

Marcus Vinicius Reis Só\*  
Lea Assed Bezerra da Silva\*\*  
Mário Roberto Leonardo\*\*\*  
José Antônio Poli de Figueiredo\*\*\*\*

\*BDS, MSc, PhD, Senior Clinical Lecturer in Endodontics, Department of Conservative Dentistry, Federal University of Santa Maria/RS, Brazil  
\*\*BDS, MSc, PhD, Senior lecturer in Endodontology, Department of Restorative Dentistry, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto/SP, Brazil  
\*\*\*BDS, MSc, PhD, Professor in Endodontology, Department of Restorative Dentistry, University of the State of Sao Paulo, Araraquara/SP, Brazil  
\*\*\*\*BDS, MSc, PhD, Clinical Lecturer in Endodontology, Eastman Dental Institute – UCL, London, Great Britain

*Correspondence:*  
Jose A.P. Figueiredo  
Clinical Lecturer in Endodontology  
Unit of Endodontology  
Eastman Dental Institute  
256 Gray's Inn Road - London  
WC1X 8LD  
Tel. +44 20 7915 2362  
Fax +44 20 7915 2371

Pervenuto in Redazione il 21 novembre 2005  
Accettato per la pubblicazione il 19 dicembre 2005

## Reaction of rat connective tissue to implants of polyethylene tubes containing calcium hydroxide pastes

### ABSTRACT

**Aim:** substances or materials in the market should be scientifically studied before they are used in human beings, and go through all levels of research. Some calcium hydroxide pastes, such as UltraCal XS and CalciCur are currently used in endodontics. The purpose of this study was to evaluate tissue response to three calcium hydroxide pastes - UltraCal XS, CalciCur and an aqueous calcium hydroxide paste - in subcutaneous connective tissue of Wistar rats' dorsum at 7 and 30 days.

**Methodology:** four polyethylene tubes containing one of the pastes were inserted in the subcutaneous tissue of the dorsum of each of the sixteen Wistar rats according to a stratified randomization criterion. After animal sacrifice, samples were collected and prepared for histological analysis. Slides were analyzed qualitatively for the presence of neutrophils, lymphocytes and plasma cells, eosinophils, macrophages and giant cells, as well as for fibrin and abscess formation.

**Results:** no significant statistical differences between the three materials at 7 and 30 days were found. However, histological analysis revealed a reduction in scores from 7 to 30 days in the three calcium hydroxide pastes (two-way ANOVA).

**Conclusions:** the three pastes under analysis were biocompatible at the two time points in this study.

### INTRODUCTION

The introduction of calcium hydroxide in dentistry has been assigned to Hermann (3) and its use has become popular for pulp capping, pulpotomies, apexification, intracanal medication, treatment of resorptions and root perforations.

Studies conducted in vivo with laboratory animals have evaluated the use of calcium hydroxide and its effect on tissue biology and physiology. Results of biocompatibility tests provide histopathological data to evaluate the effects of materials on connective tissue when these materials are placed in dentin or polyethylene tubes implanted in the subcutaneous or submucosal connective tissue of rats (2, 4-6, 9, 10).

All substances or materials introduced in the market should be scientifically studied before they are used in human beings, and should go through all levels of research before being prescribed. Some calcium hydroxide pastes, such as UltraCal XS and CalciCur are currently used in endodontics, but very little literature is provided regarding their biological behavior.

The purpose of this study was to evaluate connective tissue response to three calcium hydroxide pastes - UltraCal XS, CalciCur and an aqueous calcium hydroxide paste - implanted in the dorsum of Wistar rats at 7 and 30 days.

### MATERIALS AND METHODS

This study project was evaluated and ap-

proved by the Ethics in Animal Research Committee of Universidade Luterana do Brasil (approval number: 2004-009 A).

Before the beginning of the study, sixteen male Wistar rats weighing about 200 g and about 60 days old were examined by a veterinarian to ensure that the animals were in good health.

#### *Subjects*

The animals were randomly divided into two groups of eight animals each according to experimental time points: Group 1-7 days; and Group 2-30 days. The rats were randomly housed in five cages and individually identified by tail marks made with nontoxic markers.

#### *Preparation of test tubes*

Sixty-four 5-mm-long polyethylene tubes with an internal diameter of 1.3 mm and open extremities were prepared from previously autoclaved nontoxic Scalp Vein 19G (Terumo, Medical Corporation, Tokyo Japan). UltraCal XS and CalciCur were supplied in syringes to which dispensing tips provided with the material were connected. The aqueous calcium hydroxide paste [1.2 g calcium hydroxide (lab grade), Riedel De Haën AG, Seelze, Hanover, Germany, and 1.0 ml distilled water, Farmácia Escola, ULBRA, Canoas, Brazil] was inserted in the polyethylene tubes with a plastic syringe and disposable needle (BD, Juiz de Fora, Brazil). UltraCal XS, CalciCur and the aqueous paste were slowly injected into each tube. The tube was filled up when paste extravasated through the opposite opening. These procedures were carried out minutes before the animals were anesthetized.

For the first and second experimental time points (7 and 30 days), four polyethylene tubes were implanted in the subcutaneous

#### **Key words:**

Endodontics, calcium hydroxide, histocompatibility.

tissue of each animal. The choice of quadrant where each tube was inserted was randomly stratified.

#### *Rat anesthesia*

The animals were anesthetized for the procedures in this study with a dissociative drug (5% ketamine, Vetanarcol, König, Germany) administered together with a muscle relaxant agent (2% xylazine, Kensol, König, Germany). The two drugs were mixed at a 1:1 ratio (ml) in a syringe. Of this mixture, 0.2 ml/100 g was administered im to each animal to obtain 50 to 80 minutes of general anesthesia.

#### *Implant in subcutaneous tissue*

After anesthesia, the dorsal region was disinfected with 0.2% chlorhexidine and hair was removed from the surgical site with a Golden A5 veterinary clipper (Oster Professional Products, McMinnville, Tennessee, USA) and a size 40 Oster A5 blade (Oster Professional Products, McMinnville, Tennessee, USA). Two 15 mm vertical incisions 30 mm apart from each other and following the long axis of the dorsum were made using a number 15 scalpel blade (Solidor, São Paulo, Brasil) on a scalpel handle (Edlo Ltda, RS, Brasil). Subcutaneous tissue was obliquely pulled cephalad in the upper incision, and caudally in the lower incision. Four 20 mm pouches, one on each side of each incision, were created using round-tipped scissors. Curved pincers were used to introduce one tube filled up with paste in each of the pouches. The incisions were then closed with a single 4-0 mononylon suture (Biodinâmica, Paraná, Brazil). The rats were kept in cages with chow and water ad libitum, which reproduced the conditions to which they were used before the procedures.

#### *Animal sacrifice*

Seven days after the clinical procedure, 8 rats were anesthetized as described above and sacrificed with an intracardiac injection of potassium chloride. The other eight rats were sacrificed at thirty days. Immediately after death, the animals were placed in 10% buffered formaldehyde and kept there until dissection of the region where the implants had been placed.

#### *Collection of histological samples*

The implant regions were excised with a safety margin using a number 15 scalpel blade on a scalpel handle. Specimens were

placed in labeled containers with 10% buffered formaldehyde and kept there until processing for histological examination.

#### *Histological processing*

Histological samples were processed in the Histopathology Laboratory of Universidade Luterana do Brasil. Special care was taken to ensure that the tissue in contact with the implanted material was face down when samples were embedded in paraffin. A microtome (Leica RM 2025, Nussloch, Germany) was used to obtain five semi-serial histological sections; each of the blocks was 5 mm thick. Sections were stained with Harris hematoxylin and alcoholic eosin.

#### *Analysis of results*

One single observer blinded to the study procedures and purposes analyzed all histological slides using an optical microscope (Zeiss) at 100, 200 and 400 times magnification. For each of the study samples, the slide most representative of histopathological events was chosen. Tissue adjacent to at least one of the tube openings was visualized in the slides chosen. The slides were analyzed qualitatively for the presence of neutrophils, lymphocytes and plasma cells, eosinophils, macrophages and giant cells, as well as fibrin and abscess formation (2). Results of inflammatory cell events were classified according to the following scores: 1 - absent: inflammatory cells were not visualized or were found only inside blood vessels; 2 - mild: cells were sparsely distributed or formed very small clusters; 3 - moderate: cells were present but not predominant in the microscopic field; 4 - severe: cells formed infiltrates in areas adjacent to the implant site.

Fibrin formation was classified according to the following scores:

- 1 - no collagen fibers were found in the area that contained the material under study;
- 2 - a thin layer of collagen fibers surrounded the implant site;
- 3 - a thick layer of collagen fibers surrounded the implant site.

Abscesses, defined by the presence of dead neutrophils in a slightly stained area of the field, were classified according to the following scores:

- 1 - no abscess;
- 2 - abscess adjacent to the implant site;
- 3 - abscess extending to areas distant from the implant site.

#### *Statistical analysis*

One-way ANOVA was used to compare cell analysis results at 7 and 30 days independently. Repeated-measures ANOVA was used to compare implant materials at different time points. Significance was established at  $\alpha = 5\%$  and data were analyzed with the SPSS 11 software.

## RESULTS

Table 1 shows the results of histological analysis at 7 days. No statistically significant differences were found between the three materials. The analysis of UltraCal XS slides revealed sparse neutrophils, indicating a mild inflammatory response. Calciur and the control paste showed similar results: neutrophils were present but not predominant in the microscopic field. However, lymphocytes and plasma cells formed infiltrates in areas adjacent to the implant site in a significant number of times in samples of the three pastes under study. Similarly, macrophages also tended to be predominant in the microscopic field and were found in areas adjacent to the implant sites. Fibrin formation was seen as a thin layer of collagen fibers surrounding the implant sites. Abscesses were not found in most of the samples; when found, they were limited to areas close to the implant site.

Neutrophils were hardly seen in the microscopic field at 30 days of contact of the materials with subcutaneous tissue (Table 2). Although not statistically significant, lymphocytes and plasma cells were sparse or seen in small clusters in UltraCal XS samples; whereas in Calciur and aqueous paste samples they were present but not predominant in the microscopic field. Fewer macrophages were found at 30 than at 7 days, and scores tended to be around 2. Fibrin formation was evident as a thin layer of collagen fibers in the samples of the three calcium hydroxide pastes under analysis. No slide showed any area of abscess.

Lower scores were found for neutrophils, lymphocytes/plasma cells, macrophages, fibrin and abscess formation at 30 than at 7 days in samples of the three calcium hydroxide pastes. Only eosinophils showed no changes in score at 30 days (Table 3).

Figures 1 to 6 show histopathological images of the three calcium hydroxide samples at the two experimental time points.

7 DAYS	CALCICUR	ULTRACAL	AQUEOUS	p
Histological events	n=10 Mean $\pm$ SD	n=10 Mean $\pm$ SD	n=10 Mean $\pm$ SD	
Neutrophils	2.70 $\pm$ 0.82	2.30 $\pm$ 0.67	2.80 $\pm$ 0.79	0.32
Lymph/Plasm	3.70 $\pm$ 0.67	3.70 $\pm$ 0.48	3.70 $\pm$ 0.48	1.00
Eosinophils	1.00 0.00	1.10 $\pm$ 0.32	1.10 $\pm$ 0.32	0.61
Macrophages	3.80 $\pm$ 0.42	3.70 $\pm$ 0.48	3.60 $\pm$ 0.70	0.72
Fibrin formation	2.10 $\pm$ 0.32	2.40 $\pm$ 0.52	2.30 $\pm$ 0.48	0.33
Abscess	1.10 $\pm$ 0.32	1.10 $\pm$ 0.32	1.40 $\pm$ 0.52	0.16

**Tab. 1** - Mean scores and standard deviation values of histological events at 7 days.  
Valori medi e deviazioni standard degli eventi istologici a 7 giorni.

30 DAYS	CALCICUR	ULTRACAL	AQUEOUS	p
Histological Events	n=10 Mean $\pm$ SD	n=10 Mean $\pm$ SD	n=10 Mean $\pm$ SD	
Neutrophils	1.10 $\pm$ 0.32	1.00 0.00	1.10 $\pm$ 0.32	0.61
Lymph/Plasm	2.60 $\pm$ 0.70	2.10 $\pm$ 0.32	2.50 $\pm$ 0.71	0.17
Eosinophils	1.00 0.00	1.00 0.00	1.00 0.00	-
Macrophages	2.50 $\pm$ 0.53	2.20 $\pm$ 0.63	2.40 $\pm$ 0.52	0.49
Fibrin formation	2.00 0.00	2.00 0.00	2.00 0.00	-
Abscess	1.00 0.00	1.00 0.00	1.00 0.00	-

**Tab. 2** - Mean scores and standard deviation values of histological events at 30 days.  
Valori medi e deviazioni standard degli eventi istologici a 30 giorni.

CELLULAR ELEMENTS	2-WAY ANOVA	
	Time: p	Interaction: p
Neutrophils	< 0.001	0.50
Lymphocytes/Plasma cells	< 0.001	0.42
Eosinophils	0.17	0.61
Macrophages/Giant cells	< 0.001	0.71
Fibrin formation	0.003	0.33
Abscesses	0.01	0.17

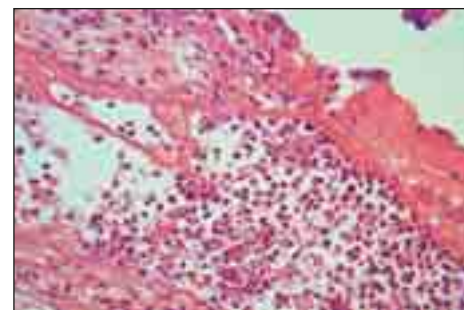
**Tab. 3** - Comparison of histological events for the three calcium hydroxide pastes at 7 and 30 days (p, two-way ANOVA).

Comparazione degli eventi istologici per le tre paste all'idrossido di calcio a 7 e 30 giorni (p, ANOVA a due vie).

## DISCUSSION

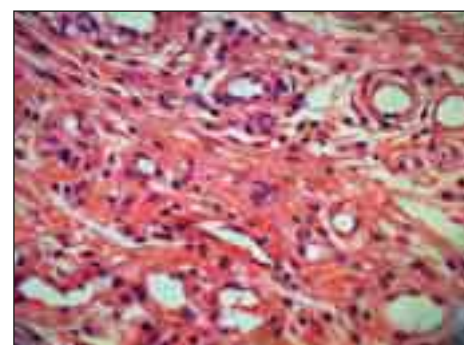
Calcium hydroxide has been largely used since the 70s, and is currently adopted as intracanal dressing in teeth with pulp necrosis and chronic periapical reaction due to its

high bactericide power and biocompatibility. It is the most frequently used medication for these conditions, and its application is currently one of the usual procedures to fight microorganisms that survive endodontic cleaning and shaping (7, 8). Polyethylene tube implants are used to evaluate biocompatibility because connective tis-



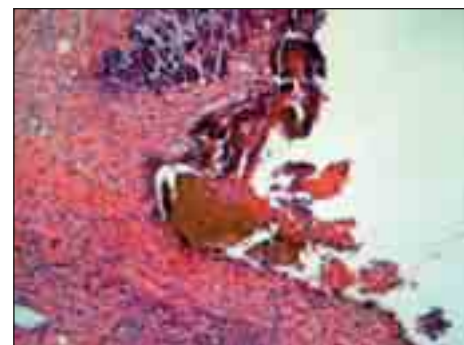
**Fig. 1** - Control paste at 7 days (200x) - Neutrophils adjacent to the implant site.

Pasta di controllo a 7 giorni (200x) - Neutrofili adiacenti al sito dell'impianto



**Fig. 2** - Calcicur at 7 days (400x) - Presence of macrophages and giant cells, lymphocytes and plasma cells infiltrates and newly formed vessels adjacent to the fibrin formation area.

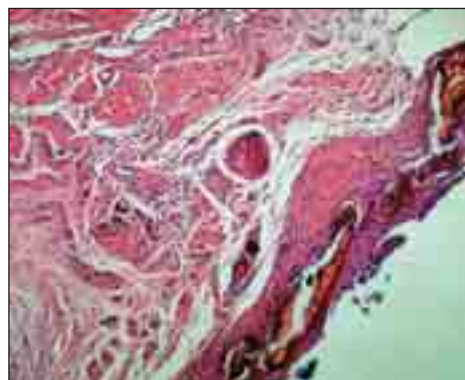
Calcicur a 7 giorni (400x) - Infiltrati di macrofagi e cellule giganti, linfociti e plasmacellule e neoformazione di vasi adiacenti alla zona di formazione della fibrina.



**Fig. 3** - UltraCal XS paste at 7 days (200x) - Lymphocytes and plasma cells infiltrates (surrounding the implant site).

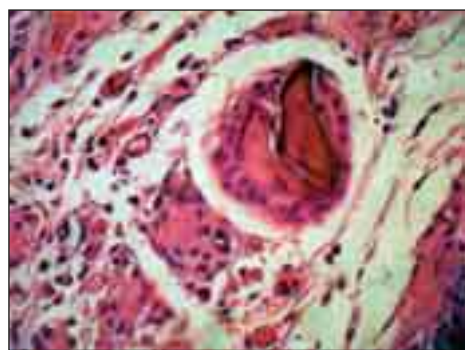
UltraCal XS a 7 giorni (200x) - Infiltrati di linfociti e plasmacellule (intorno al sito dell'impianto).





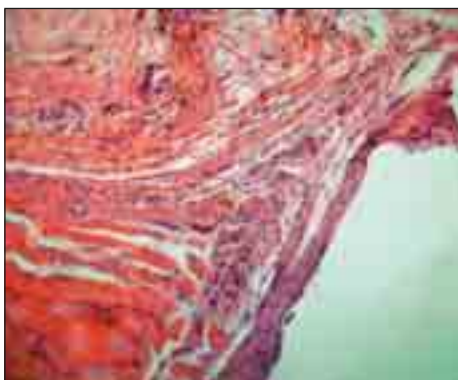
**Fig. 4** - Control paste at 30 days (200x) - Macrophages and giant cells adjacent to the thin fibrin formation.

Pasta di controllo a 30 giorni (200x) - Macrofagi e cellule giganti adiacenti alla sottile zona di formazione della fibrina.



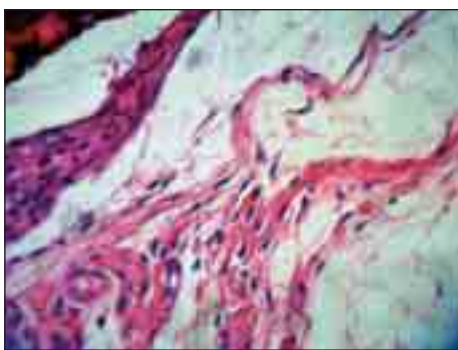
**Fig. 5** - Control paste at 30 days (400x) - Giant cells surrounding the implant site (foreign body granuloma).

Pasta di controllo a 30 giorni (400x) - Cellule giganti intorno al sito dell'impianto (granuloma da corpo estraneo).



**Fig. 6** - Calcicur at 30 days (200x) - Fibroblasts and fibrocytes adjacent to the implant site (good tissue reaction).

Calcicur a 30 giorni (200x) - Fibroblasti e fibrociti adiacenti al sito dell'impianto (buona reazione tissutale).



**Fig. 7** - UltraCal XS paste at 30 days (400x) - Fibroblasts and fibrocytes adjacent to the implant site (good tissue reaction).

UltraCal XS a 30 giorni (400x) - Fibroblasti e fibrociti adiacenti al sito dell'impianto (buona reazione tissutale).

sue tolerates them well and the material under study can be removed without the risk of tissue reaction to the tube, which may occur when dentin tubes are implanted. Moreover, polyethylene tubes may be sterilized, its internal diameter is standardized, and its cylindrical form is adequate to hold material and to insert it in tissue to be analyzed. Also, both extremities of the tube can be kept open, which ensures that the analysis

of tissue can be conducted at one of the openings in case the other is somehow compromised. Chances of losing samples are therefore reduced. The insertion of materials, particularly pastes, becomes easier, and no bubbles or empty spaces are produced. An unfavorable aspect of this method is the risk of material extravasations at the moment of insertion, which may result in more material in one side than in the other. The

preparation of pouches by means of incisions, as well as the careful placement of the tubes, minimizes this risk.

The purpose of choosing Wistar rats for the implantation of polyethylene tubes was to obtain a standard biological model for the materials to be studied. The age and weight of the animals were assessed to ensure that the animals were healthy and capable of resisting the study procedures (10).

The stratified randomization of placement of implants in the four quadrants of the animal dorsum was an attempt to decrease the possible effect of the position factor on the inflammatory responses, and to provide material from all four quadrants to be analyzed. The anesthetic protocol used in this study has an induction time of 5 to 7 minutes, and a relatively short recovery time in comparison to other protocols (30 to 40 minutes), which precluded postoperative monitoring. Anesthesia was maintained by administration of 0.1ml/100 g of the same mixture every time the animals showed signs of anesthetic recovery, with care being taken not to administer successive multiple doses, which might lead to an undesirable cumulative effect.

To minimize animal discomfort at the time of sacrifice, the KCl intracardiac injection was applied with the animals under anesthesia. This technique was approved by the Ethics Committee because it allegedly causes less suffering to the animals than anesthetic overdose, use of ether, or cervical dislocation.

Only one observer, experienced in the analysis of histological slides, conducted the quantitative and qualitative analyses because of the subjective nature of interpretation of histological events. The observer was blinded to what materials were used in this study, as well as to the time points under analysis. Therefore, no influence from the observer interfered in the interpretation of tissue reactions.

Although ANOVA is recommended for the comparison of parametric variables, it has also been used for categorical values (scores) because, contrary to what may be believed, inference in the analysis of ordinal variables may involve parametric procedures. Ordinal

categorical data may be assigned scores, such as 1, 2, 3 and 4, and means can thus be calculated (1).

The results of the biological compatibility analysis revealed a reduction of histological events along time. This profile was found for all pastes and is in agreement with previous studies (5, 6). Response at 7 days of contact with one of the pastes helps to investigate the effect of time, but should be seen with caution. Part of the tissue responses resulted from the surgical procedure to place the tubes. Torneck (10) showed that cell responses in the area adjacent to empty tubes were evident in a similar length of time.

The responses to the different pastes at 7 days were statistically similar. The general analysis of the events showed that fewer neutrophils were found in the UltraCal XS sample than in the CalciCur and control paste samples. This finding may be assigned to the higher viscosity of UltraCal XS, which may diffuse in tissues more slowly and be retained in the tube for a longer time. CalciCur and aqueous pastes, however, may not only diffuse faster, but also stimulate the im-

mune system, with neutrophils digesting and eliminating foreign materials faster. This event did not seem to cause the death of neutrophils along time, which would have resulted in the formation of pus. Neutrophils tend to decrease their participation in the inflammatory process along time.

Reduction in the number of cells analyzed and a mild to moderate response was found in most slides at 30 days for all pastes. UltraCal XS again showed results that indicated less tissue reaction in regard to the presence of lymphocytes and plasma cells. These cells are associated with chronic processes and participate in the organism's humoral and cell responses by forming antibodies or by producing cytokines that reach different tissues and trigger an inflammatory response cascade. When local irritation ceases, growth factors are released and stimulate the local proliferation of connective cells and the reestablishment of normal conditions. Therefore, if plasma cells and lymphocytes were less evident in tissue in contact with UltraCal XS, the effect of material viscosity discussed above may also apply. Greater vis-

cosity leads to a gradual increase in pH and slow ion release, which produces less evident responses of defense cells.

The suggestions made above should be understood in the light of the fact that statistical analysis did not confirm the significance of these observations. There were no statistically significant differences according to the criteria adopted and the number of samples analyzed. In spite of that, the relevance of observations made in biological studies should be considered, and statistical tests should not be the only parameter for analysis.

## CONCLUSIONS

CalciCur, UltraCal XS and the control paste had similar biological behaviors in subcutaneous tissue at 7 and 30 days. There was a significant reduction of inflammatory events from 7 to 30 days, which suggests that the three pastes are biocompatible.

## REFERENCES

1. Chilton NW. Design and analysis in dental and oral research, 2nd edn. Nova York, NY, USA: Praeger 1982.
2. Figueiredo JA, Pesce HF, Gioso MA, Figueiredo MA. The histological effects of four endodontic sealers implanted in the oral mucosa: submucous injection versus implant in polyethylene tubes. *Int Endod J* 2001; 34: 377-385.
3. Hermann RW. Calciumhydroxid als Mittel zum Behandeln und Füllen von Zahnwurzelkanälen, 1920. Diss Wurrburg.
4. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabe PE, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999; 25: 161-166.
5. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco Junior IM, Bernabe PE, Otoboni Filho JA, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentine tubes filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J* 2001; 12: 03-08.
6. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PE, Filho JA, Junior ED, Murata SS. Calcium salts deposition in rat connective tissue after the implantation of calcium hydroxide-containing sealers. *J Endod* 2002; 28:173-176.
7. Leonardo MR, Almeida WA, Ito IY, Silva LAB. Radiographic and microbiologic evaluation of post-treatment apical and periapical repair of root canals of dogs teeth with experimentally induced chronic lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 232-238.
8. Leonardo MR, Almeida WA, da Silva LA, Utrilla LS. Histopathological observations of periapical repair in teeth with radiolucent areas submitted to two different methods of root canal treatment. *J of Endod* 1995; 21: 137-141.
9. Silva LAB, Leonardo MR, Faccioli LH, Figueiredo F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *J Endod* 1997; 23: 86-90.
10. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1996; 21: 379-387.
11. Zmener O, Guglielmotti MB, Cabrini RL. Tissue response to an experimental calcium hydroxide-based endodontic sealer: a quantitative study in subcutaneous connective tissue of rat. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 66-72.

# Reazione del tessuto connettivo di ratto all'impianto di tubi di polietilene contenenti paste all'idrossido di calcio

*Traduzione dell'articolo:*

## Reaction of rat connective tissue to implants of polyethylene tubes containing calcium hydroxide pastes

### RIASSUNTO

**Scopo:** le sostanze o i materiali immessi in commercio dovrebbero essere studiati scientificamente prima di essere usati negli esseri umani, passando attraverso tutti i livelli di indagine. Alcune paste all'idrossido di calcio, come UltraCal XS e Calcicur, sono usate oggi in endodonzia. Lo scopo di questo studio è stato di valutare la risposta tissutale (a 7 e 30 giorni dall'impianto) verso tre diverse paste all'idrossido di calcio - UltraCal XS, Calcicur ed una soluzione acquosa di idrossido di calcio - impiantate nel connettivo sottocutaneo del dorso di ratti Wistar.

**Metodi:** quattro tubi di polietilene contenenti una delle tre paste sono stati inseriti nel tessuto sottocutaneo del dorso di ciascuno dei 16 ratti, secondo un criterio di randomizzazione stratificato. Dopo il sacrificio degli animali, i campioni sono stati raccolti e preparati per l'analisi istologica. I vetrini sono stati analizzati quantitativamente per la presenza di neutrofili, linfociti e plasmacellule, eosinofili, macrofagi e cellule giganti, così come per la presenza di fibrina e di ascessi.

**Risultati:** non sono risultate differenze statisticamente significative tra i tre materiali a 7 e 30 giorni. Tuttavia, l'analisi istologica ha rivelato da 7 a 30 giorni una riduzione dei punteggi nelle tre paste all'idrossido di calcio (two-way ANOVA).

**Conclusione:** le tre paste analizzate sono state trovate biocompatibili a 7 e 30 giorni dall'impianto.

**Parole chiave:**

Endodonzia, idrossido di calcio, istocompatibilità.

### INTRODUZIONE

L'introduzione dell'idrossido di calcio in odontoiatria è da attribuire a Hermann (3) ed è comunemente usato per incappucciamenti, pulpotomie, apicizzazioni, medicazione intracanalare, trattamento delle perforazioni e dei riassorbimenti radicolari.

Gli studi condotti in vivo con animali da laboratorio hanno valutato l'uso dell'idrossido di calcio ed i suoi effetti sulla biologia e fisiologia tissutale. I risultati dei test di biocompatibilità forniscono dati istopatologici per valutare gli effetti dei materiali sul tessuto connettivo quando questi materiali sono posizionati in dentina o in tubi di polietilene impiantati nel tessuto connettivo sottocutaneo o sottomucoso di ratto (2, 4-6, 9, 10).

Tutte le sostanze o i materiali immessi in commercio dovrebbero essere studiati scientificamente prima di essere usati negli esseri umani, passando attraverso tutti i livelli di indagine. Alcune paste all'idrossido di calcio, come UltraCal XS e Calcicur, sono usate oggi in endodonzia, ma si è prodotta poca letteratura che illustri il loro comportamento biologico. Lo scopo di questo studio è stato di valutare la risposta tissutale (a 7 e 30 giorni dall'impianto) verso tre diverse paste all'idrossido di calcio - UltraCal XS, Calcicur ed una soluzione acquosa di idrossido di calcio - impiantate nel connettivo sottocutaneo del dorso di ratti Wistar.

### MATERIALI E METODI

Il protocollo di questo studio è stato valutato ed approvato dal Comitato Etico sulla Ricerca

Animale della Università Luterana del Brasile (approvazione n. 2004-009 A).

Prima dell'inizio dello studio, 16 ratti Wistar maschi, di circa 60 giorni e con un peso di circa 200 g, sono stati selezionati ed esaminati dal veterinario per assicurare la loro buona salute. Gli animali sono stati divisi in maniera casuale in due gruppi di 8 ratti, a seconda dei tempi sperimentali: gruppo 1-7 giorni; gruppo 2-30 giorni. I ratti sono stati alloggiati in maniera casuale in 5 gabbie e individualmente identificati attraverso segni di riconoscimento sulla coda, effettuati con vernici non tossiche.

#### *Preparazione dei tubi da impiantare*

Sessantaquattro tubi di polietilene non tossico, di 5 mm di lunghezza e di diametro interno di 1,3 mm, con estremità aperte, sono stati ricavati da Scalp Vein 19G (Terumo, Medical Corporation, Tokyo Japan), precedentemente autoclavati.

L'UltraCal XS ed il Calcicur sono stati applicati tramite siringhe connesse con i puntali dispensatori forniti. La soluzione acquosa di idrossido di calcio (1.2 g di calcium hydroxide - lab grade, Riedel De Haën AG, Seelze, Hannover, Germany, e 1.0 ml di acqua distillata, Farmácia Escola, ULBRA, Canoas, Brazil) è stata inserita nei tubi di polietilene tramite siringa di plastica e ago monouso. L'UltraCal XS, il Calcicur e la soluzione acquosa sono state iniettate lentamente in ogni tubo. Il tubo si considerava riempito quando la pasta fuoriusciva all'estremità opposta. La procedura veniva effettuata pochi minuti prima che l'animale venisse anestetizzato.

Per il primo e secondo tempo sperimentale (7 e 30 giorni), quattro tubi di polietilene sono stati impiantati nel tessuto sottocutaneo di ciascun animale. La scelta del quadrante in cui impiantare i diversi tubi è stata condotta in maniera random stratificata.



### Anestesia degli animali

Per le procedure di questo studio, gli animali sono stati anestetizzati con un farmaco dissociativo (5% ketamina, Vetanarcol, König, Germany) somministrato unitamente ad un agente miorilassante (2% xylazina, Kensol, König, Germany). I due farmaci sono stati miscelati ad un rapporto 1:1 in una siringa. Sono stati somministrati 0,2 ml/100 g intramuscolo per ogni animale, in modo da ottenere una anestesia generale di 50-80 minuti.

### Impianto nel tessuto sottocutaneo

Dopo l'anestesia, la regione dorsale è stata disinfettata con clorexidina 0,2% e il pelo è stato rimosso dal sito chirurgico con forbici veterinarie Golden A5 (Oster Professional Products, McMinville, Tennessee, USA) e rasoio Oster A5 misura 40 (Oster Professional Products, McMinville, Tennessee, USA).

Due incisioni verticali lunghe 15 mm e distanti tra di loro 30 mm sono state praticate seguendo l'asse lungo del dorso, usando una lama 15 (Solidor, São Paulo, Brasil) montata su manico (Edlo Ltda, RS, Brasil). Il tessuto sottocutaneo è stato scollato obliquamente, caudalmente nella incisione inferiore e cranialmente nella incisione superiore. Quattro tasche di 20 mm, una in ogni lato di ogni incisione, sono state create con l'ausilio di forbici smusse. Si è poi introdotto un tubo riempito di pasta in ognuna delle tasche. Le incisioni sono state suturate con monofilamento 4.0 di nylon (Biodinâmica, Paraná, Brazil). I ratti sono stati mantenuti in gabbie con mangime e acqua ad libitum, replicando le condizioni in cui erano mantenuti prima delle procedure.

### Sacrificio degli animali

Sette giorni dopo le procedure cliniche, 8 ratti sono stati anestetizzati come descritto in precedenza e sacrificati mediante iniezione intracardiaca di cloruro di potassio. Gli altri 8 ratti sono stati sacrificati a 30 giorni. Immediatamente dopo il decesso gli animali sono stati messi in soluzione al 10% di formalina tamponata fino al momento della dissezione delle regioni in cui erano stati impiantati i tubi.

### Raccolta dei campioni istologici

Le regioni in cui erano stati impiantati i tubi sono state escisse con una lama 15 montata su manico. I campioni sono stati posti in contenitori etichettati in soluzione al 10% di formalina tamponata fino al momento dell'esame istologico.

### Processazione dei campioni istologici

I campioni istologici sono stati processati nel Laboratorio Istopatologico della Universidade Luterana do Brasil. Cura particolare è stata posta affinché il tessuto in contatto con il materiale impiantato fosse rivolto verso il basso quando i campioni sono stati inclusi in paraffina. Cinque sezioni istologiche semi-seriali dello spessore di 5 mm sono state ottenute con un microtomo (Leica RM 2025, Nussloch, Germany). Le sezioni sono state colorate con ematossilina di Harris e eosina alcolica.

### Analisi dei risultati

Un singolo osservatore, ignaro delle procedure e finalità dello studio, ha analizzato tutti i campioni istologici con un microscopio ottico Zeiss a 100, 200, 400 ingrandimenti. Per ognuno dei campioni è stato scelto il vetrino più rappresentativo. Ogni vetrino scelto mostrava come minimo una apertura del tubo impiantato con del tessuto adiacente. I vetrini sono stati analizzati qualitativamente per la presenza di neutrofili, linfociti e plasmacellule, eosinofili, macrofagi e cellule giganti, così come per presenza di ascessi e fibrina (2).

Gli eventi infiammatori sono stati classificati nel modo seguente:

- 1 - assente: le cellule infiammatorie non sono state visualizzate o sono state trovate solo all'interno dei vasi sanguigni;
- 2 - lieve: le cellule infiammatorie erano diffuse in maniera sparsa o formavano piccoli gruppi;
- 3 - moderato: le cellule infiammatorie erano presenti ma non predominanti nel campo di osservazione;
- 4 - severo: le cellule infiammatorie formavano infiltrati in aree adiacenti il materiale impiantato.

La formazione di fibrina è stata classificata nel seguente modo:

- 1 - assenza di fibre collagene nell'area che conteneva il materiale in questione;
- 2 - un sottile strato di fibre collagene circondava il sito dell'impianto;
- 3 - uno spesso strato di fibre collagene circondava il sito dell'impianto.

Gli ascessi, identificati dalla presenza di neutrofili morti in un'area poco colorata del campo, sono stati classificati nel seguente modo:

- 1 - assenza di ascessi;
- 2 - ascesso adiacente al sito dell'impianto;
- 3 - ascesso diffuso in aree distanti dal sito dell'impianto.

### Analisi statistica

È stata impiegata one-way ANOVA per comparare i risultati delle analisi cellulari a 7 e 30 giorni, indipendentemente. ANOVA per misurazioni ripetute è stata impiegata per comparare i differenti materiali impiantati in tempi differenti. La significatività è stata posta per  $\alpha = 5\%$  e i dati analizzati con il programma SPSS 11.

## RISULTATI

La Tabella 1 mostra i risultati delle analisi istologiche a 7 giorni. Non si sono trovate differenze statisticamente significative tra i tre materiali. L'analisi dei vetrini UltraCal XS ha mostrato neutrofili sparsi, cioè una infiammazione lieve. Calcicur e la pasta di controllo hanno mostrato risultati simili: i neutrofili erano presenti, ma non predominanti, nel campo di osservazione. Tuttavia, i linfociti e le plasmacellule formavano infiltrati nelle aree adiacenti al sito dell'impianto in un numero significativo di vetrini. Similmente, i macrofagi tendevano ad essere predominanti nel campo microscopico e sono stati trovati in aree adiacenti al sito dell'impianto. La formazione di fibrina è stata osservata come un sottile strato di fibre collagene che circondavano i siti degli impianti. Non sono stati trovati ascessi nella maggior parte dei campioni; quando erano presenti essi erano in prossimità dei siti degli impianti. I neutrofili sono stati raramente osservati dopo 30 giorni di contatto dei materiali con il tessuto sottocutaneo (Tab. 2). Sebbene in maniera non statisticamente significativa, linfociti e plasmacellule erano sparsi o raggruppati in piccoli gruppi nei campioni con UltraCal XS, mentre nei campioni con Calcicur e la soluzione acquosa erano presenti ma non predominanti nel campo microscopico. Meno macrofagi sono stati ritrovati a 30 giorni rispetto a 7 giorni, ed i punteggi tendevano ad attestarsi intorno a 2. La formazione di fibrina è stata osservata come uno strato sottile di fibre collagene nei campioni delle tre paste all'idrossido di calcio studiate. Nessun vetrino ha mostrato aree di ascessi.

Punteggi inferiori sono stati trovati per neutrofili, linfociti/plasmacellule, macrofagi, fibrina e formazione di ascessi a 30 giorni rispetto a 7 giorni. Solo gli eosinofili non hanno mostrato variazioni di punteggio a 30 giorni (Tab. 3).

Le Figure 1-6 mostrano le immagini istopatologiche delle tre paste all'idrossido di calcio a

7 e 30 giorni.

## DISCUSSIONE

L'idrossido di calcio è stato usato ampiamente sin dagli anni '70, ed è attualmente impiegato come medicazione intracanalare in denti necrotici e con reazione periapicale cronica per il suo alto potenziale battericida e per la sua biocompatibilità. È la medicazione più frequentemente usata per queste condizioni, e la sua applicazione è normalmente una delle procedure usate per combattere i microrganismi che sopravvivono a detersione e sagomatura (7, 8).

Gli impianti in tubi di polietilene sono usati per valutare la biocompatibilità perché il tessuto connettivo li tollera bene ed il materiale in indagine può essere rimosso senza il rischio di reazione contro il tubo, che invece può essere osservata quando si usano tubi di dentina. Inoltre, i tubi di polietilene possono essere sterilizzati, il loro diametro interno è standardizzato e la loro forma cilindrica è adeguata a trattenere il materiale e per essere inseriti nei tessuti da analizzare.

Ancora, entrambe le estremità del tubo possono essere mantenute aperte, il che assicura che l'analisi dei tessuti può essere effettuata anche se una delle estremità è in qualche modo compromessa. Le probabilità di perdere dei campioni sono quindi ridotte. L'inserzione dei materiali, soprattutto paste, è semplice, e non si generano bolle o vuoti di riempimento. Un aspetto sfavorevole di questo metodo è il rischio di una fuoriuscita di materiale al momento dell'inserzione, che può risultare in materiale più abbondante da una parte che dall'altra. La preparazione di tasche attraverso incisioni, così come l'attento posizionamento dei tubi, minimizza questo rischio.

Il motivo della scelta dei ratti Wistar per l'impianto dei tubi di polietilene era di ottenere un modello biologico standard. L'età ed il peso degli animali sono stati accertati per assicurarsi che gli animali fossero in buona salute e potessero sopravvivere alle procedure dello studio (10).

La randomizzazione stratificata dell'inserimento degli impianti nei quattro quadranti del dorso degli animali è stata fatta per minimizzare il possibile effetto del fattore posizione alle risposte infiammatorie e per avere materiale da analizzare da tutti i quattro quadranti. Il protocollo di anestesia usato in questo stu-

dio ha un tempo di induzione tra i 5 e 7 minuti, e un tempo di recupero relativamente breve se paragonato ad altri protocolli (30 -40 minuti), che preclude il monitoraggio postoperatorio. L'anestesia è stata mantenuta attraverso la somministrazione di 0.1ml/100 g dello stesso mix ogni volta che gli animali mostravano segni di risveglio dall'anestesia, avendo cura di non somministrare dosi multiple successive, che avrebbero potuto portare ad effetti indesiderati da accumulo.

Per minimizzare la sofferenza degli animali al momento del sacrificio, l'iniezione intracardiaca di KCl è stata fatta sotto anestesia. Questa tecnica è stata approvata dal Comitato Etico perché presumibilmente causa meno sofferenza agli animali rispetto all'overdose di anestetico, all'uso di etere o alla lussazione cervicale.

Un solo osservatore, esperto nell'analisi di vetrini istologici, ha condotto le analisi qualitative e quantitative considerando la soggettività dell'interpretazione degli eventi istologici. L'osservatore non era al corrente dei materiali usati in questo studio, così come dei time points. Quindi, l'osservatore non è stato influenzato nell'interpretazione delle reazioni tissutali.

Anche se l'ANOVA si usa per comparare variabili parametriche, è stata usata anche per valori categoriali (scores) perché, contrariamente a quanto si crede, l'inferenza nell'analisi di variabili ordinali può prevedere procedure parametriche. Ai dati categoriali ordinali possono essere assegnati scores, come 1, 2, 3 e 4, e quindi possono essere calcolate le medie (1). I risultati delle analisi di compatibilità biologica hanno rivelato una riduzione di eventi istologici con il passare del tempo. Questo profilo è stato trovato per tutte le paste ed è in accordo con precedenti studi (5, 6). La risposta a 7 giorni di contatto con una pasta aiuta nel capire l'effetto del tempo, ma dovrebbe essere valutata con cautela. Parte delle risposte tissutali è causata dalla procedura chirurgica di posizionamento dei tubi. Torneck (10) ha dimostrato che la risposta cellulare in aree adiacenti a tubi vuoti era evidente in un simile lasso di tempo.

La risposta alle differenti paste a 7 giorni era statisticamente simile. L'analisi generale degli eventi ha mostrato che con UltraCal XS erano presenti meno neutrofili che con il Calci-cur ed il controllo. Questi risultati possono essere imputati ad una maggiore viscosità dell'UltraCal XS, che quindi si diffonderebbe nei tessuti più lentamente, rimanendo nei tubi più a lungo. Il Calci-cur e le soluzioni acquo-

se, tuttavia, non solo si diffonderebbero più velocemente ma stimolerebbero anche il sistema immunitario, con una digestione ed eliminazione più veloce del materiale estraneo da parte dei neutrofili. Questo evento non sembrerebbe causare la morte dei neutrofili, che altrimenti sarebbe risultata in formazione di pus. I neutrofili sembra che diminuiscano la loro partecipazione nel processo infiammatorio con l'andare del tempo.

La riduzione delle cellule presenti ed una risposta da lieve a moderata sono state trovate nella maggior parte dei campioni a 30 giorni per tutte le paste. Di nuovo, l'UltraCal XS ha mostrato meno reazione tissutale per quello che attiene alla presenza di linfociti e plasmacellule. Queste cellule sono associate a processi cronici e partecipano ai meccanismi umorali e cellulari formando anticorpi o producendo citochine che raggiungono differenti tessuti e stimolano reazioni infiammatorie a cascata. Quando l'irritazione locale cessa, i fattori di crescita sono rilasciati, stimolando la proliferazione locale di cellule del connettivo e il ristabilimento delle normali condizioni. Perciò, se plasmacellule e linfociti sono meno presenti nei tessuti in contatto con l'UltraCal XS, l'effetto della viscosità di cui abbiamo discusso prima è plausibile. Una viscosità maggiore porta ad un graduale incremento del pH e ad un lento rilascio di ioni, con risposte meno evidenti da parte delle cellule di difesa.

Le considerazioni fatte dovrebbero essere interpretate alla luce del fatto che le analisi statistiche non hanno confermato la significatività di queste osservazioni. Non ci sono state differenze statisticamente significative per quello che riguarda i criteri adottati ed il numero di campioni analizzati. Malgrado ciò, dovrebbe essere considerata la rilevanza delle osservazioni fatte negli studi biologici, e non dovrebbero essere i test statistici l'unico parametro di analisi.

## CONCLUSIONI

Il Calci-cur, l'UltraCal XS e la pasta di controllo hanno avuto comportamenti simili nei tessuti sottocutanei a 7 e 30 giorni. C'è stata una significativa riduzione di eventi infiammatori da 7 a 30 giorni, il che suggerisce che le tre paste sono biocompatibili.

*Traduzione a cura del Dott. Cristiano Fabiani*