

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E
AÇÃO COMUNITÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MANUAL DOS TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE DOS
MATERIAIS ODONTOLÓGICOS

Anápolis

2019

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E
AÇÃO COMUNITÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

MANUAL DOS TESTES DE BIOCAMPATIBILIDADE DOS
MATERIAIS ODONTOLÓGICOS

Produção técnica do programa de pós-graduação da odontologia para obtenção da aprovação na disciplina de Métodos e Técnicas de Investigação Científica.

Alessandra Rodrigues Fonseca Tavares
Denise Campos Amaral
Pollyana Sousa Lobo El Zayek

Anápolis

2019

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO

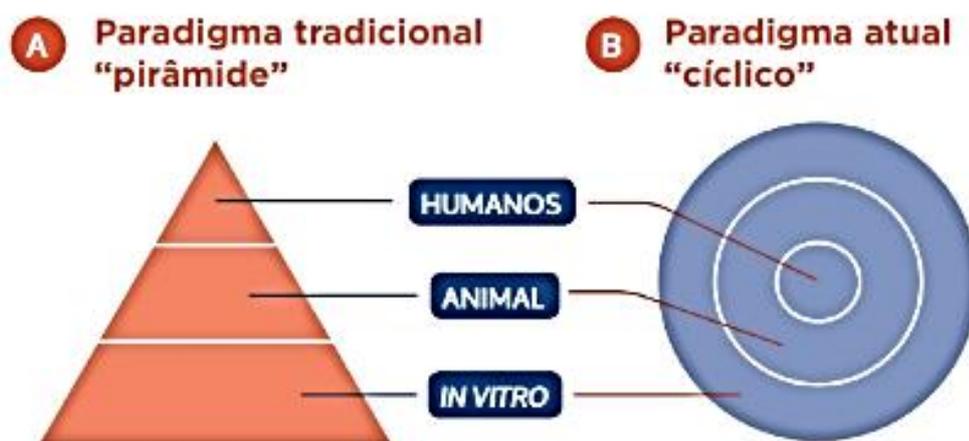
II. DESENVOLVIMENTO

1. Testes em animais
2. Testes em seres humanos
3. Vantagens e limitações dos testes de biocompatibilidade.
4. Exemplos de artigos que utilizam os testes de biocompatibilidade

III.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

I. INTRODUÇÃO

A análise da biocompatibilidade de materiais dentários tem se baseado em um paradigma sequencial, em que as análises *in vitro* encontram-se na base da pirâmide, seguidas pelos testes em animais e finalmente por ensaios clínicos em seres humanos. A figura 1 exemplifica essa pirâmica:



Paradigmas de análise da biocompatibilidade de materiais dentários. **A** Paradigma tradicional baseado em uma pirâmide, em que os modelos laboratoriais atuam como um *screening* para seleção de materiais a serem empregados em seres humanos. **B** Paradigma atual cíclico, cuja estrutura baseia-se na inter-relação entre os diversos modelos de estudo para análise biológica de materiais.

Fonte: Estrela 2018, Pag.

Inicialmente, o termo biocompatibilidade era definido como a “[...] capacidade de um material em não causar qualquer resposta no tecido onde o mesmo fosse inserido”. Essa definição vem sendo atualizada ao longo dos anos a partir do avanço das técnicas de pesquisa. Assim, outros pesquisadores consideram que o termo biocompatibilidade caracteriza a “habilidade de um material em atuar com uma resposta apropriada do hospedeiro quando aplicado da forma recomendada”. A partir dessa definição, foi determinada a importância da presença da interface ativa entre materiais e sistemas biológicos, a qual levou ao estabelecimento da necessidade de se avaliar, em detalhe, a biocompatibilidade de materiais usados em odontologia nos seguintes pontos:

1. Ao inserir o material em um ambiente biológico será criada uma interface dinâmica entre material/tecido: o material irá gerar uma resposta tecidual, e o tecido irá gerar

uma resposta no material. Assim, todos os materiais irão sofrer algum grau de alteração a partir de sua inter-relação com o hospedeiro, e sua biocompatibilidade, com o decorrer do tempo, pode ser afetada devido a essa interação.

2. As reações na interface material/tecido são específicas para o tecido no qual a mesma é criada: o mesmo material pode gerar diferentes respostas biológicas quando aplicados em tecidos com diferentes características ou tipos celulares.
3. Os materiais aplicados em tecidos biológicos não pertencem ao organismo: esse conceito é primordial para o entendimento da durabilidade do material inserido no organismo vivo. A interação do material com o tecido biológico pode gerar, ao longo do tempo, alterações no material que muitas vezes requerem sua substituição para que seja mantida a adequada função.
4. Customização da interfacematerial/tecido: o entendimento da relação do material com o tecido é fundamental para o desenvolvimento de materiais que se adaptem ao microambiente biológico ao qual o material está inserido, de forma que induza a resposta celular desejada, surgindo, assim, o conceito de biomateriais. O ramo atual da engenharia tecidual busca o desenvolvimento de biomateriais que induzam uma resposta celular específica, a qual tem como objetivo principal a completa substituição do biomaterial pelo novo tecido.

Segundo Willians em 2008, “Biocompatibilidade é a habilidade do material de prover adequada função para determinada terapia, sem causar qualquer efeito indesejado local ou sistêmico no hospedeiro, porém gerando uma resposta celular ou tecidual apropriada para aquela situação específica, otimizando a performance clínica.”

Para o entendimento e aproveitamento deste manual é importante o conhecimento da área básica da matriz curricular do curso de odontologia bem como a importância clínica que reflete a realização desses testes na melhoria da qualidade de vida do paciente.

Este manual tem como objetivo servir de referência e guia para a realização dos testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos.

Com este manual o acadêmico terá instruções de como devem ser realizados os testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos.

II. DESENVOLVIMENTO

1. TESTES EM ANIMAIS.

1.1. Os testes em animais para análise de materiais dentários são classificados em duas categorias principais:

1.1.1. Análise da segurança biológica - neste tópico estão inseridos:

- a. análise da toxicologia sistêmica, aguda e crônica,
- b. potencial de hipersensibilidade,
- c. habilidade de causar ulceração e desestrururação de membranas mucosas e tecidos conjuntivos circundantes,
- d. genotoxicidade,
- e. toxicologia reprodutiva.

Nessa análise, a dose, a forma e o local de aplicação podem ser selecionados de modo a simular situações extremas, as quais não poderiam ser testadas em seres humanos. Os mesmos tipos de análise podem ser empregados para diferentes materiais, de forma a avaliar sua segurança biológica, independentemente do seu real sítio de aplicação clínica.

1.1.2. Análise do sucesso clínico:

Compreende a análise da capacidade do material em resultar na resposta biológica desejada para sua função específica quando aplicado no seu sítio de uso. Neste tipo de análise, deseja-se simular, ao máximo, as condições de dosagem, forma de apresentação, forma de aplicação e tecido de implantação que serão encontradas na situação clínica.

1.2. Recomendações Gerais Para Pesquisas em Animais

1.2.1. Ética em experimentação animal

Emprego de animais em pesquisa: a decisão de usar animais em pesquisa requer pensamento crítico, julgamento e análise. Tem que gerar a expectativa de que os resultados obtidos irão gerar conhecimento novo significativo ou seja, tem que efetivamente produzir resultados que levarão a um aumento no bem estar do ser humano ou de outros animais.

Requer aprovação de Conselhos de Ética, que julgam a relevância científica da pesquisa. A justificativa da necessidade do uso de animais baseia-se no Conceito dos três Rs:

- a. Substituição (Replacement): de animais por modelo in vitro e de animais maiores por menores.

- b. Refinamento (Refinement): promover bem estar aos animais
- c. Redução (Reduction): diminuir o uso de animais, sem causar perda da qualidade dos dados obtidos.

É prerrogativa básica que todo o pessoal envolvido em estudos com animais deve receber treinamento adequado e a equipe de pesquisa apresente experiência sólida nessa linha de trabalho.

1.2.2. Seleção do número de animais para a pesquisa.

Minimização do número de animais a serem empregados no estudo, sem que haja comprometimento da qualidade dos resultados.

1.2.3. Padronização do ambiente.

O microambiente e o macroambiente devem ser adequadamente controlados.

Padrões de temperatura, umidade, iluminação, ciclos de luz/escuridão e qualidade do ar devem ser estabelecidos de acordo com a espécie empregada.

1.2.4. Procedimentos cirúrgicos. Seguir os passos:

- a. Toda e qualquer intervenção cirúrgica deve ser feita sob anestesia.
- b. Treinamento criterioso do operador.
- c. Seguir critérios de biossegurança com rigor.
- d. Acompanhamento pós cirúrgico e recuperação anestésica.

1.2.5. Eutanásia

É o ato de “matar” humanamente o animal pelo emprego de técnicas que induzam a inconsciência de forma rápida e a morte sem dor ou estresse. Uso de agentes químicos: barbitúricos, alta dosagem de anestésico ou gás carbônico.

1.3. TÉCNICAS CIRÚRGICAS

Testes de implantação em tecido conjuntivo subcutâneo são comumente realizados em ratos para análise da reação tecidual. Proposta pelo “Grupo de Pesquisa em Reparação Pulpar e Biocompatibilidade dos Materiais Odontológicos”, baseada em diversas pesquisas com materiais resinosos em que a resposta tecidual foi muito semelhante a observada em polpas de dentes humanos.

1.3.1. Implantação em subcutâneo de ratos

Metodologia:

- a. Seleção e manutenção dos animais experimentais:
 - ✓ Ratos machos ou fêmeas(200 a 300g)
 - ✓ De mesma origem
 - ✓ Padronizados: saúde, idade e peso corporal

- ✓ Biotério climatizado com iluminação: 12 hs de luz/12 hs de escuridão
 - ✓ Temperatura(21-25°C) padronizada
 - ✓ Recebem ração balanceada e água a vontade
- b. Procedimento anestésico:
- ✓ Pode ser intramuscular ou inalatória e a dose da droga depende do peso do animal.
- c. Procedimentos pré-operatórios:
- ✓ Tricotomia da região dorsal para eliminar a possibilidade de penetração de pelos na loja cirúrgica.
 - ✓ Desinfecção da área da tricotomia feita com álcool/iodado e álcool/éter.



Fonte: Estrela 2001, Pag. 1

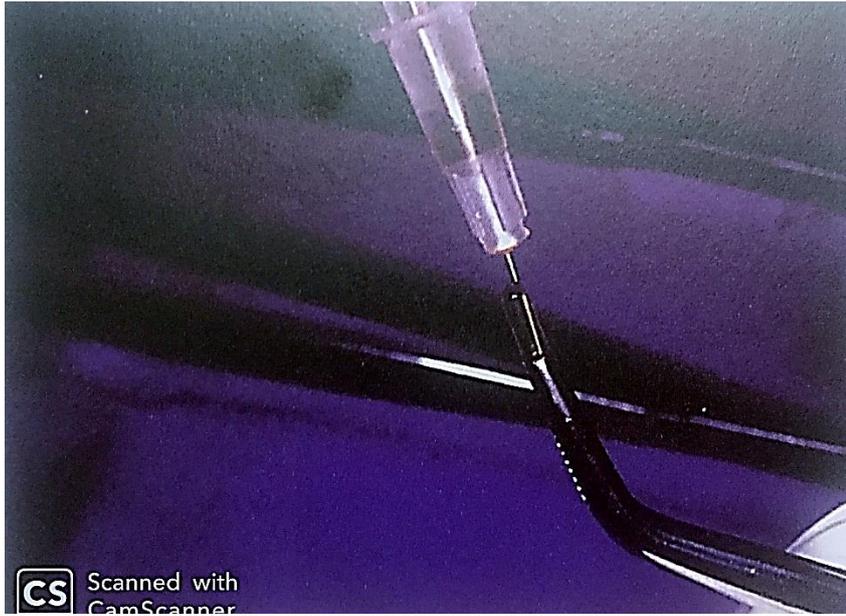
- d. Procedimento cirúrgico:
- ✓ Realizado em ambiente asséptico.
 - ✓ Incisão central de 10 mm.
 - ✓ Divulsionar o tecido subcutâneo com tesoura de ponta romba ou porta agulha, para se obter duas lojas cirúrgicas, uma a cada lado da incisão.
 - ✓ Não deve haver comunicação com as lojas cirúrgicas, o que prejudicará a avaliação da resposta tecidual frente aos materiais experimentais.
 - ✓ Caso ocorra sangramento durante a divulsão tecidual pode indicativo de ter atingido áreas mais profundas: essa loja cirúrgica será descartada.



Fonte: Estrela 2001, Pag. 2

e. Preparo dos materiais para implantação

- ✓ Tubos de polietileno com 1,5 mm de diâmetro interno e 10 mm de comprimento.
- ✓ Uma das extremidades é selada com instrumento aquecido para evitar o extravasamento do material.
- ✓ O material pode ser inserido nos tubos por meio de seringas de insulina ou seringas lentulo estéreis, ou com auxílio de espátulas e condensadores nos casos de materiais pastosos, cimentos ou resinosos.



Fonte: Estrela 2001, Pag.

f. Implantação na loja cirúrgica

- ✓ Os tubos são introduzidos com o auxílio de uma pinça curva.
- ✓ Deve-se evitar o contato da abertura do túbulo com o tecido conjuntivo do animal.
- ✓ Devem permanecer paralelos a incisão.
- ✓ Deve-se evitar o contato da abertura do túbulo com o tecido conjuntivo do animal.



Fonte: Estrela 2001, Pag. 3



Fonte: Estrela 2001, Pag. 4

- ✓ Devem permanecer paralelos a incisão
- ✓ Realizar a sutura.
- ✓ Acompanhamento deve ser feito de 7 a 10 dias.
- ✓ Sutura removida após 7 dias sob anestesia.



Fonte: Estrela 2001, Pag. 5

g. Coleta das Amostras

- ✓ Os períodos de avaliação são determinados de acordo com os objetivos do estudo.
- ✓ O grupo de pesquisa sugere períodos curtos de 7 dias, intermediários de 30 dias e longos de 90 dias.
- ✓ Decorridos os períodos experimentais, os animais são anestesiados.
- ✓ Realizada nova tricotomia.
- ✓ Faz-se a biópsia excisional da área do implante com suficiente margem de segurança.
- ✓ Após a biópsia, os animais são submetidos a eutanásia.
- ✓ As amostras devem ser imersas em solução fixadora e encaminhadas para os procedimentos histopatológicos.

1.3.2. Capeamento Pulpar em Dentes de Ratos.

- ✓ Seleção dos animais experimentais:
 - Ratos, machos ou fêmeas, sendo os mesmos parâmetros descritos para o teste de implantação em subcutâneo realizados, no que se refere a peso, manutenção dos animais, procedimento anestésico e eutanásia.
 - Com o objetivo de padronizar a conformação das cavidades, permitindo uma comparação mais segura entre os grupos, o grupo de pesquisa faz o procedimento de capeamento pulpar apenas nos primeiros molares, mas pode ser realizado nos primeiros e segundos molares superiores dos animais.
- ✓ Preparo cavitário:
 - Anestesia
 - Abertura bucal feita por meio de anéis metálicos adaptados aos incisivos superiores e inferiores
 - Brocas carbide esférica 0,5 e cone invertida 33,5, em baixa rotação e abundante irrigação.
 - São preparadas cavidades com 1,7 mm de profundidade e 1,3 mm de diâmetro, as quais são copiosamente lavadas com água destilada,

resultando na formação de cavidades bastante profundas, com remanescente dentinário menor que 0,5 mm.

- ✓ Procedimento de exposição pulpar:
 - Realizada de forma cuidadosa, por meio de pressão manual com a ponta de uma sonda exploradora afiada.
 - Hemorragia contida por meio de lavagem com soro fisiológico e secagem com cones de papel absorvente esterilizados.
- ✓ Aplicação dos materiais:
 - Aplicados sobre dentina profunda ou exposição pulpar, simulando todos os passos empregados clinicamente.
 - Cuidado especial quando aplicado sobre a polpa, evitando pressão excessiva para não introduzir material no interior da polpa.
 - As cavidades são restauradas cuidadosamente com ionômero de vidro ou resina composta.
- ✓ Coleta das amostras:
 - Realizada após 7, 30 e 60 dias.
 - Animais experimentais são submetidos a eutanásia(overdose de anestésico, por exemplo).
 - Maxilares são removidos em bloco, e então fixados e descalcificados em EDTA ou solução de Morse.

2. TESTES EM SERES HUMANOS

Os testes em seres humanos são considerados padrão-ouro para avaliação de qualquer parâmetro da performance de materiais dentários, incluindo a resposta biológica.

2.1. Diversos delineamentos experimentais podem ser empregados para análise em seres humanos, como os exemplificados abaixo:

2.1.1. Estudos retrospectivos:

Os dados são obtidos a partir das fichas clínicas dos pacientes, em períodos posteriores à realização do procedimento clínico, tais como relatos de sensibilidade dental, realização de tratamento de canal dentre outros exemplos. Apresenta como desvantagem a ausência de controle padronizado da coleta de dados.

2.1.2. Estudos transversais:

Os dados são coletados por examinador calibrado durante um exame clínico. No entanto a exposição ao fator causa está presente no momento da análise, sendo que as variáveis não podem ser amplamente controladas.

2.1.3. Estudos longitudinais:

Estudo experimental controlado, com uso de grupos-controle para determinação e comparação de materiais e técnicas clínicas.

O desenho do estudo clínico pode ser:

- ✓ Aberto: O participante e o investigador sabem o que está sendo administrado no paciente.
- ✓ Simples-cego: O participante da pesquisa não sabe qual tratamento está recebendo.
- ✓ Duplo-cego: O participante e o investigador não sabe qual tratamento foi designado para cada paciente.
- ✓ Paralelo: Os voluntários são randomizados e recebem diferentes tipos de tratamento.
- ✓ Crossover: Comparam-se dois ou mais tratamentos em que os voluntários, depois de completar um dos tratamentos, são movidos para outro.

2.2. Ética em Pesquisa em seres humanos.

Para o desenvolvimento de pesquisas clínicas em seres humanos, alguns tópicos são fundamentais para avaliação ética de um projeto de pesquisa, dentre eles:

2.2.1. Consentimento do participante: o consentimento prévio, livre e esclarecido do indivíduo envolvido deve ser baseado em informações adequadas e em qualquer intervenção médica preventiva, diagnóstica e terapêutica. Antes de sua inclusão no estudo, é necessário que os voluntários ou seus representantes legais assinem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Esse documento tem o objetivo de esclarecer e proteger o participante da pesquisa, devendo estar em linguagem clara e de fácil entendimento.

2.2.2. Privacidade e confidencialidade das informações do participante: devem ser respeitadas com o máximo possível de proteção das informações, não devendo ser usadas ou reveladas para outros propósitos que não aqueles para os quais foram coletadas.

2.2.3. Aprovação pelos pares e comunidade: o objetivo maior da avaliação ética de projetos de pesquisa é garantir que seja respeitada a dignidade humana. Nessa garantia devem ser incluídas todas as pessoas que possam vir a ter alguma relação com a pesquisa.

2.3. Técnicas experimentais.

A análise histopatológica dos tecidos em contato com materiais é o padrão-ouro para avaliação dos efeitos biológicos. Deve-se ressaltar que apenas materiais e/ou protocolos de aplicação selecionados a partir dos estudos prévios in vitro e in vivo devem ser avaliados em ensaios clínicos.

2.3.1. Análise de biocompatibilidade de materiais restauradores em dentes de seres humanos deverá seguir os passos abaixo:

a. Seleção de dentes:

- ✓ Dentes hígidos, sem cáries, restaurações, abrasões , atrições , abfração , com indicação de extração.
- ✓ Os dentes mais utilizados são os primeiros e segundos pré-molares com indicação para extração por ortodontia.

b. Procedimentos Pré-operatórios:

- ✓ Teste de Sensibilidade no dente a ser trabalhado e adjacentes
- ✓ Radiografia
- ✓ Anestesia
- ✓ Profilaxia
- ✓ Isolamento Absoluto
- ✓ Assepsia do campo operatório

c. Preparo Cavitário para Capeamento Pulpar indireto:

- ✓ Cavidade de classe V na vestibular do dente com broca diamantada com topo plano
- ✓ As cavidades devem ser preparadas pelo mesmo operador,
- ✓ A padronização das cavidades deve ser feita por um batente de resina posicionado a 2,5 mm de distância da extremidade ativa da fresa, permitindo a confecção de uma cavidade de 0,5mm de remanescente de dentina e a cavidade pulpar.

d. Exposição pulpar para Capeamento Pulpar direto

- ✓ Após a realização do preparo cavitário de Classe V , utiliza-se um broca carbide esférica em baixa rotação sob refrigeração com soro para a exposição pulpar com diâmetro padronizado.
- ✓ A irrigação deve ser feita apenas com soro ou água destilada.

e. Procedimento de Pulpotomia:

- ✓ A abertura coronária deve ser feita na oclusal dos dentes
- ✓ A polpa coronária é removida com curetas afiadas até a entrada das raízes
- ✓ A irrigação é feita apenas com soro ou água destilada

f. Aplicação dos materiais experimentais:

- ✓ O material é aplicado logo após a manipulação
- ✓ No assoalho (Capeamento pulpar indireto)
- ✓ Na ferida pulpar (Capeamento pulpar direto)
- ✓ Aplicação de uma base cavitária;(Ionômero de vidro)
- ✓ Restauração de resina

g. Estabelecimento de grupos experimentais:

- ✓ Utiliza-se Hidróxido de Cálcio como material do grupo- controle negativo

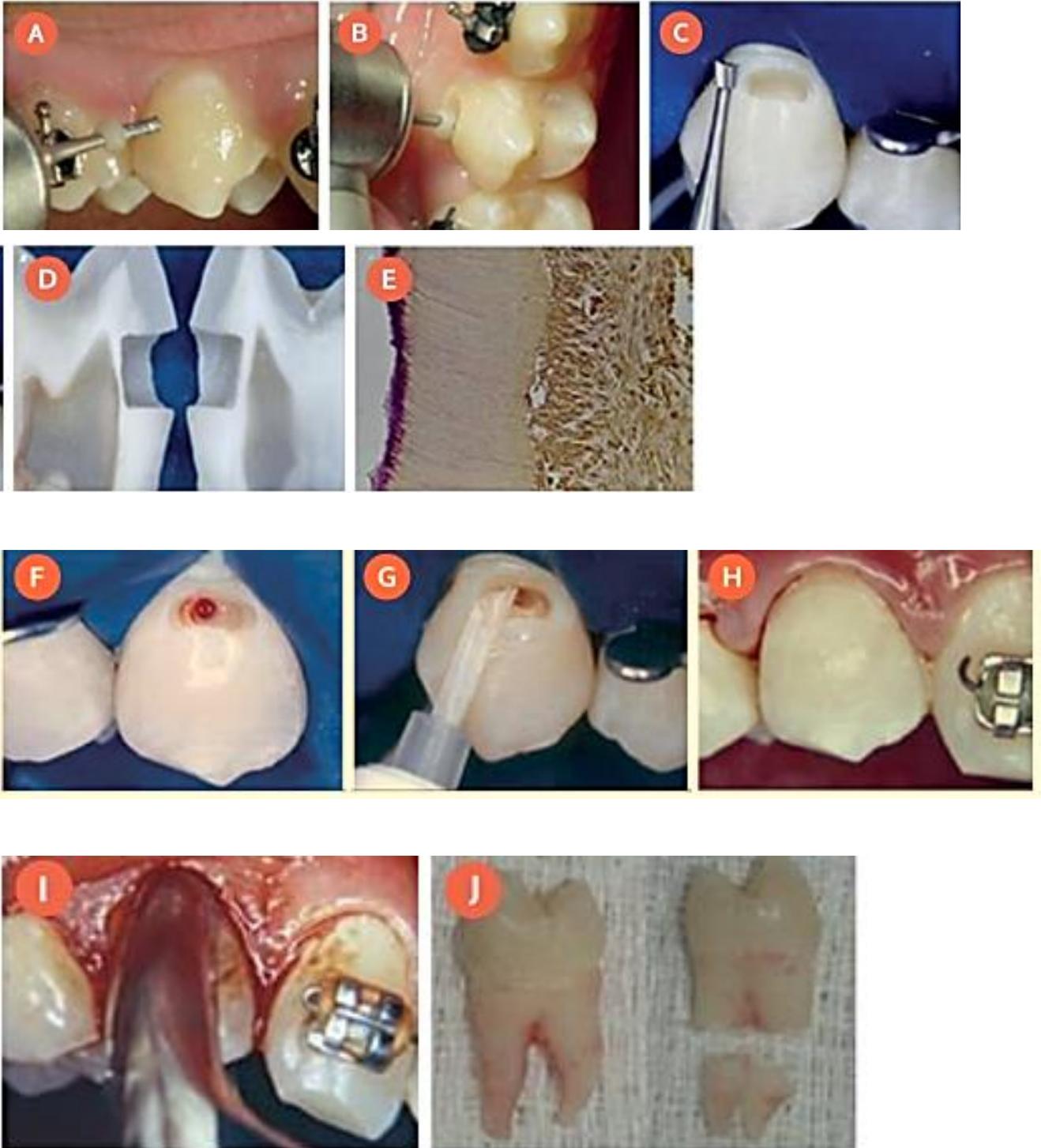
h. Período de Análise

- ✓ Períodos curtos: 3 a 5 dias
- ✓ Períodos intermediários: 21 a 30 dias
- ✓ Períodos longos: 90 dias ou mais

i. Coleta dos dentes

- ✓ Faz-se novo teste de sensibilidade.
- ✓ Radiografia.
- ✓ Anestesia.
- ✓ Exodontia : Deve ser feita evitando a remoção com fórceps para não ocorrer alterações na cavidade que foi construída na face vestibular.

- ✓ Secção da metade da raiz (utiliza-se broca cilíndrica de tungstênio em alta rotação ou disco de carborundum).
- ✓ Imersão do dente em solução fixadora.



Fonte: Estrela, 2018 Pag. 438 **A.** Detalhe da broca cilíndrica com a demarcação feita com resina composta **B.** Realização do preparo cavitário Classe V **C.** Visão vestibular da cavidade preparada **D.** Visão interna dos preparos cavitários realizados **E.** Visão do ERD por microscopia de luz, Brown & Brenn, 320x. **F.** Detalhe da exposição pulpar pontual realizada com broca esférica **G.** Aplicação do material sobre a exposição pulpar **H.** Visão vestibular da cavidade após restauração com resina composta **I.** Procedimento de extração dos dentes **J.** Dente extraído e submetido a corte da porção apical

2.4. Procedimentos Histopatológicos

2.4.1. Processamento em Parafina:

✓ Fixação do elemento dentário:

- Após a extração o elemento dentário é colocado em substância fixadora: Solução de formaldeído\formalina a 10% é a mais utilizada, deve-se preparar o fixador em solução tamponada ou adicionar carbonato de cálcio.
- Solução de Karmovsky ,pós fixadas com tetróxido de ósmio e contrastadas com acetato de uranilla são utilizadas em casos de avaliação de alterações das células que compõe a polpa e da dentina.

✓ Descalcificação:

Amostras provenientes de tecido mineral devem ser submetidas à descalcificação. Utiliza-se:

- Solução descalcificadora de Morse
- EDTA a 5% ou a 10%

As amostras devem ser mantidas em solução descalcificante sob agitação constante, podendo ser trocada semanalmente.

✓ Processamento

- Processamento do material em parafina:
- As amostras devem ser posicionadas em cassetes de plástico, devem ter o tamanho selecionados de acordo com o micrótomo a ser utilizado.
- A identificação das amostras deve ser com lápis grafite.
- Desidratação: Remoção de água dos tecidos. É feita com trocas ascendentes de etanol (70,80,95,100%)
- Clarificação: Visa a remoção o etanol dos tecidos. É feita com várias trocas de Xilol.
- Impregnação de parafina: Realizada em estufa a 60°C. Os fragmentos devem ser transportados de uma parafina a outra em intervalos pré-determinados. Recomenda-se nunca deixar o material por muito tempo na parafina, pois ,uma vez que esta somente é líquida em temperatura alta, o calor poderá causar danos aos tecidos.

✓ Inclusão em Parafina

- Colocação dos tecidos infiltrados em parafina no interior de um molde de parafina.
 - As amostras podem ser inseridas no molde previamente preenchido com parafina aquecida, ou a parafina líquida pode ser despejada sobre a amostra.
- ✓ Cortes Histológicos:
- Cortes entre 3 e 6 micrômetros serão feitos através de micrótomo rotatório.
 - Os cortes deverão ser feitos no longo eixo da amostra.
 - Os blocos de parafina com as amostras devem ser mantidos em gelo.
 - Após o corte as fitas são transferidas para banho-maria a 40°C
 - As fitas são coletadas com lâminas, sendo incubadas em estufa a 60°C por 24hs.
- ✓ Procedimentos gerais para colorações:
- Observação: Antes da coloração a parafina deve ser removida do interior da amostra.
 - Desparafinização: Feita com imersão em Xilol.
 - Hidratação: Imersão em sequências alcoólicas (100,95,80,70%, até água destilada. Em caso de corante alcoólico, interrompe em 70%.
 - Coloração: Imersão dos cortes no corante.
 - Desidratação: São utilizadas concentrações alcoólicas crescentes (70,80,95 e 100%).
 - Clarificação: Utiliza-se o xilol como líquido intermediário entre álcool e o meio de selagem.
 - Montagem da lâmina: Cobre-se o tecido com uma lamínula de vidro, usando uma substância para fixar a lâmina à lamínula.

2.4.2. Processamento por Congelamento

- ✓ Fixação:
- Paraformaldeído 4% é o mais indicado.
- ✓ Inclusão em meio de congelamento:
- As amostras são lavadas em solução tampão e imersas em sucrose a 30% por 24 hs.
 - São posicionadas em moldes plásticos

- Um meio de suporte de temperatura de corte ótima (optimal cutting temperature, OCT), é adicionado
- O conjunto é colocado em freezer -80°C por no mínimo 1 h antes dos cortes.
- Imersão da amostra em nitrogênio líquido.
- ✓ Cortes histológicos
 - São realizados em criostato com temperatura de 20°C
 - Os blocos são removidos dos moldes e os cortes realizados com 5-10 micrômetros, os quais são coletados em lâmina carregada positivamente.
 - As lâminas devem ser mantidas em temperatura ambiente por uma hora e proporcionar maior adesão das amostras à lâmina.
 - O armazenamento das lâminas obtidas deve ser realizado em freezer -80°C.
- ✓ Coloração
 - Antes da coloração, deixa-se as lâminas secarem em temperatura ambiente.
 - Em seguida, realizam-se os protocolos de hidratação, coloração, desidratação, clarificação e selagem.

2.5. Técnicas de análise histopatológica

2.5.1. Colorações básicas

- ✓ Hematoxilina e eosina (H&E): é a mais utilizada.
- ✓ Tricrômio de Masson: para avaliação de colágeno e deposição de matriz óssea.
- ✓ Método de Brow & Brenn: para evidenciar bactérias.

2.5.2. Colorações específicas

- ✓ Análises por imunofluorescência e imuno-histoquímica: avaliam de forma específica componentes celulares, como proteínas, receptores e citoesqueleto.

2.5.3. Mensuração da espessura do remanescente de dentina (ERD)

- ✓ Para pesquisas nas quais cavidades dentárias são preparadas, porém sem expor tecido pulpar, deve-se realizar a mensuração do ERD. Este

deve ser medido com auxílio de um microscópio óptico acoplado a um computador.

2.5.4. Outras análises

- ✓ Além das análises por cortes histológicos, as amostras podem ser analisadas por meio de PCR, ELISA, Western Blot, dentre outros.

2.6. Atribuição de escores para análise de eventos histopatológicos:

As análises dos eventos histopatológicos podem ser realizadas através da atribuição de escores, os quais devem ser realizados de forma cega por um examinador calibrado.

2.6.1. Avaliação no subcutâneo de animais:

Os cortes histológicos corados com H&E e tricômio de Masson podem ser avaliados de acordo com a presença ou não de determinados eventos histológicos. Esses eventos são classificados de acordo com as características observadas em microscopia óptica, conforme a tabela abaixo:

Classificação	Caracterização		
	Inflamação	Presença de macrófagos e células gigantes	Necrose
Escore 0	Ausente	Ausente	Ausente
Escore 1	Infiltrado inflamatório discreto	Discreto	Presente
Escore 2	Infiltrado inflamatório moderado	Moderado	–
Escore 3	Infiltrado inflamatório severo envolvendo tecido circundante	Severo	–

Fonte: Estrela 2018, Pag .441

A interpretação dos resultados deve ser realizada de acordo com a evolução do quadro reacional presente em contato com os materiais em teste. A

biocompatibilidade dos materiais experimentais, avaliados dentro dessa metodologia específica de pesquisa, pode ser classificada em:

A. Aceitável:

- ✓ I. Discreta ou nenhuma reação tecidual em todos os períodos avaliados
- ✓ II. Moderada ou intensa reação tecidual aos sete dias, a qual reduz de intensidade com o decorrer dos períodos, atingindo o escore de reação tecidual não significante aos 60 dias.

B. Não aceitável:

- ✓ I. Discreta ou nenhuma reação tecidual aos sete dias, sendo que a intensidade dessa reação atinge o escore de moderado ou intenso aos 60 dias
- ✓ II. Moderada ou intensa reação tecidual em todos os períodos avaliados.

2.6.2. Avaliações em dentes de animais e humanos:

Um conjunto de eventos histopatológicos deve ser avaliado de acordo com a metodologia de pesquisa empregada. Os escores determinados para cada um dos eventos histopatológicos observados em microscopia óptica devem caracterizar a aceitabilidade ou não do material experimental ou mesmo da técnica. Para pesquisas em que cavidades dentárias são preparadas, sem expor a tecido pulpar, deve-se avaliar a espessura do ERD (remanescente dentina esmalte) entre o assoalho da cavidade e a polpa., a intensidade da resposta inflamatória e a deposição de dentina. A presença de bactérias no interior da cavidade deve ser classificada de acordo com as paredes envolvidas. Em casos em que o tecido pulpar é exposto, o diâmetro da exposição deve ser medido, para que haja exposição semelhante. As tabelas abaixo sumarizam os escores atribuídos aos eventos histopatológicos que poderão ser observados:

A. Tabela da classificação da resposta inflamatória do tecido pulpar

Classificação da resposta inflamatória do tecido pulpar

Classificação	Caracterização
Escore 0	Nenhuma ou poucas células inflamatórias presentes na área pulpar correspondente à aplicação do material. Característica de tecido pulpar normal.
Escore 1	Infiltrado inflamatório discreto, com presença de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) ou leucócitos mononucleares (MNLs) restrito à área próxima a aplicação do material
Escore 2	Infiltrado inflamatório moderado envolvendo a polpa coronária
Escore 3	Infiltrado inflamatório severo envolvendo a polpa coronária e radicular ou caracterizando a presença de abscesso

Fonte: Estrela 2018, Pag 442

B. Tabela da classificação da desorganização tecidual do tecido pulpar

Classificação da desorganização tecidual do tecido pulpar

Classificação	Caracterização	
	Exposição pulpar	Capecamento pulpar indireto
Escore 0	Característica de tecido pulpar normal	Característica de tecido pulpar normal
Escore 1	Discreta desorganização tecidual próximo a exposição pulpar, mas com ausência de alterações na região central da polpa coronária	Discreta desorganização da camada de odontoblastos referente à parede pulpar do preparo cavitário, mas com ausência de alterações na região central da polpa coronária
Escore 2	Desorganização tecidual moderada envolvendo a polpa coronária	Desorganização tecidual moderada envolvendo a polpa coronária
Escore 3	Desorganização intensa da polpa coronária, podendo envolver a polpa radicular e áreas de necrose pulpar	Desorganização intensa da polpa coronária, podendo envolver a polpa radicular e áreas de necrose pulpar

Fonte: Estrela 2018, Pag 442

C. Tabela da classificação deposição de dentina terciária do tecido pulpar

Classificação deposição de dentina terciária do tecido pulpar

Classificação	Caracterização	
	Exposição pulpar	Capeamento pulpar indireto
Escore 0	Ausente	Ausente
Escore 1	Discreta deposição de barreira mineralizada abaixo ou ao redor da região de aplicação do material	Discreta deposição de dentina terciária abaixo ou ao redor da região de aplicação do material
Escore 2	Deposição moderada de barreira mineralizada abaixo ou ao redor da região de aplicação do material	Deposição moderada de dentina terciária abaixo ou ao redor da região de aplicação do material
Escore 3	Intensa deposição de barreira mineralizada abaixo ou ao redor da região de aplicação do material/ presença de barreira de dentina completa	Intensa deposição de dentina terciária abaixo ou ao redor da região de aplicação do material/ presença de barreira de dentina completa

Fonte: Estrela 2018, Pag 442

D. Tabela da classificação da penetração de bactérias nas paredes da restauração

Classificação da penetração de bactérias nas paredes da restauração

Classificação	Caracterização
Escore 0	Ausente
Escore 1	Presença de bactérias nas paredes laterais da cavidade
Escore 2	Presença de bactérias nas paredes laterais e axial da cavidade
Escore 3	Presença de bactérias nas paredes laterais e axial da cavidade, dentro dos túbulos dentinários e/ou sobre o tecido pulpar

Fonte: Estrela 2018, Pag 443

3.VANTAGENS E LIMITAÇÕES DOS TESTES DE BIOCOMPATIBILIDADE

As vantagens oferecidas pelos testes de biocompatibilidade através da aplicação ou utilização dos materiais dentários devem ser relatadas de maneira cautelosa, porque diferentes categorias de protocolos de pesquisa recomendados pelas associações e federações que regulamentam tais testes determinam resultados específicos dentro das condições e características dos tecidos vivos em que os materiais são avaliados.

3.1. No nível 2 de pesquisa, o teste de implantação de materiais em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos tem as seguintes vantagens e limitações:

Vantagens:

- ✓ Uso de limitada área para a manutenção dos animais
- ✓ Facilidade de limpeza e higienização da área reservada no pós-operatório
- ✓ Metodologia de execução relativamente simples
- ✓ Não há necessidade de descalcificação dos espécimes, por não envolver tecido calcificados
- ✓ Metodologia que possibilita comparar a resposta tecidual em um mesmo animal, para diversos materiais experimentais implantados
- ✓ Custo relativamente baixo
- ✓ Essa metodologia de pesquisa é apropriada para ser desenvolvida em trabalhos de tese, principalmente para cursos de mestrado. O estudante estará apto a desenvolver um trabalho experimental de execução relativamente rápida, o qual permitirá que ele aprenda a organizar a redação do trabalho (Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão) e fazer uma adequada revisão bibliográfica do assunto.

Limitações:

- ✓ Necessidade de execução criteriosa da metodologia, pois um simples erro pode levar a perda dos espécimes.
- ✓ Reconhecimento do (s) possível (is) erro(s) somente durante a avaliação dos cortes histológicos.

3.2. Com relação aos testes de biocompatibilidade em nível 3 de pesquisa, denominados de testes de “aplicação”, nos quais os materiais devem ser avaliados dentro de seu contexto de uso clínico, temos as seguintes vantagens e limitações:

Vantagens:

Limitações:

3.3. Para os testes de “aplicação” realizados em humanos, cujos materiais e/ou procedimentos operatórios foram anteriormente aprovados através dos testes em animais, temos as seguintes vantagens e limitações:

Vantagens:

Limitações:

4.Exemplos de artigos que utilizam os testes de biocompatibilidade:

Biocompatibilidade dos materiais em Ortodontia: mito ou realidade?

Luciane Macedo de Menezes*, Maria Perpétua Mota Freitas**, Tatiana Siqueira Gonçalves***

Resumo

O objetivo deste trabalho é apresentar uma revisão sobre os conceitos relacionados à biocompatibilidade dos materiais empregados em Ortodontia. Fatos relacionados às reações de hipersensibilidade aos diversos materiais ortodônticos são discutidos, sendo apresentadas as condutas recomendáveis nestas situações.

Palavras-chave: Ortodontia. Biocompatibilidade. Hipersensibilidade. Alergia. Materiais ortodônticos.

SPECIAL ISSUE: ESB 2017

Original Research



Hyaluronic acid hydrogels incorporating platelet lysate enhance human pulp cell proliferation and differentiation

Leopoldina D. F. Almeida^{1,2,3,4} · Pedro S. Babo^{3,4} · Cristiana R. Silva^{3,4} · Márcia T. Rodrigues^{3,4} · Josimeri Hebling² · Rui L. Reis^{3,4,5} · Manuela E. Gomes^{3,4,5}

Received: 16 December 2017 / Accepted: 14 May 2018 / Published online: 14 June 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

The restoration of dentine-pulp complex remains a challenge for dentists; nonetheless, it has been poorly addressed. An ideal system should modulate the host response, as well as enable the recruitment, proliferation and differentiation of relevant progenitor cells. Herein was proposed a photocrosslinkable hydrogel system based on hyaluronic acid (HA) and platelet lysate (PL). PL is a cocktail of growth factors (GFs) and cytokines involved in wound healing orchestration, obtained by the cryogenic processing of platelet concentrates, and was expected to provide the HA hydrogels specific biochemical cues to enhance pulp cells' recruitment, proliferation and differentiation. Stable HA hydrogels incorporating PL (HAPL) were prepared after photocrosslinking of methacrylated HA (Met-HA) previously dissolved in PL, triggered by the Ultra Violet activated photoinitiator Irgacure 2959. Both the HAPL and plain HA hydrogels were shown to be able to recruit cells from a cell monolayer of human dental pulp stem cells (hDPSCs) isolated from permanent teeth. The hDPSCs were also seeded directly over the hydrogels (5×10^4 cells/hydrogel) and cultured in osteogenic conditions. Cell metabolism and DNA

Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato

Implantation of flakes of castor oil resin in rat dental alveolus

Romeu Felipe Elias CALIXTO*

Juliana Mazzone TEÓFILO**

Luiz Guilherme BRENTÉGANI***

Teresa Lúcia LAMANO CARVALHO***

CALIXTO, R. F. E.; TEÓFILO, J. M.; BRENTÉGANI, L. G.; LAMANO CARVALHO, T. L. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. *Pesqui Odontol Bras*, v. 15, n. 3, p. 257-262, jul./set. 2001.

Os objetivos do presente trabalho foram: 1) testar a biocompatibilidade de uma resina natural, derivada do óleo de mamona, implantada na cavidade de extração dental de ratos, e 2) estudar a possível interferência do material na cronologia do reparo alveolar. O material (AUG-EX, Poliquil Araraquara Polimeros Químicos Ltda., Araraquara - SP) foi implantado no alvéolo imediatamente após a extração do incisivo superior direito e os ratos foram sacrificados de 1 a 6 semanas após a extração ou extração + implante. As hemimaxilas foram descalcificadas e processadas para inclusão em parafina e obtenção de cortes semi-seriados, corados com hematoxilina-eosina. Os flocos da resina, de forma irregular e tamanho variável, localizaram-se entre os terços alveolares médio e cervical, inicialmente circundados por tecido de granulação e a seguir por quantidade progressivamente maior de tecido ósseo, no geral com a presença de um tecido conjuntivo interposto, mas em algumas áreas estabelecendo aparente osseointegração direta. Não houve persistência da reação inflamatória, mas observou-se pequena quantidade de células gigantes aderidas à superfície do material, em todos os períodos. A análise histométrica (contagem diferencial de pontos) do terço apical mostrou um atraso de 13% a 20% no reparo alveolar dos ratos implantados, com menor neoformação óssea associada a maiores volumes percentuais de tecido conjuntivo e de remanescentes do coágulo sanguíneo.

III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, L. D. F. *et al.* Hyaluronic acid hydrogels incorporating platelet lysate enhance human pulp cell proliferation and differentiation. **J Mater Sci Mater Med**, v. 29, n. 6, p. 88, 2018. ISSN 1573-4838.

CALIXTO, R. F. E. et al. Implante de um floculado de resina de mamona em alvéolo dental de rato. **Pesq. Odontol. Bras.**, v. 15, n. 3, p. 257-262, 2001. ISSN 1517-7491.

COSTA,C.A.S.Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: ESTRELA,C. **Metodologia Científica: ciência, ensino, pesquisa**. 1ed. São Paulo. Artes médicas,2001. p. 163-194.

MENEZES, L. M.; FREITAS, M. P. M.; GONÇALVES, T. S. Biocompatibilidade dos materiais em Ortodontia: mito ou realidade? **Rev. Press Ortodon. Ortop. Facial**, v. 14, n. 2, p. 144-157, 2009. ISSN 1980-5500.

SOARES,D.G;BASSO,F.G;HEBLING,J;SOUZA,P.P.C;COSTA,C.A.S. Testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. In: ESTRELA,C. **Metodologia Científica: ciência, ensino, pesquisa**. 3ed. Porto Alegre. Artes médicas,2018. p. 427-44