

INFLUÊNCIA DE CIMENTOS ENDODÔNTICOS NA MIGRAÇÃO NEUTROFÍLICA PELO TESTE "SKIN WINDOW"

THE INFLUENCE OF ROOT CANAL SEALING MATERIALS IN NEUTROPHILIC MIGRATION BY THE SKIN WINDOW TEST

Christiane C. V. BERBERT*

Alberto CONSOLARO**

O teste "skin window" preconizado por Rebeck em 1955 e adaptado para testar materiais odontológicos, foi aplicado em dez voluntários. Quatro testes foram realizados na região ventral do antebraço esquerdo de cada pessoa visando comparar a biocompatibilidade dos cimentos obturadores Sealapex, CRCS, ZOE, tendo a vaselina sólida como controle. Foram avaliadas as influências quimiotáticas exercidas pelos materiais sobre os PMNs neutrófilos, bem como as alterações morfológicas induzidas sobre estes. Os resultados demonstraram diferenças qualitativas e quantitativas em relação aos materiais testados. Quantitativamente, os resultados quanto à migração celular, tiveram a seguinte ordem crescente em relação aos materiais: vaselina, Sealapex, CRCS e ZOE. Quanto à agressão celular em ordem decrescente, tivemos os cimentos Sealapex, CRCS, ZOE e a vaselina. Pelos resultados obtidos constatou-se que o teste "skin window" é um modelo experimental viável para o teste de biocompatibilidade dos materiais odontológicos.

UNITERMOS

Canal Radicular, material obturador; Técnica de Skin window.

* Professora Assistente do Departamento de Odontologia Restauradora, Área de Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, São Paulo, Brasil.

** Professor Livre Docente, Chefe do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauri - USP, São Paulo, Brasil.

INTRODUÇÃO

As várias propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais obturadores, tem sido estudadas através de testes *in vitro* e *in vivo* sistematizados pela F.D.I. (1980) e pela ANSI/ADA (1979, 1982). Porém, novas metodologias experimentais são desenvolvidas gerando testes menos complexos e de realização mais rápida, que atuem como testes de triagem ou "screening tests", incorporáveis ao rol daqueles já consagrados (Hensten-Pettersen, 1988; Jowet, Fergusson & Combe, 1987; Takahara, Onodera & Matsumoto, 1990; Zmener & Cabrini, 1986).

O teste "skin window" preconizado por Rebeck & Crowley (1955) surge como perspectiva de teste imediato, rápido e aplicável *in vivo*, adaptável para avaliar a interação dos cimentos obturadores com os componentes do infiltrado inflamatório inicial. Na avaliação da biocompatibilidade de materiais odontológicos, esse teste "skin window" nunca tinha sido utilizado, não obstante apresente alguns pontos comuns com o da câmara Boyden utilizado por Doblecki et al. (1980). Guimarães & Percinoto (1984); Birman & Magalhães (1984) e Feiglin (1987), examinaram *in vivo*, o afluxo e fusão de células fagocitárias mononucleares sobre lamínulas de vidro recobertas por cimentos obturadores, implantadas em subcutâneo de ratos.

Os resultados demonstraram que materiais muito tóxicos induzem granulomas sobre as lamínulas com maior concentração de macrófagos (Feiglin, 1987), porém, com poucas células gigantes (Guimarães & Percinoto, 1984).

Ferraz et al. (1990) compararam três metodologias para avaliação da compatibilidade de cimentos endodônticos em tecido subcutâneo de ratos, recobrimo lamínulas de vidro circulares, ou preenchendo tubos de polietileno, ou ainda como corpos de prova. Os resultados evidenciaram ser o implante de lamínulas de vidro circulares o método mais apropriado para esse estudo, por propiciar maiores áreas de avaliação microscópica.

MATERIAL E MÉTODOS

O teste "skin window" foi aplicado em 10 voluntários, de ambos os sexos, com idade média de 26,7 anos; testando os cimentos obturadores de canal Sealapex, CRCS (Calciobiotic Root Canal Sealer) e ZOE, comparando-os com controle de vaselina sólida. Esses

testes, em número de quatro por pessoa, foram realizados na região ventral do antebraço esquerdo após antissepsia da região com álcool 77v/v. A partir de uma escarificação da pele em forma circular, de diâmetro médio de 5 mm e profundidade dermo-papilar (até que os primeiros pontos sanguíneos aparecessem) distanciadas cerca de 4 cm umas das outras, confeccionadas pela raspagem com lâmina de bisturi nº 15 montada em cabo BP.

Lamínulas de vidro redondas de 18 mm de diâmetro, portando uma gotícula de material recém-espátulado colocado em seu centro, foram levadas sobre cada escarificação e assim mantidas recobertas com papel cartão e esparadrapo hipoalergênico, por um período de 3 horas. A seguir, as lamínulas foram removidas, mantidas em solução álcool-éter por 15 minutos, coradas em H.E., montadas em lâminas de vidro para microscopia e submetidas à análise pelo microscópio óptico.

Na região dos testes, as lesões foram limpas com solução antisséptica e deixadas expostas ao meio ambiente até cicatrização.

ANÁLISE MICROSCÓPICA

Procedeu-se:

1) Uma análise morfológica descritiva das lamínulas, observando as relações entre os PMNs neutrófilos aderidos à lamínula e o material obturador, bem como a distribuição e os aspectos morfológicos particulares dessas células.

2) Uma análise morfológica qualitativa dos PMNs neutrófilos, considerando os seguintes parâmetros:

- ◆ Densidade citoplasmática;
- ◆ Uniformidade do citoplasma em relação à sua coloração e contorno;
- ◆ Ruptura da membrana celular;
- ◆ Fragmentação nuclear.

Todos os critérios da análise morfológica foram mensurados subjetivamente adotando-se os escores da tabela I.

TABELA I - Atribuição dos escores de acordo com os fenômenos morfológicos observados na análise microscópica.

Fenômenos celulares	Magnitudes dos fenômenos	Valores
densidade citoplasmática	discreta	1
	moderada	2
	intensa	3
citoplasma irregular	discreta	4
	moderada	5
	intensa	6
ruptura da membrana celular	discreta	7
	moderada	8
	intensa	9
com fragmentação nuclear		10

Esses escores foram somados para cada pessoa e material e submetidos à análise estatística.

Também foi estudada a relação dos PMNs com os materiais testados quanto à sua distribuição, segundo os seguintes parâmetros:

◆ **Interação direta:** quando as células mostravam ou aderência na forma de pseudópodos à superfície do material ou quando encontrava-se fragmentos do material no interior dos PMNs neutrófilos, sem formação de halo.

◆ **Indireta:** com formação de halo ao redor do material.

3) Uma análise microscópica quantitativa, determinando o número de células fixadas às lamínulas, contadas com auxílio de uma ocular Kpl 8x com retículo de integração II Zeiss de 100 pontos e objetiva 40 x. Essa contagem seguiu uma orientação onde o retículo foi superposto a 50 campos microscópicos, seguindo-se linhas sinuosas com direção direito-superiores (25 campos) e esquerdo-inferiores (25 campos). Em cada campo microscópico foram computadas as células coincidentes com os pontos dentro do quadrado do retículo (Pi). Assim foram analisadas as 40 lamínulas. A partir do registro dos 50 campos para cada lamínula, procurou-se realizar uma casualização sistematizada sorteando-se 25 campos, cujas somas dos valores de Pi de cada paciente e cada material foram então utilizadas como dados permanentes para transformação em arco-seno e submissão à análise estatística.

RESULTADOS

ANÁLISE MORFOLÓGICA DESCRITIVA

Grupo controle: A distribuição dos PMNs neutrófilos ao redor do material se deu de forma irregular e indefinida, graças às características ópticas de transparência do material. Poucas alterações morfológicas foram observadas, e, quando ocorreram, foram na forma de um aumento da densidade citoplasmática (figura 1).

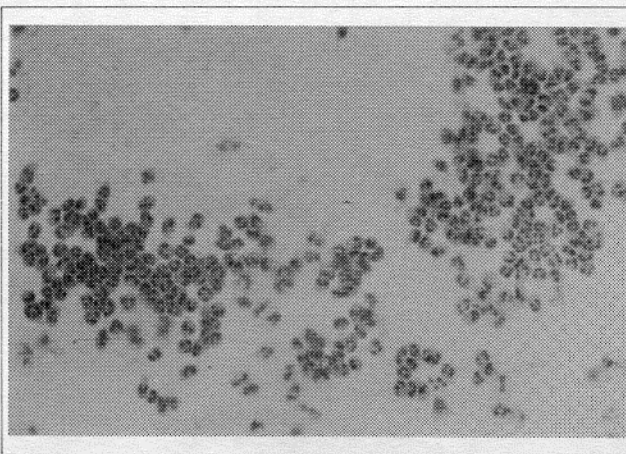


FIGURA 1 - Aspectos morfológicos dos PMNs neutrófilos observados nas lamínulas com vaselina.

Grupo ZOE: Os PMNs neutrófilos distribuíram-se geralmente de forma difusa, na periferia da área escarificada porém, a maioria das lamínulas demonstrou uma zona livre de células contígua à periferia imediata do material (figura 2). Essa zona encontrou-se livre de células ou de qualquer estrutura. Esses neutrófilos que a circundavam apresentaram, em sua grande maioria, aspectos de normalidade, embora alguns elementos celulares revelassem citoplasma denso, por vezes irregular. Raramente se constatou ruptura da membrana celular com ou sem fragmentação nuclear.

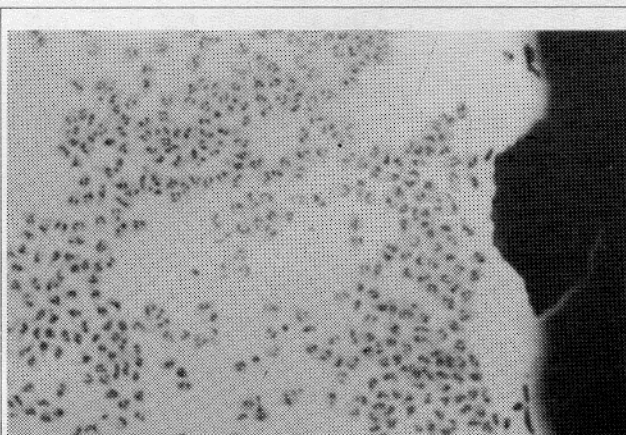


FIGURA 2- Aspectos morfológicos dos PMNs neutrófilos observados nas lamínulas com o cimento ZOE colocado na porção central da lamínula.

Grupo CRCS: Nesse grupo os PMNs neutrófilos geralmente se apresentaram numa relação direta com a superfície do material e nestes locais, o aumento da densidade citoplasmática foi evidente, porém, preservando-se geralmente a forma e a estrutura celulares. Ocasionalmente notou-se pequenos halos ou zonas livres de células, lembrando o que ocorreu com o ZOE, porém, em dimensões reduzidas. Raramente se constatou a presença de ruptura da membrana celular (figura 3).

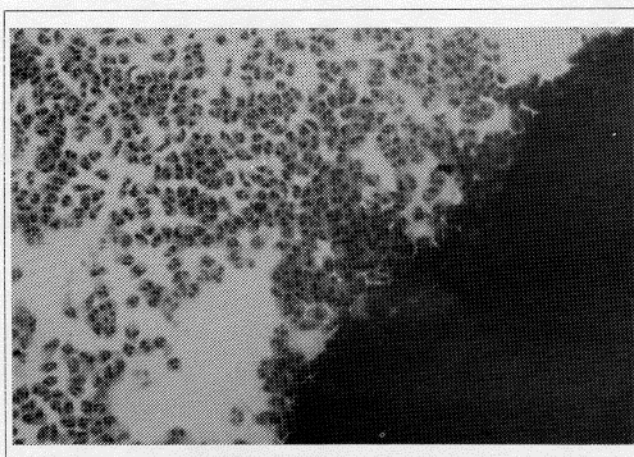


FIGURA 3- Aspectos morfológicos dos PMNs neutrófilos observados nas laminulas com CRCS.

Grupo Sealapex: Os PMNs neutrófilos do grupo Sealapex apresentaram relação direta com a superfície do material e, em geral, essas células demonstraram avidez por fagocitá-lo, fato este evidenciado pela presença de deformações em seu citoplasma, irregulares em seu contorno ou ainda com granulações intracitoplasmáticas. Com frequência ocorreu a ruptura da membrana celular, sendo que, em certos lugares observou-se uma citólise neutrofílica abundante (figura 4). À distância do material, os PMNs neutrófilos se apresentaram normais, a ainda que, em pequenos focos, algumas células apresentassem um citoplasma irregular e núcleo com cromatina disposta grosseiramente.

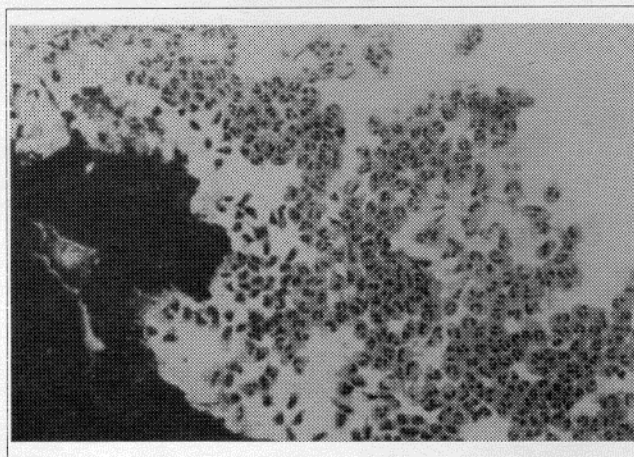


FIGURA 4 - Aspectos morfológicos dos PMNs neutrófilos observados nas laminulas com Sealapex, obtidos após período de 3 horas pelo teste "skin window".

ANÁLISE MORFOLÓGICA QUALITATIVA

Os resultados da análise qualitativa estão representados na tabela II.

TABELA II - Somas dos escores representativos da magnitude das alterações morfológicas dos PMNs neutrófilos, distribuídas em função de pessoas e dos materiais ordenados.

MATERIAL	PESSOAS										Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
vaselina	2	1	2	1	1	2	1	1	1	2	14
ZOE	10	1	2	4	1	5	4	1	1	2	31
CRCS	2	7	2	7	4	2	2	2	7	7	42
Sealapex	7	8	8	8	8	8	10	10	7	10	84

Esses dados foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis e contrastados pelo método de Miller, determinando que a vaselina e o ZOE não tiveram diferenças estatisticamente significantes entre si, porém, o primeiro destacou-se do CRCS ($p < 0,01$) e este do Sealapex ($p < 0,01$).

ANÁLISE QUANTITATIVA

Os resultados da análise quantitativa dos PMNs neutrófilos estão na tabela III.

TABELA III - Somatória dos pontos incidentes em 25 campos (Pi) para cada material e pessoa, representando a migração de PMN neutrófilos.

Materiais	Pessoas										total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
vaselina	104	117	87	238	83	162	366	102	171	58	148,8
sealapex	110	84	435	114	202	117	490	97	246	195	209,0
CRCS	110	128	894	257	193	70	254	224	514	758	340,2
ZOE	148	387	660	612	286	116	159	61	734	438	360,1

Esses dados, submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey Kramer em nível de significância (5% ou $p < 0,05$) determinaram a ordenação do material, em ordem crescente, quanto à migração celular mostrada na tabela III. A diferença foi significativa entre o primeiro e o último classificados ($p < 0,05$)

DISCUSSÃO

A técnica de obtenção da janela cutânea no teste "skin window" demonstrou ser relativamente fácil e segura de ser realizada. Variações quanto à profundidade e extensão da janela podem ocorrer, e, para padronizá-las, foram necessários ensaios preliminares. Durante a escarificação, a profundidade deve ser suficiente para a exposição do córion induzindo, posteriormente, uma reparação sem lesões hemorrágicas, além disso, a extensão deve ser maior do que a preconizada por Rebeck (1955) visando expor uma área de tecido conjuntivo maior, de forma a permitir a observação microscópica dos fenômenos induzidos, perifericamente ao material. Os resultados demonstraram que os fenômenos qualitativos determinados pela relação dos PMNs neutrófilos com o material, bem como a manutenção da integridade dessas células, parecem ser mais relevantes na avaliação da compatibilidade dos materiais do que a contagem das células que se fixaram à lamínula atraídas por influência quimiotática do material. O teste apresenta vantagens como a de ser *in vivo* e por não implicar no sacrifício dos animais, e por conseguinte, passível de ser aplicado em humanos, o que minimiza as restrições inerentes à extrapolação dos resultados para situações reais, como aquelas dos testes *in vitro* ou mesmo nos experimentos com animais. Além disso, os trabalhos existentes na literatura utilizam-se, geralmente, de tempos experimentais mais prolongados, avaliando assim as interações celulares tardias ou o infiltrado inflamatório mais crônico ou mesmo o processo reparativo. Pesquisas visando estudar as respostas inflamatórias

inespecíficas presentes nas primeiras horas do processo inflamatório avaliando, em especial, os fenômenos decorrentes da atividade dos PMNs neutrófilos de materiais *in vivo*, seriam de grande valia por antever, até certo ponto, os fenômenos tardios. Esse experimento permitiu avaliar a interação PMNs neutrófilos com o material endodôntico nas primeiras horas do processo inflamatório, admitindo certa extrapolação para região apical de dentes humanos, já que sua realização em antebraços humanos e a colocação dos materiais em teste diretamente sobre o tecido conjuntivo simula o contato entre o material obturador e o tecido pulpar ou periodontal de dentes que receberam sobreobturação. Murph (1985) constata a validade de modelos experimentais que utilizam de materiais recém espatulados colocados em tubos de plástico ou de vidro com diâmetro interno em torno de 1 mm, por reproduzem condições clínicas, simulando a área do foramen apical normal, facilitando assim a interpretação dos resultados. O fato dos cimentos obturadores ZOE e CRCS terem exercido maior quimiotaxia do que o Sealapex e o controle Vaselina, encontra embasamento nas afirmações de Galin; Wright & Schiffman (1978) que sugerem a existência de marcadores na superfície nas membranas celulares dos PMNs neutrófilos que seriam ativados para que essas células pudessem migrar para o tecido agredido. Doblecki et al. (1980), além de ressaltar a necessidade de correlacionamento dos resultados de testes *in vitro* com os *in vivo*, constataram, *in vitro*, pelas diferenças na quimiotaxia exercida pelos materiais obturadores de canal em câmaras Boyden, que, provavelmente, alguns materiais alteram as marcações superficiais dos PMNs neutrófilos ou exercem efeito citotóxico sobre estes, impedindo sua aproximação para junto dos materiais. Rebeck (1983) afirma que a quimiotaxia celular no teste "skin window" dependeria da ativação do sistema complemento, considerando como agentes quimiotáticos importantes a plasmina, produtos da fragmentação celular e da fibrinólise, além das enzimas liberadas pela destruição tecidual. Atualmente advoga-se que as prostaglandinas e os leucotrienos têm ação efetiva nesse processo de migração celular como constatado por Hashimoto et al. (1988) aplicando curativos de ZOE sobre cavidades em dentina, evidenciando, após 1 hora, uma diminuição da concentração de leucotrienos e de PMNs neutrófilos na polpa adjacente, concluindo que, sob uma concentração de 10 mM de eugenol, já ocorre uma inibição da biossíntese de leucotrienos e uma inibição precoce da quimiotaxia de neutrófilos. Embora nossos

resultados tenham evidenciado um maior número de PMNs neutrófilos nos grupos do ZOE e CRCS, a distribuição destes em relação aos materiais, revelou a presença de grandes halos ou zonas livres de células periféricas ao ZOE; o que, com o CRCS também esteve evidente, porém, na forma de áreas menores. Os PMNs neutrófilos ao redor dessas áreas se apresentaram sem ampla destruição ou fragmentação, fato esse atribuível provavelmente às propriedades químicas e biológicas do eugenol. O baixo índice de interação direta entre os PMNs neutrófilos e os cimentos CRCS e ZOE observado nesse experimento, tem explicação em constatações de autores como Hume (1986 e 1988) e Meryon (1988) que atribuem esse halo de inibição celular ao nível tóxico de eugenol gerado na periferia do material. Hume (1986) ao pesquisar o ZOE, caracterizou o eugenol como inibidor reversível ou não da respiração celular, na dependência de sua concentração, além de vasodilatador reversível e inibidor competitivo da síntese de prostaglandinas.

HUME (1988) constatou que pequenas concentrações de eugenol em torno de 10^{-5} a 10^{-6} mol/l já são suficientes para reduzir o consumo de O_2 intracelular em 50%. Hume (1984) relacionou o efeito medicamentoso ou tóxico do eugenol à dependência de sua concentração no tecido contactante. Esta, por sua vez, é dependente do tempo de contato do material com o tecido; da difusibilidade do eugenol pela massa do material recém espatulado e pela hidrólise superficial do material já endurecido. Essa concentração é mais dependente da área exposta do material do que da espessura deste (Hume 1984, 1986, 1988; Oliveira, 1975). Segundo Hume (1986) o fator mais atuante *in vivo* na graduação dessa concentração de eugenol é o grau de umidade presente na superfície de contato com o material e o tecido contactante, onde, comparativamente em tecido conjuntivo subcutâneo a liberação é muito mais rápida e intensa (cerca de 1000x maior) do que na dentina. Outro fato comprovado é que o eugenol se liga às proteínas do ágar (Imai et al., 1982) e à albumina do soro (Fujisawa & Masuhara, 1981), o que pode ter neutralizado, em parte, o eugenol dos materiais de nosso experimento. Um baixo índice de interação direta dos PMNs tanto com o ZOE como também, em parte, com o CRCS, provavelmente se deu pelo nível tóxico do eugenol liberado na área ao redor do material, o que não permitiu a fagocitose deste, e à distância do material esse eugenol foi sendo inativado pelas albuminas plasmáticas, resultando numa menor destruição celular em comparação com os do grupo do cimento Sealapex que não contém

eugenol em sua composição. Nesse grupo, a provável liberação rápida e intensa de íons cálcio e radicais hidroxila, determinou, além de uma interação direta dos PMNs neutrófilos, um elevado índice de rompimento citoplasmático e de fragmentação nuclear dessas células, com evidência de fagocitose de material. Segundo Gordon et al., 1985, é o pH alcalino gerado rapidamente pelo cimento Sealapex decorrente da rápida liberação de $Ca(OH)_2$ ou radicais hidroxila ou ainda Ca iônico o causador de morte celular, originando uma necrose localizada que, no futuro, servirá de apoio para formação de barreira calcificada. Morfologicamente pode-se deduzir que os PMNs neutrófilos entraram em contato direto com o Sealapex e depois de interagir e ou fagocitar esse material, sofreram um processo de degranulação lisossomal que causou ruptura da membrana celular, e em alguns casos até a ruptura nuclear. Finalmente, pode-se ressaltar que o teste "skin window" permitiu analisar comparativamente a citotoxicidade e a influência quimiotática dos materiais sobre os PMNs neutrófilos. O ZOE apesar de melhor preservar estruturalmente essas células, exerceu a maior quimiotaxia de todos os grupos experimentais. O Sealapex ainda que tenha atraído PMNs neutrófilos em menor número, propiciou uma degranulação exuberante dessas células culminando em uma citólise considerável. O CRCS, por sua vez, apresentou entre esses dois parâmetros de avaliação uma posição intermediária. Esses resultados avaliados conjuntamente com a análise das propriedades físicas e químicas destes materiais associados a resultados de outros experimentos realizáveis a médio e longo prazos nos tecidos periapicais, contribuirão para uma escolha mais consciente do material obturador a ser empregado.

CONCLUSÕES

◆ Os cimentos obturadores, imediatamente após sua exposição ao tecido conjuntivo, promoveram distintas atividades quimiotáticas e formas de interação com os PMNs neutrófilos, o que pode implicar em diferentes respostas teciduais reparativas a médio e longo prazos, sugerindo-se correlacioná-los em futuros estudos;

◆ O teste "skin window" parece ser um modelo experimental viável para se avaliar a biocompatibilidade imediata dos materiais obturadores endodônticos.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

ABSTRACT

A "skin window" test was performed in ten volunteers to compare Sealapex, CRCS, ZOE and solid vaselin. Four tests per person were performed at the ventral region of the forearm with a round escarification at subepidermal skin depth. Round glass slab carrying a small drop of freshly spatulated material on the center of the slab and positioned over the scarification during a period of three hours. Next, the slab were removed and immersed in a alcohol/ether solution for 15 minutes and them stained with hematoxylin and eosin and submitted to histopathology analysis. The number of PMNs neutrophils, its morphology and location in relation to the materials were observed. There were distinct quantitative and qualitative interactions with PMNs neutrophils. Quantitatively, following a crescent order, cell migration was successively greater in the vaseline, Sealapex, CRCS, and ZOE. Contrastingly, morphologically and in a crescent order, the consequent alterations due to cell injury was greater in the tests with vaseline, ZOE, CRCS and Sealapex. The results could demonstrate that the "skin window" test is a reliable experimental model to evaluate the immediate biocompatibility of root canal filling materials, with special regard to the cellular morphological alterations.

UNITERMS

Root Canal Filling Materials; Skin Window technic.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.BENATTI NETO, C. ET AL. Avaliação do comportamento tecidual das reações apical e periapical em dentes de cães de alguns produtos comerciais empregados em obturações de canais radiculares. *Rev. gaucha Odont.*, v.34, n.5, p.376-80, set./out.. 1986.
- 2.BIRMAN, E. G., MAGALHÃES, J. Estudo histopatológico do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos frente a implantes de lamínulas de vidro revestidas por cimentos obturadores de canal. *Rev. Fac. Odont. S. Paulo*, v.22, n.1/2, p.19-30, jan / dez. 1984.
- 3.DOUBLECKI, W. ET AL. Leukocyte migration response to dental materials using Boyden chambers. *J. Endod.*, v.6, n.7, p.626-40, July.1980.
- 4.FEIGLIN, B. Effect of some endodontic sealers on cell migration in experimental granulomas. *Oral Surg.*, v.63, n.3, p.371-4. Mar. 1987.
- 5.FERRAZ, S.L. ET AL. Study of the histocompatibility of endodontic cement in the subcutaneous tissue utilizing three methods. *Rev. Odont. USP*, v.4, n.3, p.241-6, jul./set.1990.
- 6.FOREMAN, P.C.; BARNES, I.E. A review of calcium hydroxide. *Int. Endod. J.*, v.23, p.283-97, 1990.
- 7.FUJISAWA, S.; MASUHARA, E. Binding of eugenol and O-ethoxybenzoic acid to bovine serum albumin. *J. dent. Res.*, v.60, p.860-4, 1981.
- 8.GALIN, J.I.; WRIGHT, D.C.; SCHIFFMAN, E. Role of secretory events in modulating human neutrophil chemotaxis. *J. clin. Invest.*, v.62, p.1364-74, Dec.1978.
- 9.GORDON, T.M.; RANLY, D.M.; BOYAN, B.D. The effects of calcium hydroxide on bovine pulp tissue: variations in pH and calcium concentration. *J. Endod.*, v.11, n.4, p.156-69, Apr.1985.
- 10.GUIMARÃES, S.A.C.; PERCINOTTO, C. Effect of some endodontic materials on the influx of macrophages and multinucleated giant cell development in experimental granulomas. *J. Endod.*, v.10, n.3, p.101-4, Mar.1984.
- 11.HASHIMOTO, S. ET AL. In vivo and in vitro of zinc oxide-eugenol (ZOE) on biosynthesis of cyclo-oxygenase products in rat dental pulp. *J. dent. Res.*, v.67, p.1092-6, 1988.
- 12.HENSTEN-PETTERSEN, A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int. Endod. J.*, v.21, p.89-99, Mar.1988.
- 13.HUME, W.R. An analysis of the release and the diffusion through dentin of eugenol from zinc oxide-eugenol mixtures. *J. dent. Res.*, v.63, n.6, p.881-4, 1984.
- 14.HUME, W.R. The pharmacologic and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. *J. Amer. dent. Ass.*, v.113, p.789-91, 1986.
- 15.HUME, W.R. Endodontic materials: reactor response. *Adv. dent. Res.*, v.2, n.1, p.29-32, Aug.1988.
- 16.HUME, W.R. In vitro studies on the local pharmacodynamics, pharmacology and toxicology of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Int. Endod. J.*, v.21, p.130-4, 1988.
- 17.IMAI, Y. ET AL. Evaluation of the biologic effects of dental materials using a new cell culture-technic. *J. dent. Res.*, v.61, p.1024-7, 1982.
- 18.JOWET, A.K.; FERGUSON, M.W.J.; COMBE, E.C. In vitro biocompatibility testing: a new organ culture model. *J. Dent.*, v.16, n.2, p.55-65, June.1987.
- 19.KOSLOV, M.; MASSLER, M. Histologic effects of various drugs on amputated pulps of rat molars. *Oral Surg.*, v.13, n.4, p.455-69, Apr.1960.
- 20.MERYON, S.D. An in vitro study of factors contributing to the blandness of zinc-oxide-eugenol preparations in vivo. *Int. Endod. J.*, v.21, p.200-4, 1988.
- 21.MJOR, I.A. Endodontic materials: reactor response. *Adv. dent. Res.*, v.2, n.1, p.25-8, 1988.
- 22.MURPHY, W.M. The testing of endodontic materials in vitro. *Int. Endod. J.*, v.21, n.2, Mar.1988.
- 23.OLIVEIRA FILHO, R.M. et al. Ações farmacológicas do eugenol. *Ars. Curandi Odont.*, p.3-14, set./out.1975.
- 24.ORSTAVIK, D. Endodontic materials. *Adv. dent. Res.*, v.2, n.1, p.12-24, Aug.1988.
- 25.REBUCK, J.W. The skin window as a monitor of leucocytic functions in contact activation factor deficiencies in man. *Amer. J. clin. Path.*, v.79, n.45, p.405-13, Apr.1963.
- 26.REBUCK, J.W.; CROWLEY, J.H. A method of studying leukocytic functions in vivo. *Ann N.Y. Acad. Sci.*, v.59, p.757-65.
- 27.TAGGER, M.; TAGGER, E.; KFIE, A. Release of calcium and hydroxyl ions from set endodontic sealers. Containing calcium hydroxide. *J. Endod.*, v.14, n.1, p.588-91, Dec.1988.
- 28.WILSON, A.D.; BATCHELOR, R.F. Zinc oxide augenol cements. II. Study erosion and desintegration. *J. dent. Res.*, v.49, n. 3, p.593-8, 1970.
- 29.ZMENER, O.; CABRINI, R.L. Adhesion of human blood monocytes and lymphocytes to different endodontic cements. A methodological in vitro study. *J. Endod.*, v.12, n.4, p.150-5, Apr.1986.