes, abrangendo tecido normal circundante suficiente. Posteriormente os animais foram sacrificados pela técnica do deslocamento cervical após sedação com tiopental sódico (50 mg/kg) (Cristália, Campinas, São Paulo, Brasil) (SANTOS et al., 2014).

4.10 ESTUDO MORFOLÓGICO

Os espécimes, fixados em formol à 10% e emblocados em parafina, foram submetidos a cortes de 5 µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro e preparados através da coloração de rotina em Hematoxilina e Eosina (HE) e posteriormente avaliados em um microscópio óptico Leica DM500® (Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), em aumentos de 100x, 400x e 1000x. Foram avaliados os seguintes parâmetros histopatológicos: infiltrado

inflamatório, edema, necrose, tecido de granulação, células gigantes multinucleares, fibroblastos jovens e fibras colágenas, e pontuados com os seguintes escores: 1 - ausente (quando ausente no tecido), 2 - escasso (quando pouco presente, ou em grupos muito pequenos), 3 - moderado (quando densamente presente, ou em alguns grupos) e 4 - intenso (quando encontrado em todo o campo, ou presentes em grande número, configurando alta gravidade). Para cada amostra do estudo, foram analisadas cinco secções representativas da condição histológica do tecido, quando todas as cinco seções de tecido demonstraram a mesma condição histológica, as pontuações 1, ausente; 2, escassos; 3, moderado; e 4, intenso representam: 1, ausente (5,00); 2, escasso (10,00); 3, moderada (15,00); e 4, intensa (20,00). (GARCIA et al., 2010; SANTOS et al., 2014). A avaliação histopatológica foi procedida por um único avaliador previamente treinado e calibrado para esse fim ($\kappa = 0.8$).

4.11 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

4.11.1 Método Imuno-histoquímico

Os espécimes, fixados em formol à 10% e emblocados em parafina, foram submetidos a cortes de 3 μ m de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro devidamente limpas, desengorduradas e previamente preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma ChemicalCo, St Louis, MO, USA), conforme protocolo do Laboratório de Histopatologia Oral do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB.

Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica da estreptoavidina-biotina (LSAB + System HRP, Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA).

As lâminas passaram por um processo de desparafinização em xilol, re-hidratação em cadeia descendente de etanóis, remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10%, recuperação antigênica (Tabela 3) e duas incubações em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Logo após, os cortes foram submetidos ao anticorpo monoclonal CD68 (Tabela 3), seguido de incubações com o anticorpo secundário e com o complexo estreptoavidina-HRP. Entre as

incubações, foram realizadas duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCL. Por último, foi realizada a revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina, a contra-coloração com hematoxilina de Mayer, a desidratação em cadeia de etanóis, três passagens em xilol e a montagem das lâminas em resina (Anexo 1). Assim, a imunorreatividade foi verificada pela coloração acastanhada das células marcadas.

Como controle positivo para o anticorpo CD68 foram utilizados espécimes de tecido subcutâneo de ratos livres da inserção de material ortodôntico. O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão.

Tabela 3 - Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
CD68	ED1	Advance	1:1500	Citrato, pH 6, 95 ^o , 30 min	60 min

4.11.2 Análise Imuno-histoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunohistoquímico, cada espécime foi analisada, sob microscopia de luz por um avaliador previamente treinado e calibrado.

A análise foi do tipo quantitativa. Sob aumento de 100x foram selecionados 10 campos de maior imunorreatividade ao anticorpo CD68. Sob aumento de 400x, cada um destes campos foi fotomicrografado (Leica DM500®, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) e as imagens obtidas (n=10) foram transferidas para um computador de uso pessoal. Com o auxílio do programa ImageJ® (Imaging Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um destes campos foi realizada a contagem das células CD68+ (macrófagos e células gigantes). Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se o

número total de células CD68+, e posteriormente, com este último dado, foi calculada a média para cada caso.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram organizados em um banco de dados com o auxílio do programa Microsoft Excel, versão 2010 e em seguida exportado para o programa Statistical Package for the Social Sciences (versão 17.0, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), no qual foram realizadas as análises estatísticas, tomando como base os níveis de significância de 95% ($P < 0,05$) para determinação de significância estatística.

Para os testes de resistência à tração diametral, resistência à compressão, microdureza e cisalhamento foi realizada a análise de distribuição dos dados através do teste de Kolmogorov-Smirnov, logo após utilizou-se análise de variância one-way com teste de comparação múltipla de Tukey, para análise dos dados ($P < 0,05$). Enquanto que, para a análise dos resultados do IRA e dos estudos morfológico e imuno-histoquímico foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE RESISTÊNCIA À TRAÇÃO DIAMETRAL

O teste de resistência à tração diametral demonstrou diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos do cimento Meron ($P=0,001$). Para o cimento Ketac Cem, houve diferença estatisticamente significativa entre o Grupo KC18 com os Grupos KC e KC10 ($P=0,001$) (Tabela 4).

Tabela 4 - Média, desvio padrão (DP), e análise de variância one-way com teste de comparação múltipla de Tukey entre os grupos para o teste de resistência à tração diametral.

Grupos	N	Média (MPa)	DP
Meron			
M	10	17,16 ^A	2,64
M10	10	13,07 ^B	1,53
M18	10	5,46 ^C	1,11
P*	---	0,001	---
Ketac Cem			
KC	10	9,65 ^A	1,96
KC10	10	11,79 ^A	2,64
KC18	10	5,01 ^B	1,55
P*	---	0,001	---

*Valores seguidos por letras diferentes, expressam diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$).

5.2 TESTE DE RESISTÊNCIA A COMPRESSÃO

A resistência à compressão demonstrou diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos do cimento Meron ($P=0,001$). Para o cimento Ketac, houve diferença estatisticamente significativa entre o Grupo KC com os Grupos KC10 e KC18 ($P=0,001$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Média, desvio padrão (DP), e análise de variância *one-way* com teste de comparação múltipla de Tukey entre os grupos para o teste de resistência à compressão

Grupos	N	Média (MPa)	DP
Meron			
M	10	28,56 ^A	6,46
M10	10	11,05 ^C	2,33
M18	10	16,47 ^B	2,54
P*	---	0,001	---
Ketac Cem			
KC	10	22,50 ^A	4,22
KC10	10	13,84 ^B	2,95
KC18	10	11,80 ^B	3,72
P*	---	0,001	---

* Valores seguidos por letras diferentes, expressam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

5.3 ANÁLISE DA MICRODUREZA

O teste de microdureza não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os Grupos do cimento Meron ($P = 0,858$) e entre os Grupos do cimento Ketac Cem ($P = 0,427$), após a adição de clorexidina (Tabela 6).

Tabela 6 - Média, desvio padrão (DP), e análise de variância *one-way* com teste de comparação múltipla de Tukey entre os grupos para o teste de microdureza.

* Não houve diferença estatisticamente significativa entre grupos ($P > 0,05$).

Grupos	N	Média HV	DP
Meron			
M	10	100,79	11,22
M10	10	89,11	19,48
M18	10	93,52	16,04
P*	---	0,858	---
Ketac Cem			
KC	10	90,00	9,99
KC10	10	80,70	18,61
KC18	10	92,04	11,26
P*	---	0,427	---

A unidade de medida é a microdureza de Vickers (VHN).

5.4 TESTE DE RESISTÊNCIA AO CISALHAMENTO

A resistência ao cisalhamento não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos do cimento Meron ($P=0,385$), após a adição de clorexidina. Para o cimento Ketac, houve diferença estatisticamente significativa entre o Grupo KC com os Grupos KC10 e KC18 ($P=0,001$), demonstrando um aumento na resistência ao cisalhamento nos cimentos com adição de clorexidina. Na comparação entre marcas diferentes de CIV para a mesma concentração de solução utilizada, houve diferença significativa apenas entre os Grupos M e KC ($P=0,032$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Média e desvio padrão (DP) dos valores de resistência ao cisalhamento, expressos em MPa.

Grupos [#]	N	Meron	Ketac Cem	P*
		Média (DP)		
Controle	10	0,37(0,17) ^a	0,23(0,08) ^{Ab}	0,032
10%	10	0,47 (0,22)	0,41 (0,14) ^B	0,985
18%	10	0,49 (0,21)	0,56 (0,18) ^B	0,446
P*	---	0,385	0,001	---

Controle (Solução de ácido tartárico a 10%), 10% (adição de digluconato de clorexidina a 10%), 18% (adição de digluconato de clorexidina a 10%). * Valores médios seguidos por letras diferentes, expressam diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$). A, B (em colunas, comparação entre grupos para a mesma marca de CIV) de acordo com ANOVA one-way, seguida pela Teste de comparações múltiplas de Tukey. a, b (em linhas, comparação entre as marcas de CIV para cada concentração de solução utilizada) de acordo com Teste T não-pareado.

O índice de remanescente adesivo demonstrou que mais da metade do adesivo remanescente ou todo o adesivo remanescente permaneceu na superfície dentária após a remoção do espécime. O IRA não demonstrou diferença significativa entre os Grupos do cimento Meron ($P=0,979$) e entre os Grupos do cimento Ketac Cem ($P=0,092$), após a adição de clorexidina (Tabela 8).

Tabela 8 - Pontuações do IRA e valores médios apresentados pelos grupos^{a,b}

Grupos	Pontuações IRA				Média
	0	1	2	3	
M	0	0	4	6	2,6
M10	0	1	3	6	2,5
M18	0	0	4	6	2,6
P valor	----	----	----	----	0,979
KC	0	1	3	6	2,5
KC10	0	0	0	10	3,0
KC18	0	0	3	7	2,7
P valor	----	----	----	----	0,092

a 0, nenhum adesivo remanescente; 1, menos da metade do adesivo remanescente; 2, mais da metade do adesivo remanescente; 3, todo o adesivo remanescente.

b IRA indica Índice Remanescente de Adesivo. * Teste de Kruskal-Wallis e Dunn ($P < 0,05$)

5.5 ESTUDO MORFOLÓGICO

No período inicial, um intenso infiltrado inflamatório foi demonstrado principalmente nos Grupos M18 e KC18, com diferença estatisticamente significativa entre o Grupo Controle e o Grupo KC18 nos períodos de tempo de 7 ($P = 0,013$) e 15 ($P = 0,032$) dias (Tabela 9). A intensidade do infiltrado inflamatório demonstrou ser inversamente proporcional aos tempos experimentais (Figuras 3A e 9C).

Alterações circulatórias (edema) e degeneração do tecido (necrose) não foram expressivas e não demonstraram diferença estatística entre os grupos avaliados ($P > 0,05$) (Tabela 9) (Figuras 5A, 6A e 9A). O tecido de granulação mostrou-se densamente presente no Grupo M18 com diferença significativa em relação ao Grupo controle ($P = 0,029$), no período de tempo de 7 dias (Tabela 9) (Figura 8A). Células gigantes multinucleadas também se mostraram mais presentes no Grupo M18, com diferença estatística com o Grupo Controle no período de tempo de 7 dias ($P = 0,013$) (Tabela 9) (Figuras 3B e 8B).

Nos eventos de reparação tecidual, o Grupo KC18 demonstrou uma menor quantidade de fibroblastos jovens ($P = 0,031$) e fibras colágenas ($P = 0,044$) no período de tempo de 7 dias (Tabela 9) (Figuras 5B e 5C). As quantidades de fibroblastos jovens e fibras colágenas aumentaram ao longo dos períodos experimentais, sem diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) (Tabela 9) (Figuras 3C, 4B, 4C, 6C, 7B, 7C, 8C, 9A, 9B e 9C)

Tabela 9 - Média dos escores atribuídos aos cimentos, após os intervalos de tempo de 7, 15 e 30 dias, para as sete condições avaliadas

	Grupos							P
	M	M10	M18	KC	KC10	KC18	C	
Infiltrado Inflamatório								
7 dias	13,75 ^{AB}	13,75 ^{AB}	15,00 ^{AB}	12,50 ^{AB}	13,75 ^{AB}	18,75 ^A	10,00 ^B	0,013
15 dias	10,00 ^{AB}	10,00 ^{AB}	11,25 ^{AB}	10,00 ^{AB}	11,25 ^{AB}	13,75 ^A	7,50 ^B	0,032
30 dias	10,00	11,25	11,25	10,00	10,00	10,00	7,50	0,119
Edema								
7 dias	5,00	5,00	6,25	6,25	5,00	5,00	5,00	0,519
15 dias	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	1,000
30 dias	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	1,000
Necrose								
7 dias	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	6,25	5,00	0,423
15 dias	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	1,000
30 dias	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	1,000
Tecido de Granulação								
7 dias	13,75 ^{AB}	16,25 ^{AB}	18,75 ^A	13,75 ^{AB}	16,25 ^{AB}	16,25 ^{AB}	11,25 ^B	0,029
15 dias	8,75	10,00	12,50	8,75	10,00	10,00	7,50	0,099
30 dias	6,25	7,50	7,50	7,50	8,75	8,75	6,25	0,696
Células Gigantes								
7 dias	7,50 ^{AB}	10,00 ^{AB}	12,50 ^A	7,50 ^{AB}	8,75 ^{AB}	10,00 ^{AB}	5,00 ^B	0,013
15 dias	6,25	7,50	7,50	6,25	6,25	6,25	5,00	0,760
30 dias	5,00	5,00	6,25	5,00	6,25	6,25	5,00	0,633
Fibrobrastos Jovens								
7 dias	13,75 ^{AB}	12,50 ^{AB}	10,00 ^{AB}	12,50 ^{AB}	11,25 ^{AB}	8,75 ^A	15,00 ^B	0,031
15 dias	15,00	13,75	13,75	15,00	13,75	12,50	16,25	0,324
30 dias	11,25	13,75	15,00	11,25	11,25	12,50	10,00	0,081
Colágeno								
7 dias	12,50 ^{AB}	12,50 ^{AB}	10,00 ^{AB}	11,25 ^{AB}	11,25 ^{AB}	8,75 ^A	15,00 ^B	0,044
15 dias	16,25	15,00	13,75	16,25	16,25	15,00	18,75	0,107
30 dias	18,75	17,50	17,50	20,00	18,75	18,75	20,00	0,525

P= Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.^A
^{ou B} Médias seguidas por letras únicas iguais não expressam diferença estatisticamente significativa (P>0,05).^{AB} Médias seguidas por letras diferentes expressam diferença estatisticamente significativa (P<0,05).

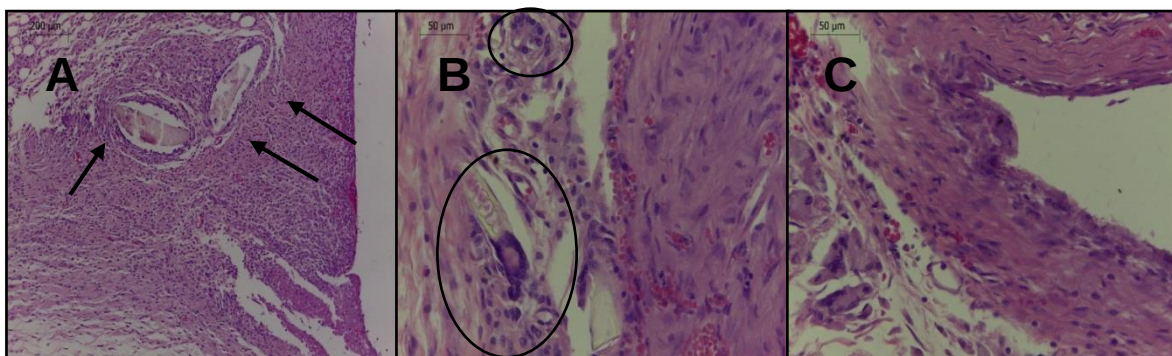


Figura 3: Fotomicrografias das amostras do Grupo KC **A)** 7 dias após implantação, numerosas células inflamatórias crônicas ao redor de material exógeno (setas) (HE, 100X aumento, escala: 200µm). **B)** 15 dias após implantação: Células gigantes multinucleadas ao redor de material exógeno (círculos) (HE, 400X aumento, escala: 50µm). **C)** 30 dias após implantação: Espessa camada de fibras colágenas dispostas em feixes paralelos em meio a escassos fibroblastos jovens (HE, 400X aumento, escala: 50µm).

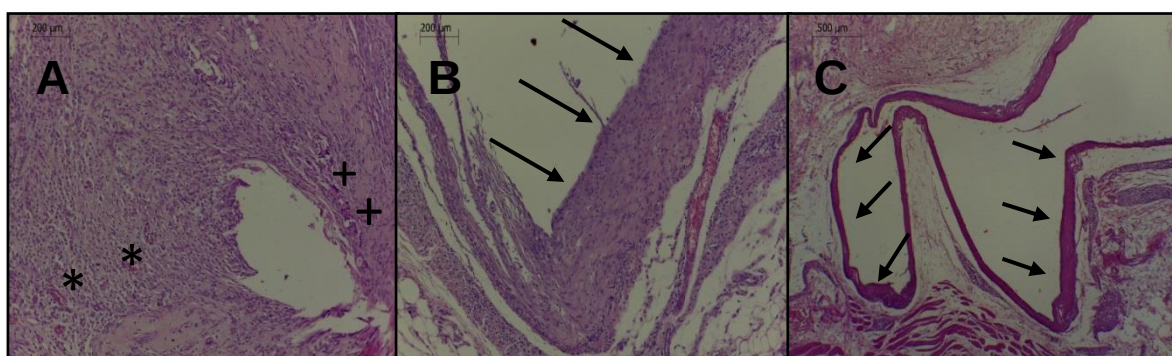


Figura 4: Fotomicrografias das amostras do Grupo KC10 **A)** 7 dias após implantação Cavidade envolta por moderado infiltrado inflamatório crônico, reação de granulação, intensa vascularização (*) e reação de células gigantes multinucleadas (+). (HE, 100X aumento, escala: 200µm). **B)** 15 dias após implantação: Presença de fibras colágenas dispostas em feixes paralelos e fibroblastos jovens ovóides (setas) (HE, 400X aumento, escala: 50µm). **C)** 30 dias após implantação: Cavidade envolta por espessa camada de fibras colágenas (setas) (HE, 400X aumento, escala: 50µm).

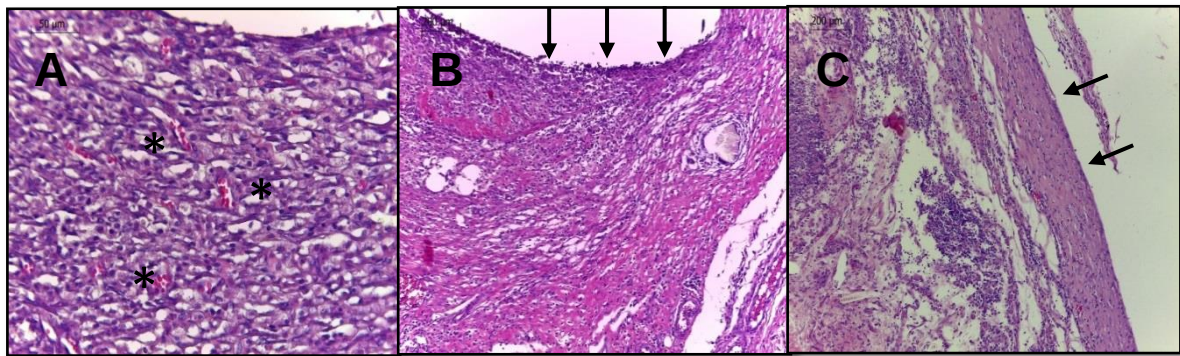


Figura 5: Fotomicrografias das amostras do Grupo KC18 **A)** 7 dias após implantação: intensa vascularização com vasos sanguíneos diminutos, estando alguns destes congestionados (*) (HE, 400X aumento, escala: 50µm). **B)** 15 dias após implantação: Cavity envolta por uma espessa camada exibindo fibras colágenas, fibroblastos jovens e moderado infiltrado inflamatório crônico (setas) (HE, 100X aumento, escala: 200µm). **C)** 30 dias após implantação: Espessa camada de fibras colágenas (setas) (HE, 100X aumento, escala: 200µm).

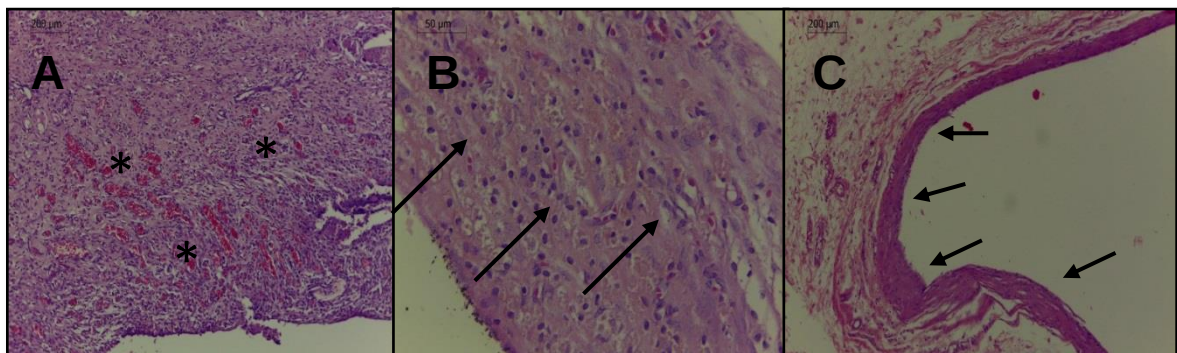


Figura 6: Fotomicrografias das amostras do Grupo M. **A)** 7 dias após implantação: infiltrado inflamatório crônico e vascularização, numerosos vasos sanguíneos, estando a maioria congestionados (*) (HE, 100X aumento, escala: 200µm). **B)** 15 dias após implantação: Presença de delicadas fibras colágenas dispostas em feixes paralelos e escassos fibroblastos ovóides (setas) (HE, 400X aumento, escala: 50µm). **C)** 30 dias após implantação: Cavity envolta por intensa collagenização (setas) (HE, 100X aumento, escala: 200µm).

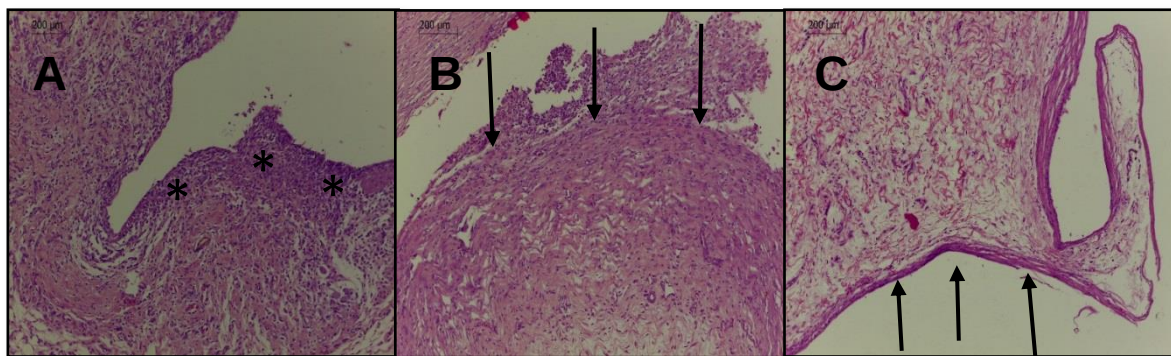


Figura 7: Fotomicrografias das amostras do Grupo M10. **A)** 7 dias após implantação: numerosos e diminutos vasos sanguíneos, fibroblastos jovens e moderado infiltrado inflamatório crônico (*) (HE, 100X aumento, escala: 200µm). **B)** 15 dias após implantação: fibras colágenas dispostas em feixes paralelos e quantidade leve de fibroblastos ovóides (setas) (HE, 400X aumento, escala: 50µm). **C)** 30 dias após implantação: Delgada camada de fibras colágenas dispostas em feixes paralelos (setas) (HE, 100X aumento, escala: 200µm).

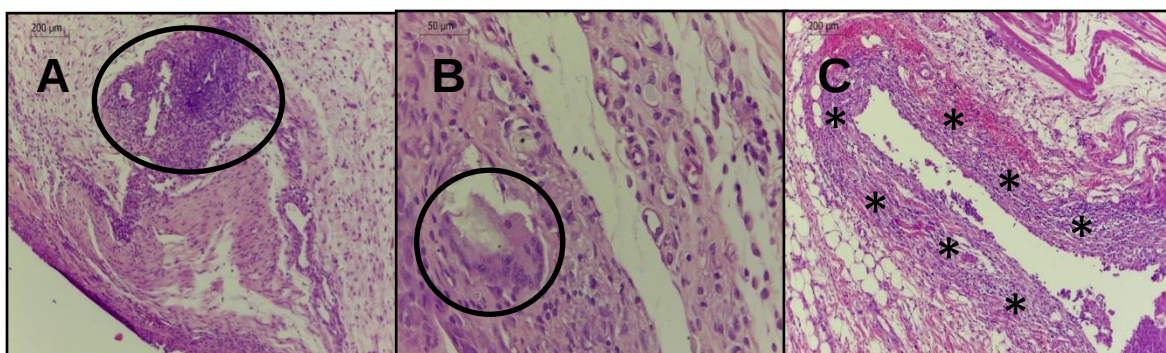


Figura 8: Fotomicrografias das amostras do Grupo M18 **A)** 7 dias após implantação: área de inflamação adjacente à cavidade (HE, 100X aumento, escala: 200µm). **B)** 15 dias após implantação: célula gigante multinucleada envolvendo material exógeno (HE, 400X aumento, escala: 50µm). **C)** 30 dias após implantação: Cavidade envolta por espessa camada de fibras colágenas em meio a um leve infiltrado inflamatório crônico (HE, 100X aumento, escala: 200µm).

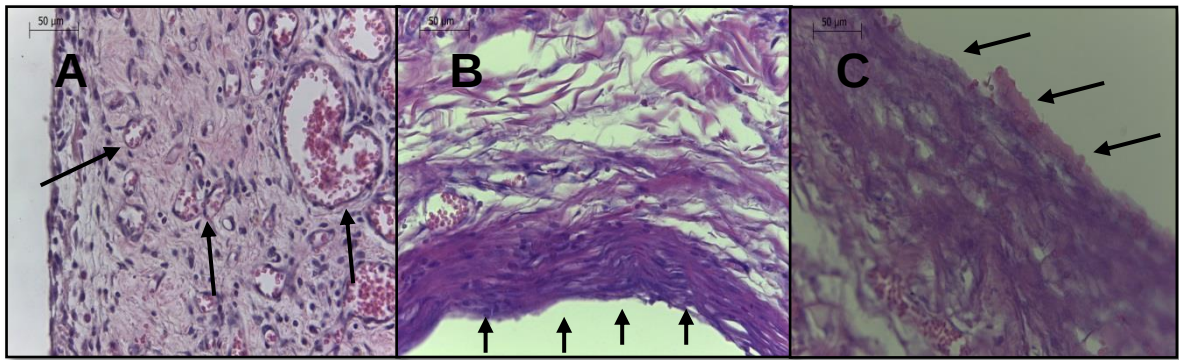


Figura 9: Fotomicrografias das amostras do Grupo C. **A)** 7 dias após implantação: vascularização com vasos congestionados e de tamanhos variados, em meio a proliferação de fibroblastos jovens ovóides (setas) (HE, 400X aumento, escala: 50µm). **B)** 15 dias após implantação: evidenciando numerosas fibras colágenas dispostas em feixes paralelos envolvendo a cavidade (setas) (HE, 400X aumento, escala: 50µm). **C)** 30 dias após implantação: fibras colágenas dispostas ora em feixes paralelos ora em feixes variados, envolvendo a área da cavidade (setas) (HE, 400X aumento, escala: 50µm).

5.6 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Na análise imuno-histoquímica da quantidade de células gigantes multinucleadas, houve diferença estatisticamente significativa entre o Grupo M18 com os Grupos Controle, M10 e KC ($P= 0,001$) no tempo de 7 dias. No período de tempo de 30 dias houve diferença significativa entre o Grupo KC18 com os outros Grupos avaliados ($P= 0,001$). Macrófagos foram mais expressivos no período de tempo de 7 dias nos Grupos M18 e KC18, com diferença significativa com os Grupos M, M10, KC, KC10 e Controle ($P= 0,001$) (Figuras – 10A-C e 11A-B). No tempo de 15 dias, a quantidade de macrófagos foram menos expressivos nos Grupos M e Controle que diferiram estatisticamente do Grupo KC ($P= 0,001$) (Figuras 10B). Com 30 dias, houve diferença estatística entre o Grupo Controle com os Grupos KC10 e KC18 ($P=0,001$) que demonstraram maior quantidade de macrófagos (Figuras 10C e 12A-B) (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise imuno-histoquímica da quantidade de células gigantes multinucleadas e macrófagos, após os intervalos de tempo de 7, 15 e 30 dias do contato de diferentes cimentos ortodônticos no tecido subcutâneo.

	Grupos							P
	M	M10	M18	KC	KC10	KC18	C	
Células Gigantes								
7 dias	1,00 ^{AB}	0,00 ^A	2,00 ^B	0,00 ^A	1,00 ^{AB}	1,00 ^{AB}	0,00 ^A	0,001
15 dias	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,000
30 dias	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	0,00 ^A	1,00 ^B	0,00 ^A	0,001
Macrófagos								
7 dias	101,35 ^{AB}	98,22 ^{AB}	108,60 ^A	87,75 ^{AB}	86,07 ^{AB}	124,50 ^A	20,2 ^B	0,001
15 dias	41,40 ^A	83,17 ^{AB}	77,77 ^{AB}	87,10 ^B	71,27 ^{AB}	75,05 ^{AB}	13,6 ^A	0,001
30 dias	52,17 ^{AB}	80,30 ^{AB}	78,00 ^{AB}	72,26 ^{AB}	91,70 ^A	91,17 ^A	10,6 ^B	0,001

Estes valores representam a quantidade média das células encontradas nas dez secções histológicas representativas do tecido avaliado (n=10, por grupo). Médias seguidas por letras diferentes expressam diferença estatisticamente significativa ($P < .05$) com base no teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

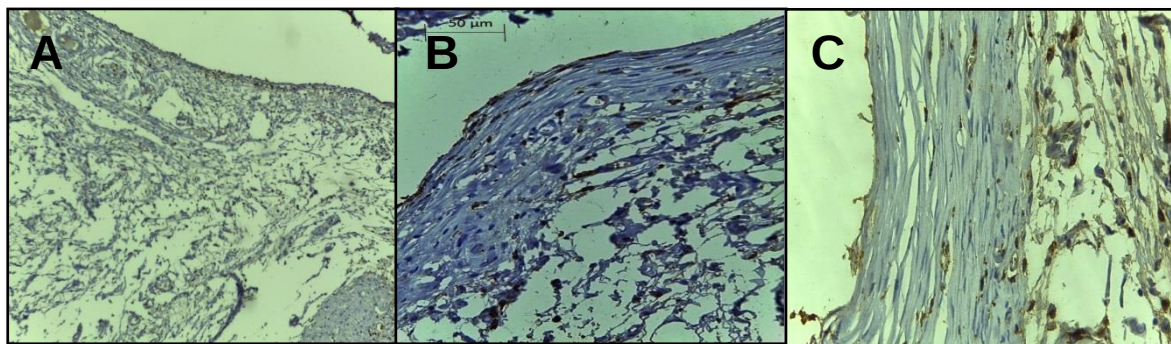


Figura 10: Fotomicrografias das amostras imuno-histoquímicas do Grupo C **A)** 7 dias após implantação: ausência de imunoreatividade ao CD68 para macrófagos e células gigantes (IH, 100X aumento, escala: 200µm). **B)** 15 dias após implantação: baixa imunoreatividade ao CD68 para macrófagos e células gigantes (IH, 400X aumento, escala: 50µm). **C)** 30 dias após implantação: baixa imunoreatividade ao CD68 para macrófagos e células gigantes (IH, 400X aumento, escala: 50µm).

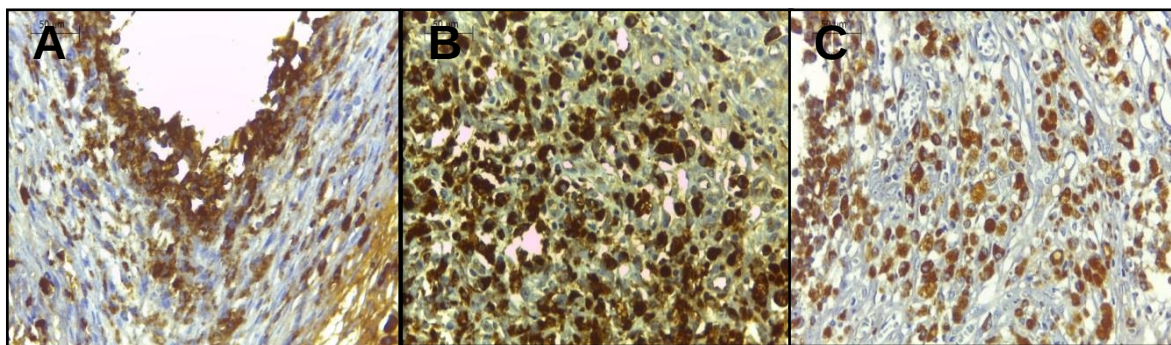


Figura 11: Fotomicrografias das amostras imuno-histoquímicas. **A)** 7 dias após implantação, Grupo M18: intensa imunoreatividade ao CD68 para macrófagos e Células gigantes (IH, 400X aumento, escala: 50µm). **B)** 7 dias após implantação, Grupo KC18: intensa imunoreatividade mostrando numerosos macrófagos positivos para o CD68 (IH, 400X aumento, escala: 50µm). **C)** 15 dias após implantação, Grupo KC: imunoreatividade mostrando numerosos macrófagos positivos para o CD68 (IH, 400X aumento, escala: 50µm).

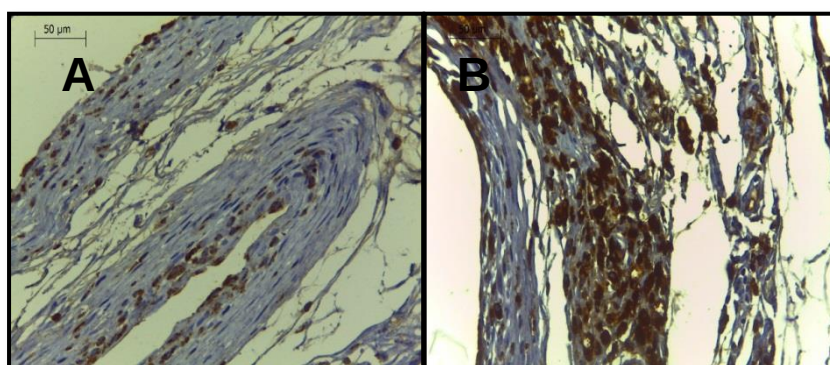


Figura 12: Fotomicrografias das amostras imuno-histoquímicas **A)** 30 dias após implantação, Grupo KC10: imunoreatividade mostrando macrófagos positivos para o CD68 nas regiões externas da cavidade (IH, 100X aumento, escala: 200µm). **B)** 30 dias após implantação, Grupo KC18: imunoreatividade ao CD68 para macrófagos e Células gigantes (IH, 100X aumento, escala: 200µm).

6 DISCUSSÃO

Atualmente, pesquisadores propuseram a adição de digluconato e de diacetato de clorexidina em CIVs, restauradores e de cimentação, com a intenção de melhorar o controle do biofilme adjacente a esse material (FRENCKEN et al., 2007; HOSZEK & ERICSON, 2008; FARRET et al., 2011a; TUZUNER et al., 2011; DU et al., 2012; HUANG et al., 2012; LEWINSTEIN et al., 2012; CASTILHO et al., 2013; KORKMAZ et al., 2013; MARTI et al., 2014a). No entanto, a inclusão de clorexidina em CIVs para a cimentação de bandas é ainda muito pouco explorada e pouco se sabe sobre os efeitos que esta modificação na composição do material poderia causar sobre as propriedades mecânicas e biológicas destes materiais (FARRET et al., 2009). Por ser um material de fácil acesso e passível de ser utilizado na clínica ortodôntica, optou-se pelo digluconato de clorexidina para a inclusão no líquido dos CIVs.

Como a solução de clorexidina é adicionada ao líquido do cimento em proporções iguais durante a sua manipulação, a concentração da clorexidina cai pela metade, porém, após a espatulação com o pó do cimento, o volume total também cai pela metade em relação ao volume inicial do pó, portanto a concentração de clorexidina dobra, voltando a sua concentração inicial.

Concentrações abaixo de 5% de clorexidina no líquido dos cimentos (clorexidina + ácido tartárico), são consideradas muito baixas para se obter um maior controle bacteriano. Sugere-se então, a utilização de uma solução com um mínimo de 10% de clorexidina e ácido tartárico a 10% para que o líquido utilizado na manipulação do cimento contenha uma concentração final de 5% de clorexidina (FARRET et al., 2011b). Por esse motivo uma solução com concentração de 10% de clorexidina foi escolhida para a manipulação dos cimentos.

Um aumento do efeito antibacteriano é observado em concentrações maiores de clorexidina (HOSZEK & ERICSON, 2008). Porém, não é possível utilizar concentrações acima de 18% pois o reagente apresenta-se em estado líquido com concentração máxima de 18% (FARRET et al., 2011a). Assim, a concentração de 18% de clorexidina também foi escolhida para a manipulação dos cimentos.

Foram propostos diferentes testes para avaliar as propriedades mecânicas dos materiais. A resistência à tração diametral e a resistência à compressão são utilizados para verificar a capacidade do material de resistir à aplicação de forças em diferentes sentidos, como nas forças provenientes da mastigação. A avaliação da microdureza é importante para prever a capacidade de um material de resistir a desgastes superficiais gerados por abrasão (FARRET et al., 2009).

No presente estudo, os testes de tração diametral e resistência à compressão apresentaram uma diminuição significativa na resistência mecânica do cimento Meron com adição de digluconato de clorexidina, no qual uma resistência menor foi encontrada para a maior concentração. O cimento Ketac Cem demonstrou um comportamento semelhante, exceto os grupos com 10% de clorexidina que não seguiram a relação dose dependente com diminuição significativa da resistência mecânica.

Esses resultados corroboram com os de outros estudos presentes na literatura (TAKAHASHI et al., 2006; DEEPALAKSHMI et al., 2010). Uma redução na resistência à compressão foi observada, quando adicionadas quantidades superiores a 2% de clorexidina às CIVs convencionais para restaurações atraumáticas. A possível razão para a diminuição das propriedades mecânicas pode ser atribuída aos sais catiônicos da clorexidina que podem dificultar a reação entre o ácido acrílico e o vidro, uma vez que um ataque de prótons interfere na lixiviação do vidro (TAKAHASHI et al., 2006; DEEPALAKSHMI et al., 2010).

Entretanto, a adição de clorexidina não afetou a microdureza dos cimentos, uma vez que não houve diferença estatisticamente significante entre os dois cimentos testados. Esses resultados estão de acordo com os de outros estudos semelhantes (SANDERS et al., 2002; TURKUN et al., 2008; FARRET et al., 2011; AHLUWALIA et al., 2012; TUZUNER et al., 2012) e são clinicamente, muito importantes, uma vez que a microdureza é uma propriedade de superfície relacionada à degradação superficial do material, e esta degradação pode causar diminuição na resistência do material ao longo do tempo, além de um acúmulo de biofilme na região. Porém, uma diminuição significativa na microdureza superficial foi relatada em CIV para restaurações atraumáticas com adição de 2% de gluconato de clorexidina (MARTI et al., 2014a).

A resistência de união ao cisalhamento é provavelmente o teste mecânico que melhor represente a situação clínica ortodôntica e certamente o mais utilizado para verificação do desempenho *in vitro* de colagem de bráquetes e cimentação de bandas, portanto, este teste foi também utilizado neste estudo (FARRET et al., 2009). A adição de clorexidina não demonstrou diferença estatisticamente significativa para a resistência de união ao cisalhamento entre os grupos do cimento Meron ($P=0,385$). Porém, o cimento Ketac apresentou um aumento significativo na resistência ao cisalhamento com a adição de clorexidina ($P=0,001$). Estes resultados estão de acordo com outros estudos (MILLET et al., 2005; FARRET et al., 2011) e nos permitem inferir que a inclusão de digluconato de clorexidina nos CIVs para cimentação ortodôntica não prejudica o desempenho clínico deste material, quanto a possíveis transtornos como decimentação da banda, infiltrações e consequentemente desenvolvimento de cáries e doença periodontal próxima aos anéis. Estes resultados foram comprovados com o IRA, no qual demonstrou que mais da metade ou todo o adesivo remanescente permaneceu na superfície dentária após a remoção do espécime, independentemente da adição de digluconato de clorexidina e sem diferença estatística entre os grupos ($P=0,979$ e $P=0,092$), comprovando que a clorexidina não diminuiu a resistência coesiva do cimento nem a união do CIV com a estrutura dental.

A análise da biocompatibilidade teve como objetivo evidenciar a ação dos CIVs com adição de digluconato de clorexidina sobre os tecidos, por meio de uma análise histológica, uma vez que ainda não foram realizados estudos que avaliassem a biocompatibilidade *in vivo* destes cimentos. Esta análise, efetuada por meio de uma avaliação qualitativa e quantitativa, foi baseada na agressão ao tecido vivo vascularizado, influenciada pelo contato com os cimentos, a qual pode estar associada à morte celular e necrose, bem como a influência dessa agressão às características de desenvolvimento da cápsula de colagenização, infiltrado inflamatório e ação dos macrófagos (SANTOS et al., 2014). Os tubos de polietileno foram utilizados como controles por serem considerados inofensivos para o epitélio e o tecido conjuntivo (GRECCA et al., 2011; SANTOS et al., 2014).

No presente estudo, um intenso infiltrado inflamatório inicial foi demonstrado pelos dois cimentos principalmente nos Grupos M18 e KC18, porém com diferença estatisticamente significativa apenas entre o Grupo Controle e o

Grupo KC18 nos períodos de tempo de 7 ($P= 0,013$) e 15 ($P= 0,032$) dias. Entretanto, a intensidade do infiltrado inflamatório diminuiu de forma gradativa com o passar do tempo, e no período de 30 dias já não demonstrou diferença significativa entre os grupos. Estes achados estão de acordo com estudos (LONNROTH & DAHL, 2001; LESSA et al., 2010) que evidenciaram que a CX é citotóxica à células e tecidos, sendo capaz de induzir uma significativa reação inflamatória (LONNROTH & DAHL, 2001; HOSZEK & ERICSON, 2008; LESSA et al., 2010) mesmo em concentrações menores que as utilizadas neste experimento.

As alterações de edema e necrose não foram expressivas e não demonstraram diferença estatística entre os grupos avaliados. No período de 7 dias, o cimento Meron com clorexidina a 18% demonstrou um tecido de granulação denso e a presença de células gigantes multinucleadas com diferença significativa em relação ao Grupo controle ($P=0,029$), que corresponde a resposta do organismo em tentar isolar o corpo estranho (SUKONTAPATIPARK et al., 2001; SOUZA et al., 2006; LESSA et al., 2010), porém o mesmo não foi encontrado nos outros tempos experimentais.

O tecido exposto ao cimento Ketac Cem com clorexidina em maiores concentrações apresentou uma menor capacidade de reparação tecidual nos períodos iniciais de tempo, uma vez que o Grupo KC18 demonstrou uma menor quantidade de fibroblastos jovens ($P=0,031$) e fibras colágenas ($P=0,044$) no período de tempo de 7 dias, o que está alinhado com estudos que evidenciaram uma diminuição do processo de cicatrização (LESSA et al., 2010; SANTOS et al., 2010) com redução da produção de proteína não-colágena e de fibras colágenas (SANTOS et al., 2014). Porém, as quantidades de fibroblastos jovens e fibras colágenas aumentaram ao longo dos períodos experimentais, sem diferença estatisticamente significativa ($P>0.05$).

Esses resultados mostram que, apesar dos cimentos com clorexidina a 18% terem apresentado reações celulares significativas nos períodos de tempo iniciais, após 30 dias, os cimentos mostraram-se biocompatíveis independente da adição de clorexidina. Porém, uma avaliação imuno-histoquímica dos tecidos nos permite fazer uma análise quantitativa mais detalhada sobre a presença de células fagocitárias (ZHOU et al., 2011; IBRAGUIMOV et al., 2012).

Estudos de imunohistoquímica fornecem diversos esclarecimentos sobre a presença dos diferentes fenótipos dos macrófagos nos tecidos submetidos à ação de fatores externos nocivos. Assim, a utilização dessa técnica, com marcadores bem definidos da inflamação, pode oferecer melhores resultados para uma avaliação altamente precisa da resposta inflamatória (MANOLEA et al., 2009).

Na análise imuno-histoquímica da quantidade de células gigantes multinucleadas, o grupo M18 apresentou diferença estatisticamente no tempo de 7 dias. Para o período de tempo de 30 dias, houve diferença significativa entre o grupo KC18 e os outros grupos avaliados ($P=0,001$) o que confirma os resultados encontrados na contagem de células gigantes da análise morfológica.

Na contagem dos macrófagos, os grupos com clorexidina a 18% foram mais expressivos que os outros grupos, no período de tempo de 7 dias, para os dois cimentos testados ($P=0,001$). No tempo de 15 dias, a quantidade de macrófagos foi mais expressivo no Grupo KC ($P=0,001$). Já no tempo de 30 dias, os grupos do cimento Ketac Cem com adição de clorexidina nas duas concentrações avaliadas de 10% e 18%, demonstraram maior quantidade de macrófagos ($P=0,001$).

Os resultados da análise imuno-histoquímica demonstraram, portanto, que os cimentos com adição de clorexidina a 18% apresentaram uma maior quantidade de células fagocitárias nos períodos de tempo iniciais, e que após 30 dias, esses resultados permaneceram apenas para o cimento Ketac Cem. O número elevado de células fagocitárias no período de 30 dias corrobora com outros estudos que avaliaram a biocompatibilidade *in vivo* e verificaram que as células gigantes e macrófagos persistiram mesmo após um longo período de avaliação (COSTA et al., 2011; CUNHA et al., 2011). Sugere-se que a maior concentração de clorexidina associada ao CIV estimula um maior número de macrófagos, que tendem a formar mais células gigantes com o intuito de facilitar a degradação de resquícios deste material (CUNHA et al., 2011; SANTOS et al., 2014)

Diante dos eventos avaliados, não se sabe também se a CX é liberada apenas na superfície ou também nas seções mais profundas destes cimentos. Se a CX for liberada apenas na superfície, um efeito antibacteriano reforçado poderia ser esperado com o tempo, a partir da degradação superficial expondo uma

superfície nova para liberar CX (FARIA et al., 2009). Por outro lado, a ação da CX ao longo do tempo interagindo com estruturas celulares poderia levar a danos celulares diretos ou inibição do seu metabolismo. Este efeito contínuo da CX sobre as células poderia ocorrer se considerarmos sua reconhecida substantividade (SEHGAL et al., 2007; SANTOS et al., 2014).

Os resultados deste experimento sugerem que a incorporação da CX nos CIVs gera em curto prazo um potencial citotóxico capaz de estimular danos celulares locais, a partir de infiltrado inflamatório crônico, tecido de granulação persistente e diminuição da rápida capacidade reparativa. Apesar de não ter sido observado diferenças teciduais significativas com 30 dias, novos experimentos com um tempo de acompanhamento maior poderia confirmar se o uso da CX *in vivo*, à longo prazo, não seria danoso aos tecidos, o que poderia fortalecer a indicação da CX nestes cimentos.

Com base nos resultados obtidos, o cimento Meron com solução de clorexidina a 10% foi o que apresentou os melhores resultados de biocompatibilidade e não teve suas propriedades de microdureza e resistência ao cisalhamento afetadas, sendo assim o mais indicado para uso clínico. O Ketac Cem com solução de clorexidina a 18% apesar de ter apresentado um aumento na resistência de união ao cisalhamento, foi o que mais influenciou o processo inflamatório com uma reparação tecidual mais lenta.

7 CONCLUSÃO

A adição de clorexidina modificou de forma negativa as propriedades mecânicas de resistência à tração diametral e resistência à compressão, porém a microdureza e a resistência ao cisalhamento não foram afetadas. A análise de histocompatibilidade evidenciou que a intensidade das alterações histológicas nos cimentos com CX demonstraram ser concentração-dependente, notoriamente a 18%. O cimento Meron-CX-10% foi o que apresentou os melhores resultados de biocompatibilidade e o Ketac-CX-18% influenciou mais no processo inflamatório com uma reparação tecidual mais lenta.

REFERÊNCIAS*

AFONSO E, LLAURADÓ M, GALLART E. The value of chlorhexidine gluconate wipes and prepacked washcloths to prevent the spread of pathogens — A systematic review Aust Crit Care. 2013; 26(4):158-66.

AHLUWALIA P, CHOPRA S, THOMAS AM. Strength characteristics and marginal sealing ability of chlorhexidine-modified glass ionomer cement: An in vitro study. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2012; 30(1):41-6.

AIKAWA E. Immunohistochemistry. In: DUCHEYNE P, editor. Comprehensive Biomaterials – Metallic, Ceramic and Polymeric Biomaterials. Amsterdam: Elsevier Science; 2011. v.3, p.277-90.

ATKINSON AS, PEARSON GJ. The evolution of glass ionomercements. British Dental Journal 1985; 159(10):335–7.

BAIG MS, FLEMING GJP. Conventional glass-ionomer materials: A review of the developments in glass powder, polyacid liquid and the strategies of reinforcement. J Dent. 2015; In Press.

BECCI ACO, MARTI LM, ZUANON ACC, BRIGHENTI FL, SPOLIDÓRIO DMP, GIRO EMA. Influence of the addition of chlorhexidine diacetate on bond strength of a high-viscosity glass ionomer cement to sound and artificial caries-affected dentin. Rev Odontol UNESP. 2014; 43(1):1-7.

BOAVENTURA JCM, BERTOLINI MJ, PADOVANI GC, OLIVEIRA Jr MRB, ZAGHETE MA, OLIVEIRA OB, et al. Tissue response to experimental dental cements prepared from a modified power glass composition. Dent Mater J. 2012; 31(4):583-92.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

BONEZ PC, ALVES CFS, DALMOLIN TV, AGERTT VA, MIZDAL CR, FLORES VC, et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. *Am J Infect Control*. 2013; 41(12):119-22.

CACCIAFESTA V, SFONDRINI MF, STIFANELLI P, SCRIBANTE A, KLERSY C. Effect of chlorhexidine application on shear bond strength of brackets bonded with a resin-modified glass ionomer. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 129(2):273-6.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. Guide to the Care and Use of Experimental Animals, 2 vols. Ottawa, Ontario: CCAC; 1981.

CASTILHO ARF, DUQUE C, NEGRINI TC, SACONO NT, PAULA AB, COSTA CAS, et al. In vitro and in vivo investigation of the biological and mechanical behaviour of resin-modified glass-ionomer cement containing chlorhexidine. *J Dent*. 2013; 41(1):155–63.

CHAU NPT, PANDIT S, CAI J, LEE M, JEON J, Relationship between fluoride release rate and anti-cariogenic biofilm activity of glass ionomer cements. *Dent Mater*. 2014; 31(4):e100-8.

CHEUNG HY, WONG MM, CHEUNG S, LIANG LY, LAM YW, CHIU SK. Differential actions of chlorhexidine on the cell wall of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *PLoS One*. 2012; 7(5):e36659.

COSTA CA, RIBEIRO AP, GIRO EM, RANDALL RC, HEBLING J. Pulp response after application of two resin modified glass ionomer cements (RMGICs) in deep cavities of prepared human teeth. *Dent Mater*. 2011; 27(7):e158-70.

CUNHA SA, RACHED FJ, ALFREDO E, LEÓN JE, PEREZ DE. Biocompatibility of sealers used in apical surgery: a histological study in rat subcutaneous tissue. *Braz Dent J*. 2011; 22(4):299-305.

DEEPALAKSHMI M, POORNI S, MIGLANI R, INDIRA R, RAMACHANDRAN S. Evaluation of the antibacterial and physical properties of glass ionomer cements containing chlorhexidine and cetrimide: An in-vitro study. *Indian J Dent Res.* 2010; 21(4):552-6.

DU X, HUANG X, HUANG C, FRENCKEN JE, YANG T. Inhibition of early biofilm formation by glass-ionomer incorporated with chlorhexidine in vivo: a pilot study. *Aust Dent J.* 2012; 57(1):58–64.

DURSUN E; GOFF SL, RUSE DN, ATTAL JP. Effect of chlorhexidine application on the longterm shear bond strength to dentin of a resin modified glass ionomer. *Oper Dent.* 2013; 38(3):275-81.

EDMISTON Jr CE, PHARM BB, RUCINSKI MC, HENEN C, GRAHAM MB, LEWIS BL. Reducing the risk of surgical site infections: Does chlorhexidine gluconate provide a risk reduction benefit? *Am J Infect Control.* 2013; 41(5):S49-S55.

ENAN ET, HAMMAD SM. Microleakage under orthodontic bands cemented with nano-hydroxyapatite-modified glass ionomer an in vivo study. *Angle Orthod.* 2013; 83(6):981-6.

FARIA G, CARDOSO CR, LARSON RE, SILVA JS, ROSSI MA. Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 23(4):256-65.

FARRET MM. Inclusão de digluconato de clorexidina em cimentos de ionômero de vidro para cimentação: análise das propriedades mecânicas, ação antibacteriana e liberação de clorexidina [tese]. Porto Alegre: PUC-RS, 2009.

FARRET MM, LIMA EM, MOTA EG, OSHIMA HMS, BARTH V, OLIVEIRA SD. Can we add chlorhexidine into glass ionomer cements for band cementation? *Angle Orthod.* 2011; 81(3):496-502.

FARRET MM, LIMA EMS, OSHIMA HMS, MOTA EG. Solução aquosa antimicrobiana contendo digluconato de clorexidina e ácido tartárico, processo para sua obtenção, e cimento ortodôntico antimicrobiano. Brasil. Patente WO2011123915A1. 2011 Out 13.

FARRET MM, LIMA EM, MOTA EG, OSHIMA HMS, MAGUILNIK G, SCHEID PA. Assessment of the mechanical properties of glass ionomer cements for orthodontic cementation. *Dental Press J Orthod*. 2012; 17(6):154-9.

FERREIRA VF, COTRIM-FERREIRA F, COTRIM FERREIRA A. Ortodontia Clínica: Tratamento com aparelhos fixos. São Paulo: Artes Médicas, 2013.

FRANZ S, RAMMELT S, SCHARNWEBER D, SIMON JC. Immune responses to implants – A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials*. 2011; 32(28):6692–709.

FRENCKEN JE, IMAZATO S, TOI C, MULDER J, MICKENAUTSCH S, TAKAHASHI Y, et al. Antibacterial effect of chlorhexidine-containing glass ionomer cement in vivo: a pilot study. *Caries Res*. 2007; 41(1):102–7.

GARCIA LFR, SOUZA FCP, TEÓFILO JM, CESTARI A, CALEFI PS, CIUFFI KJ, et al. Synthesis and biocompatibility of an experimental glass ionomer cement prepared by a non-hydrolytic sol-gel method. *Braz. Dent. J*. 2010; 21(6):499-507.

GIANNELLI M, CHELLINI F, MARGHERI M, TONELLI P, TANI A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro*. 2008; 22(2):308-17.

GONÇALVES TS, MENEZES LM, RIBEIRO LG, LINDHOLZ CG, SILVA RM. Differences of Cytotoxicity of Orthodontic Bands Assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomed Res Int*. 2014; 2014(143283):1-7.

GRECCA FS, KOPPER PM, SANTOS RB, FOSSATI AC, CARRARD VC, ACASIGUA GA, et al. Biocompatibility of RealSeal, its primer and AH Plus

implanted in subcutaneous connective tissue of rats. J Appl Oral Sci. 2011; 19(1):52-6.

HATTON PV, HURRELL-GILLINGHAM K, BROOK IM. Biocompatibility of glass-ionomer bone cements J Dent. 2006; 34(8):598-601.

HOOK ER, OWEN OJ, BELLIS CA, HOLDER JA, O'SULLIVAN DJ, BARBOUR ME. Development of a novel antimicrobial-releasing glass ionomer cement functionalized with chlorhexidine hexametaphosphate nanoparticles. J Nanobiotechnology. 2014; 12(3):1-9.

HOSZEK A; ERICSON D In vitro fluoride release and the antibacterial effect of glass ionomers containing chlorhexidine gluconate. Oper Dent. 2008; 33(6):696-701.

HUANG X, YANG T, ZHAO S, HUANG C, DU X. Anti-biofilm Effect of Glass Ionomer Cements Incorporated with Chlorhexidine and Bioactive Glass. J Wuhan Univ Technol-Mater Sci Ed. 2012; 27(2):270-5.

IBRAGUIMOV A, OWENS L, SU J, TANG L. Stability Analysis of a Model for Foreign Body Fibrotic Reactions. Comput Math Methods Med. 2012; 13(6):01-11.

INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.

IZ SG, ERTUGRUL F, EDEN E, GURHAN SID. Biocompatibility of glass ionomer cements with and without chlorhexidine. Eur J Dent. 2013; 7(1):89-93.

KASHANI M, FARHADI S, RASTEGARFARD N. Comparison of the Effect of Three Cements on Prevention of Enamel Demineralization Adjacent to Orthodontic Bands. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects. 2012; 6(3):89-93.

KLAI S, ALTENBURGER M, SPITZMÜLLER B, ANDERSON A, HELLWIG E, AL-AHMAD A. Antimicrobial effects of dental luting glass ionomer cements on *Streptococcus mutans*. *ScientificWorldJournal*. 2014; 23(1):1-7.

KORKMAZ FM, TÜZÜNER T, BAYGIN O, BURUK CK, DURKAN R, BAGIS B. Antibacterial activity, surface roughness, flexural strength, and solubility of conventional luting cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixtures. *J Prosthet Dent*. 2013; 110(2):107-15.

LESSA FCR, ARANHA AMF, NOGUEIRA I, GIRO EMA, HEBLING J, COSTA CAS. Toxicity of chlorhexidine on odontoblast-like cells. *J Appl Oral Sci*. 2010; 18(1):50-8.

LEWINSTEIN I, ZENZIPER E, BLOCK J, KFIR A. Incorporation of chlorhexidine diacetate in provisional cements: antimicrobial activity against *Streptococcus mutans* and the effect on tensile strength in vitro. *Int Endod J*. 2012; 45(1):1010–7.

LONNROTH EC, DAHL JE. Cytotoxicity of dental glass ionomers evaluated using dimethylthiazol diphenyltetrazolium and neutral red tests. *Acta Odontol Scand*. 2001; 59:34-9.

MANOLEA H, MOGOANTA L, MARGARITESCU CL, DEVA V, SURLIN P, CARAIVAN O. Immunohistochemical aspects of the evaluation of the inflammatory answer of the dental pulp. *Rom J Morphol Embryol*. 2009; 50(2):207-12.

MARTI LM, MATA M, SANTOS BF, AZEVEDO ER, GIRO EMA, ZUANON ACC. Addition of chlorhexidine gluconate to a glass ionomer cement: a study on mechanical, physical and antibacterial properties. *Braz Dent J*. 2014; 25(1):33-7.

MARTI LM, AZEVEDO ER, MATA M, GIRO EMA, ZUANON ACC Effect of chlorhexidine gluconate on porosity and compressive strength of a glass ionomer cement. *Rev Odontol UNESP*. 2014; 43(4):236-40.

MATOS LL, TRUFELLI DC, MATOS MGL, PINHAL MAS. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice *Biomark Insights*. 2010; 9(5):9-20.

MILLETT DT, DOUBLEDAY B, ALATSARIS M, LOVE J, WOOD D, LUTHER F, et al. Chlorhexidine-modified glass ionomer for band cementation? an *in vitro* study. *J Orthod*. 2005; 32(1):36–42

MONTEIRO ASF, MACEDO LGS, MACEDO NL, FEITOSA FA, TOYOSHIMA T. Biocompatibility of a chlorhexidine local delivery system in a subcutaneous mouse model. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011; 16(2):278-84.

MOURA MS, DE MELO SIMPLÍCIO AH, CURY JA. In-vivo effects of fluoridated antiplaque dentifrice and bonding material on enamel demineralization adjacent to orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006; 130(3):357-63.

MURRAY PJ, WYNN TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2012; 11(11):723-37.

NAKAJO K, IMAZATO S, TAKAHASHI Y, KIBA W, EBISU S, TAKAHASHI N. Fluoride released from glass-ionomer cement is responsible to inhibit the acid production of caries-related oral streptococci. *Dent Mater*. 2009; 25(1):703-8.

PALMER G, JONES FH, BILLINGTON RW, PEARSON GJ. Chlorhexidine release from an experimental glass ionomer cement, *Biomaterials*. 2004; 25(1):5423–31.

PITHON MM, SANTOS RL, OLIVEIRA MV, SANT'ANNA EF, RUELLAS ACO. Avaliação da resistência ao cisalhamento de dois compósitos colados em superfície condicionada com primer autocondicionante. *Dental Press J Orthod*. 2011; 16(2):94-9.

RIBEIRO LGM, HASHIZUME LN, MALTZ M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: A systematic review of the literature. *J Dent*. 2007; 35(5):359-70.

RODRIGUEZ IA, FERRARA CAR, CAMPOS-SANCHEZ F, ALAMINOS M, ECHEVARRÍA JU, CAMPOS A. An In Vitro Biocompatibility Study of Conventional and Resin-modified Glass Ionomer Cements. J Adhes Dent. 2013; 15(6):541-6.

SANDERS BJ, GREGORY RL, MOORE K, AVERY DR. Antibacterial and physical properties of resin modified glass-ionomers combined with chlorhexidine. J Oral Rehabil. 2002; 29(1):553–8.

SANTOS RL, PITHON MM, FERNANDES AB, CABRAL MG, RUELLAS AC. Biocompatibility of orthodontic adhesives in rat subcutaneous tissue. J Appl Oral Sci. 2010; 18:503-8.

SANTOS RL, MOURA MFL, CARVALHO FG, GUÊNES GMT, ALVES PM, PITHON MM. Histological analysis of biocompatibility of ionomer cements with an acid-base reaction. Braz Oral Res. 2014; 28(1):1-7.

SEHNEM DP, BENAMOR L, JESUS LS, VALENTIM RM, SOUZA ETG, ZAMBUZZI WF, TAKAMORI ER. Métodos alternativos para avaliação da citotoxicidade de biomateriais Rede Cuid Saúde. 2012; 6(2):1-12.

SEHGAL V, SHETTY VS, MOGRA S, BHAT G, EIPE M, JACOB S, et al. Evaluation of antimicrobial and physical properties of orthodontic composite resin modified by addition of antimicrobial agents--an in-vitro study. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2007; 131:525-9.

SFONDRINE MF, CACCIAFESTAB V, NOGAC E, SCRIBANTE A, KLERSY C. In Vitro Bond Strength Evaluation of Four Orthodontic Cements. J Adhes Dent. 2010; 12(2):131-5.

SHAHID S, HASSAN U, BILLINGTON RW, HILL RG, ANDERSON P. Glass ionomer cements: Effect of strontium substitution on esthetics, radiopacity and fluoride release. Dent Mater. 2014; 30(3):308–13.

SOUZA PP, ARANHA AM, HEBLING J, GIRO EM, COSTA CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of contemporary resin-modified glass-ionomer cements. *Dent Mater*. 2006; 22(9):838-44.

SOUZA LB, AQUINO SG, SOUZA PPC, HEBLING J, COSTA CAS. Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine to the odontoblast cell line MDPC-23. *Am J Dent*. 2007;20(6):400-4.

SUKONTAPATIPARK W, EL-AGROUDI MA, SELLISETH NJ, THUNOLD K, SELVIG KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances. A scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod*. 2001; 23(5):475-84.

TAKAHASHI Y, IMAZATO S, KANESHIRO AV, EBISU S, FRENCKEN JE, TAY FR. Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach. *Dent Mater J*. 2006; 22(1):647–52.

TÜRKÜN L.S.; TÜRKÜN M.; ERTUGRUL F.; ATES M.; BRUGGER S Long-term antibacterial effects and physical properties of a chlorhexidine-containing glass ionomer cement. *J Esthet Restor Dent*. 2008; 20(1):29-44.

TUZUNER T, KUSGÖZ A, ER K, DEMIR TT, BURUK K, KEMER B. Antibacterial activity and physical properties of conventional glass-ionomer cements containing chlorhexidine diacetate/cetrimide mixturesjerd.. *J Esthet Restor Dent*. 2011; 23(1):46–56.

UYSAL T, RAMOGLU SI, ERTAS H, ULKER M. Microleakage of orthodontic band cement at the cement-enamel and cement-band interfaces. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2010; 137(4):534-9.

WILLIAMS DF. On the mechanisms of biocompatibility *Biomaterials* 2008; 29(20):2941–53.

WILSON AD, BATCHELOR RF. Dental silicate cements I. The chemistry of erosion. *J of Dent Res* 1967; 46(5):1078–85.

WILSON AD, KENT BE. The glass-ionomer cement: A new translucent dental filling material. *J Appl Chem Biotechnol.* 1971; 21(11):313-8.

YAMANAKA Y, SHIGETANI K, YOSHIBA N, YOSHIBA N, OKIJI T. Immunohistochemical analysis of subcutaneous tissue reactions to methacrylate resin-based root canal sealers. *Int Endod J.* 2011; 44(7):669–75.

ZHOU J, TSAI Y, WENG H, BAKER DW, TANG L. Real time monitoring of biomaterial-mediated inflammatory responses via macrophage-targeting NIR nanoprobe. *Biomaterials.* 2011; 32(35):9383-90.

ANEXO 1– Protocolo utilizado para confecção de lâminas para análise imuno-histoquímica

1) Desparafinização:

- Xilol I (15 minutos) - Temperatura Ambiente
- Xilol II (15 minutos) – Temperatura Ambiente

2) Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:

- Álcool etílico absoluto I – 5 minutos
- Álcool etílico absoluto II – 5 minutos
- Álcool etílico absoluto III – 5 minutos
- Álcool etílico 95° GL – 5 minutos
- Álcool etílico 80° GL – 5 minutos

4) Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95^o, à temperatura ambiente (10 minutos)

5) Passagem em água corrente (10 minutos)

6) Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

7) Recuperação antigênica (Tabela 3).

8) Passagem em água corrente (10 minutos)

9) Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

10) Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);

11) Passagem em água corrente (10 minutos)

12) Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

14) Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCL, pH 7,4 (5 minutos cada);

15) Incubação dos cortes com o anticorpo primário (CD68), em solução diluente (Antibody diluent with background reducing components, Dako North America Inc, Carpinteria, CA, USA) (60 minutos);

16) Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCL, pH 7,4 (5 minutos cada);

17) Incubação com anticorpo secundário, (Advance HRP Link, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (30 minutos);

- 18) Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCL, pH 7,4 (5 minutos cada);
- 19) Incubação com complexo estreptoavidina-HRP (Streptavidin-HRP, Dako North American Inc., Carpinteria, CA, USA) (30 minutos);
- 20) Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCL, pH 7,4 (5 minutos cada);
- 21) Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (Liquid DAB + Substrate, Dako North American Inc., Carpinteria, CA, USA) (7 minutos);
- 22) Passagem em água corrente (10 minutos)
- 23) Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- 24) Contra-coloração com hematoxilina de Mayer à temperatura ambiente (5 minutos).
- 25) Passagem em água corrente (10 minutos)
- 26) Desidratação em cadeia de etanóis:
- Álcool etílico absoluto I (2 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (10 minutos);
- 27) Três passagens em xilol;
- Xilol I (5 minutos);
 - Xilol II (5 minutos);
 - Xilol III (5 minutos);
- 28) Montagem em resina Permout (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA)

ANEXO 2 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



Universidade Federal de Campina Grande
Centro de Saúde e Tecnologia Rural
Comitê de Ética em Pesquisa
Av. Sta Cecília, s/n, Bairro Jatobá, Rodovia Patos,
CEP: 58700-970, Cx postal 64, Tel. (83) 3511-3045



Ofício CEP nº 68/2011

Protocolo CEP nº 082011

Caro. Dr. Rogério Lacerda dos Santos

Dr. Santos;

O projeto de pesquisa submetido a este comitê sob sua coordenação intitulado "Biocompatibilidade de compósitos utilizados em cirurgia para tracionamento dental: Estudo *in vivo*", foi aprovado após a avaliação dos relatores do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde e Tecnologia Rural - CSTR / UFCG.

Atenciosamente,

Patos, 28 de Outubro de 2011.

Onaldo Guedes Rodrigues
Coordenador do CEP