

JULIANA DUARTE BITTAR

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PULPAR A DIFERENTES  
MATERIAIS ODONTOLÓGICOS APÓS CAPEAMENTO  
DIRETO. ESTUDO *EX VIVO*.**

Brasília

2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JULIANA DUARTE BITTAR

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PULPAR A DIFERENTES  
MATERIAIS ODONTOLÓGICOS APÓS CAPEAMENTO  
DIRETO. ESTUDO *EX VIVO*.**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do Título de Mestre em Ciências  
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Orlando Ayrton de Toledo.  
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Bentes de  
Azevedo.

**Brasília**

**2010**

JULIANA DUARTE BITTAR

**TRABALHO DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DE  
NANOBIOTECNOLOGIA DO DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E  
MORFOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para obtenção do Título de Mestre em Ciências  
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 15/12/2010

**Banca Examinadora:**

Professor Doutor Orlando Ayrton de Toledo  
Universidade de Brasília

Professor Doutor Sacha Braum Chaves  
Universidade de Brasília

Professor Doutor Laudimar Alves de Oliveira  
Universidade Paulista

Professora Doutora Ana Cristina Barreto Bezerra  
Universidade de Brasília

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus queridos pais que sempre me apoiaram e compreenderam todas as minhas decisões, e desta forma me proporcionaram concluir esta importante conquista profissional e acadêmica.

Ao meu amado filho Alessandro, que sempre me apoiou, com seu enorme carinho. Motivação da minha vida e da busca pela minha realização pessoal e profissional. Foi companheiro em alguns experimentos, sempre paciente e colaborador.

Aos meus familiares que de diferentes formas contribuíram para que esta conquista fosse realizada.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Orlando Ayrton de Toledo, pela contribuição para o meu desenvolvimento como pessoa e como pesquisadora, possibilitando a realização desta conquista.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Ricardo Bentes de Azevedo, que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa junto com sua equipe no Laboratório de Nanobiotecnologia do Departamento de Genética e Morfologia da Universidade de Brasília.

Aos meus colegas do Laboratório, pelas experiências compartilhadas.

À Universidade de Brasília e a todos os mestres responsáveis pela minha formação acadêmica.

# SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Polpa Dental	16
3.2 Capeamento Pulpar	17
3.3 Materiais utilizados na Odontologia para capeamento	18
3.3.1 Hidróxido de Cálcio	18
3.3.2 Agregado de trióxido mineral	20
3.3.3 Cimento de óxido de zinco-eugenol	22
3.3.4 Cimento de ionômero de vidro	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Amostra	24
4.2 Cultura de dentes	25
4.3 Coleta das amostras	25
4.4 Preparo cavitário	25
4.5 Capeamento pulpar direto	26
4.6 Preparo das amostras para avaliação histológica	26
4.6.1 Fixação das amostras	26
4.6.2 Descalcificação das amostras	27
4.6.3 Processamento das amostras	27

4.6.2 Corte e coloração das lâminas	27
4.7 Avaliação histológica	28
4.8 Análise estatística	30
4.9 Fotomicrografia	30
5. RESULTADOS	31
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	51
8. PERSPECTIVAS DO ESTUDO	52
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
9. ANEXOS	57
9.1 Parecer de Aprovação pelo Comitê de Ética	57
9.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para responsável	58
9.3 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o paciente	59

## RESUMO

Para o procedimento de capeamento pulpar direto, a Odontologia utiliza materiais sintéticos com o objetivo de manter a vitalidade do tecido pulpar e substituir a estrutura mineralizada perdida por cárie ou trauma. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações ocorridas no tecido pulpar e a formação de estrutura mineralizada formada em resposta a diferentes materiais em dentes cultivados *ex vivo*. Dentes terceiros molares humanos (n=45) em fase de formação radicular, com o objetivo de comparar a resposta do tecido pulpar ao capeamento direto utilizando diferentes materiais odontológicos: agregado trióxido mineral, hidróxido de cálcio, cimento de óxido de zinco-eugenol e cimento de ionômero de vidro. As amostras foram cultivadas após exposição pulpar por 1, 14 e 28 dias e em seguida foram processadas para análise histológica. Tipo de inflamação e sua intensidade, hiperemia, necrose, camada de células odontoblásticas, continuidade e espessura da estrutura mineralizada formada foram analisados. Os grupos não se diferiram estatisticamente quanto aos aspectos da resposta pulpar avaliados, nem em relação a espessura da estrutura mineralizada formada. Porém os grupos tratados com hidróxido de cálcio e cimento de ionômero de vidro apresentaram formação de estrutura mineralizada completa após 14 dias, ao contrário dos outros materiais utilizados.

Palavras-chave: capeamento pulpar direto, MTA, hidróxido de cálcio, cimento de óxido de zinco-eugenol, cimento de ionômero de vidro, materiais odontológicos, cultura *ex vivo*, resposta pulpar



## **ABSTRACT**

Direct pulp capping is the use of a biocompatible material on pulp that has been exposed during removal of caries or by traumatic injuries. This study was based on an *ex vivo* entire tooth culture model of human immature third molars. Direct pulp capping was made in 45 teeth third molars, using calcium hydroxide, mineral trioxide aggregate, zinc oxide eugenol cement and glass-ionomer cement. Then the pulp response and the mineralized tissue were analyzed, after 1, 14 and 28 days of culture, but in the parameters' analyzed there weren't difference between the odontologic materials.

Key-words: direct pulp capping, calcium hydroxide, MTA, zinc oxide eugenol cement, glass-ionomer cement, *ex vivo* culture, pulp response.

## ÍNDICE DE SIGLAS

Ca(OH)<sub>2</sub> – Hidróxido de cálcio

CIV – Cimento de ionômero de vidro

DMEM – Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle médium*

GC – Grupo controle

H&E – Hematoxilina e eosina

MTA – Agregado de trióxido mineral

OZE – Óxido de zinco-eugenol

PBS – Solução tampão *Phosphate-buffered saline*

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Cultura e processamento das amostras	28
Figura 2 – GC após 1 dia de cultura	31
Figura 3 – GC após 14 dias de cultura	32
Figura 4 – GC após 28 dias de cultura	32
Figura 5 – MTA após 1 dia de cultura	34
Figura 6 – MTA após 14 dias de cultura	35
Figura 7 – MTA após 28 dias de cultura	36
Figura 8 – Ca(OH) <sub>2</sub> após 1 dia de cultura	38
Figura 9 – Ca(OH) <sub>2</sub> após 14 dias de cultura	38
Figura 10 – Ca(OH) <sub>2</sub> após 28 dias de cultura	39
Figura 11 – OZE após 1 dia de cultura	41
Figura 12 – OZE após 14 dias de cultura	41
Figura 13 – OZE após 28 dias de cultura	42
Figura 14 – CIV após 1 dia de cultura	44
Figura 15 – CIV após 14 dias de cultura	44
Figura 16 – CIV após 28 dias de cultura	45

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Página
Gráfico 1 – Boxplot da análise estatística do GC	34
Gráfico 2 – Boxplot da análise estatística do MTA	37
Gráfico 3 – Boxplot da análise estatística do $\text{Ca(OH)}_2$	40
Gráfico 4 – Boxplot da análise estatística do OZE	43
Gráfico 5 – Boxplot da análise estatística do CIV	46
Gráfico 6 – Boxplot da análise estatística da estrutura mineralizada entre grupos após 1 dia de cultura	47
Gráfico 7 – Boxplot da análise estatística da estrutura mineralizada entre grupos após 14 dias de cultura	48
Gráfico 8 – Boxplot da análise estatística da estrutura mineralizada entre grupos após 28 dias de cultura	48

## 1. INTRODUÇÃO

Na odontologia restauradora, tecidos dentários perdidos são tipicamente substituídos por materiais sintéticos, como liga de titânio, resina composta e cerâmica zircônia (KIM et al., 2009). Entretanto, avanços no conhecimento e o advento da engenharia de tecidos estão conduzindo a um maior interesse na regeneração biológica das estruturas dentárias perdidas.

Apesar da complexa estrutura, a regeneração do órgão dentário tem sido objetivo de muitos pesquisadores e, em um futuro próximo, pode fornecer uma alternativa viável aos tratamentos clínicos atuais que utilizam materiais sintéticos. Dentina, polpa e ligamento periodontal, que podem ser, isoladamente, menos complicados de regenerar que o órgão dentário como um todo, são importantes metas para a engenharia de tecidos. A regeneração da dentina e da polpa será, provavelmente, potencial ferramenta da terapia endodôntica, embora problemas técnicos precisem ser resolvidos antes que seja implantada clinicamente. (KIM et al., 2009).

Células-tronco, *scaffolds* e fatores de diferenciação são necessários para a regeneração da dentina, bem como para toda engenharia de tecidos. Estes componentes devem ser cuidadosamente selecionados para uma bem sucedida regeneração da dentina, protegendo a polpa de agressores externos. Células da polpa dentária são, freqüentemente, selecionadas devido a sua capacidade de produzir matriz dentinária. Embora células-tronco derivadas de outros locais também sejam utilizadas, as células da polpa dentária podem se diferenciar em odontoblastos e se adaptam melhor para a construção de *scaffolds* complexos. Células de outros locais também necessitam de estímulos externos para se diferenciarem em linhagens odontogênicas. Entretanto, fatores de crescimento específicos ou fatores de diferenciação que ativem as células-tronco mesenquimais a se diferenciarem em odontoblastos não foram identificados (KIM et al., 2009; Nakashima e Akamine, 2005).

O processo de reparo após exposição pulpar é influenciado pelos diferentes materiais clássicos utilizados pela odontologia restauradora, que são biocompatíveis, mas que não são ideais. A engenharia de tecidos caminha para a utilização de diferentes fatores de diferenciação que estimulam células-tronco pulpares a se diferenciarem em odontoblastos e produzirem dentina, acelerando o processo de

reparo. Porém, após a aplicação destes mediadores, numa situação clínica, é necessária a utilização de um material sintético para restauração temporária ou definitiva. Nesta situação, o processo de reparo consiste no restabelecimento do tecido pulpar e formação de estrutura mineralizada formando uma barreira entre a polpa e o material odontológico utilizado.

Inúmeros estudos realizados em diferentes animais apresentam diversas metodologias e os resultados nem sempre correspondem ao modelo humano. Um novo modelo de estudo utilizando dentes humanos permitiu um melhor conhecimento sobre o que ocorre durante o processo de reparo após uma exposição pulpar, representando em cultura o que ocorre *in vivo* (TÉCLES et al., 2005, 2008).

A finalidade deste estudo foi avaliar a resposta pulpar ao capeamento direto obtida após restauração com materiais sintéticos utilizados pela odontologia restauradora atual, permitindo em estudos futuros uma comparação com novos materiais sintéticos ou biológicos para este tipo de tratamento.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral:**

Utilizar o novo modelo de estudo proposto por TÉCLES et al. (2005) para avaliar o processo de reparo comparando quatro materiais odontológicos para o capeamento pulpar direto, objetivando a escolha de uma melhor opção para auxiliar a engenharia de tecidos.

### **2.2. Objetivos Específicos:**

- Analisar histologicamente a resposta pulpar ao capeamento direto utilizando os seguintes materiais: agregado de trióxido mineral (MTA), hidróxido de cálcio, cimento de óxido de zinco-eugenol e cimento de ionômero de vidro, após cultura *ex vivo* de 1 dia, 14 dias e 28 dias.
- Quantificar e comparar a espessura de tecido mineral formado após a utilização dos diferentes materiais nos diferentes períodos de cultura.
- Avaliar qual ou quais materiais seriam mais indicados como auxiliar da engenharia de tecidos.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1 Polpa dental**

A polpa desempenha um papel importante na formação e nutrição da dentina bem como na inervação e defesa do dente. A função primordial da polpa é a formação de dentina, que começa no momento em que as células mesenquimais periféricas se diferenciam em odontoblastos e iniciam a deposição de matriz de colágeno em uma seqüência de deposição/mineralização que é reduzida com a completa formação do dente. Após a formação inicial a polpa continua fisiologicamente a produzir dentina devido ao envelhecimento do dente. Dentina reparadora pode também ser produzida em resposta a danos físicos ou químicos (MODENA et al., 2009).

O transporte de fluidos e nutrientes mantém a vitalidade pulpar e a resiliência necessária para neutralizar forças mastigatórias na dentina. Finalmente, a polpa é responsável por diferentes estímulos, como formas de defesa que incluem a dilatação e permeabilidade dos vasos sanguíneos, e a presença de células inflamatórias. Quando o estímulo não excede a capacidade de resposta pulpar, ocorre o reparo modificando o complexo dentina-polpa.

A proteção do complexo dentina-polpa consiste na aplicação de uma ou mais camadas de um material específico entre o material restaurador e o tecido dentário. A proteção deste complexo também tem a função de preservar a vitalidade pulpar (MODENA et al, 2009).

O sistema imunológico sinaliza reações inflamatórias para limitar o dano tecidual. Estas reações podem comprometer populações celulares da polpa e levar a complicações em resposta a cavidades restauradas que podem inicialmente aparentar sucesso. Formas severas de atividade inflamatória podem desenvolver necrose em toda a polpa e lesão periapical com perda óssea local. Em casos menos severos, a polpa inflamada está associada com hipersensibilidade, tanto ao calor, quanto à força mecânica ou estímulo osmótico encontrado em condições normais (ABOUT et al., 2001; BERGENHOLTZ, 1982; NGASSAPA, 1996; MURRAY et al., 2002).



A resposta para o capeamento pulpar com materiais odontológicos é a formação de estrutura mineralizada, resultante do recrutamento e proliferação de células indiferenciadas, que podem ser células-tronco mesenquimais ou células maduras dediferenciadas ou transdiferenciadas (MAHMOUD et al., 2010). Células-tronco são definidas como células indiferenciadas capazes tanto de auto-renovarem quanto se diferenciarem em múltiplas linhagens. Estudos recentes têm isolado células-tronco da polpa de terceiros molares humanos (*dental pulp stem cells - DPSC*), e da polpa de dentes decíduos esfoliados naturalmente (*stem cells from human exfoliated deciduous teeth - SHED*) (GRONTHOS et al, 2000, 2002; MIURA et al., 2003).

Uma vez diferenciadas, as células sintetizam uma matriz que será mineralizada. Os componentes da matriz extracelular podem induzir a formação de dentina reacional ou a formação de estrutura mineralizada. O potencial de cicatrização após exposição pulpar depende de vários fatores como a prevenção pré-operatória e operatória de infecção bacteriana, o tamanho da exposição, a eficácia da estratégia de tratamento, e a condição pulpar (MAHMOUD et al, 2010).

### **3.2 Capeamento pulpar**

Capeamento pulpar direto é o uso de um material biocompatível na polpa que foi exposta durante a remoção de cárie ou por trauma. Seu objetivo é selar a polpa contra a infiltração bacteriana e promover o desenvolvimento de uma ponte ou barreira mineralizada para obstruir a área exposta e proteger o tecido pulpar subjacente. A exposição pulpar causada por cárie mostra um potencial de restabelecimento da polpa muito limitado como resultado da infecção bacteriana por um considerável período de tempo, comprometendo a reação de defesa (HASHEMINIA et al., 2010).

Os fatores que contribuem para as chances de sucesso do capeamento pulpar consideram a idade do paciente, estágio da formação radicular, saúde do paciente, ausência de sintomas pré-existentes, boa resposta pulpar a estímulos, tamanho da exposição pulpar e intensidade de hemorragia pulpar (CHRISTENSEN, 1998; GÓRECKA et al., 2000; HAFEZ et al., 2000; MURRAY et al., 2002).

O sucesso do capeamento pulpar é dependente da preservação da vitalidade da polpa e da formação de barreira mineralizada (MIN et al, 2008). Isto acontece em 37% dos casos após cinco anos e 13% após dez anos, enquanto que o sucesso de restaurações em cavidades sem exposição pulpar é geralmente muito maior e com vários tipos de materiais e condições (MURRAY et al., 2002). O insucesso do tratamento pode resultar em reabsorção interna ou abscesso dentoalveolar agudo (FUKE, 2008).

Vários fatores influenciam o resultado do capeamento, entre eles o adequado controle da hemorragia, que é crítico para o sucesso de qualquer tratamento que envolva capeamento. O coágulo não permite o contato direto da polpa com o material utilizado e pode agir como um substrato para microorganismos, levando à infecção pulpar (TUNCA et al., 2007).

Alguns materiais têm sido sugeridos para uso no capeamento pulpar direto. Entre eles estão óxido de zinco e eugenol, ionômero de vidro, hidróxido de cálcio e MTA (HILTON, 2009).

Muitos estudos sobre capeamento pulpar têm sido desenvolvidos em animais de espécies menores, como camundongos, cães e primatas. Entretanto os resultados do capeamento pulpar em animais frequentemente não refletem o que ocorrerá em humanos. É necessário ter muita cautela quando se trata de resultados de capeamento pulpar em animais e aplicá-los a pacientes humanos (HILTON, 2009). Baseando-se nisso, estudos desenvolveram um modelo de estudo capaz de reproduzir a situação clínica de exposição pulpar em pacientes humanos, no qual o órgão dentário é cultivado. Ao cultivar dentes permanentes, foi observado que células-tronco/progenitoras se proliferaram e migraram para o local do dano, o que poderia ser considerado o passo inicial para o reparo (TÉCLES et al., 2005; 2007).

### **3.3 Materiais utilizados na Odontologia para o capeamento**

#### **3.3.1 Hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>]**

A capacidade seladora e a toxicidade do material são fatores importantes no prognóstico da resposta ao tratamento da polpa vital. Historicamente, o capeamento pulpar foi iniciado em 1765 por Philip Pfaf, usando lâmina de ouro. Em 1923, Davis

sugeriu o uso de um complexo de sulfato de zinco e sulfato de cálcio com óxido de zinco para o capeamento pulpar direto. O hidróxido de cálcio  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$  foi usado para capeamento pulpar pela primeira vez por Hermann (1930), e desde o início da década de 1940 até os dias atuais é o material mais utilizado. Numerosos estudos têm mostrado a formação de estrutura mineralizada bloqueando a superfície exposta (MODENA et al., 2009).

O hidróxido de cálcio em pó, suspensão ou em forma de cimento têm sido recomendado para o tratamento de exposição pulpar por suas propriedades benéficas, tais como indução de mineralização e inibição de crescimento bacteriano. Muitos estudos indicam reparo pulpar e formação de barreira de tecido duro em casos de capeamento pulpar direto. Entretanto, a formação da barreira de tecido duro tem sido questionada por outros estudos que têm mostrado a presença de túneis na barreira que podem levar a infiltração e penetração bacteriana no tecido pulpar (MURRAY et al., 2002). Estes túneis não são causados pelo hidróxido de cálcio sozinho, mas são também uma consequência da severidade do trauma à polpa e do número de vasos comprometidos pela exposição pulpar. A parte interna dos túneis são vasos sanguíneos que mantiveram o cálcio fornecido para o tecido necrótico. Os íons cálcio na camada necrótica são responsáveis pela calcificação distrófica da necrose de coagulação. Outro tipo de defeito no tecido duro, quando presente, é representado por inclusões celulares, geralmente situadas entre a necrose de coagulação e a área calcificada. A presença de barreira de tecido duro não deve ser reconhecida apenas como uma barreira estrutural contra futuras agressões, mas também como um sinal de recuperação biológica, representada pela atividade dos odontoblastos (MODENA et al., 2009; PEREIRA et al., 2000).

Altas taxas (mais que 80% dos dentes tratados) de sobrevivência do tecido pulpar após capeamento com hidróxido de cálcio têm sido relatadas (FERNANDES et al., 2008). O hidróxido de cálcio tem excelentes propriedades antibacterianas. Um estudo encontrou 100% de redução de microorganismos associados a infecções pulpares após uma hora em contato com o hidróxido de cálcio. Tradicionalmente, acreditava-se que o alto pH do hidróxido de cálcio causava irritação do tecido pulpar, que estimulava o processo de reparo por um mecanismo desconhecido. Nos últimos anos, este mecanismo desconhecido tem sido explicado pela liberação de moléculas bioativas. Sabe-se que uma variedade de proteínas são incorporadas na matriz dentinária durante a dentinogênese. Duas proteínas tem demonstrado ser capazes

de estimular o processo de reparo: a proteína morfogenética óssea (BMP) e fator de crescimento tumoral 1 (TGF- $\beta$ 1). Entretanto, o hidróxido de cálcio promove a solubilização destas proteínas presentes na dentina, desempenhando um papel mediador no processo de reparo (HILTON, 2009; IOHARA et al., 2004; NAKASHIMA, 2005).

Além disso, foi observado que quando  $\text{Ca(OH)}_2$  puro é utilizado na polpa, não apenas age como barreira biológica mas também promove alguma destruição no tecido pulpar. Outros estudos também têm mostrado que o hidróxido de cálcio tem um alto efeito citotóxico nas células em cultura de tecidos. Inapropriado selamento da exposição pulpar é uma das maiores desvantagens. Estes fatores prejudiciais têm causado incentivos para encontrar um material que promova a formação de barreira dentinária reparadora com menores efeitos indesejáveis (HASHEMINIA et al., 2010).

### **3.3.2 Agregado de trióxido mineral (MTA)**

Apesar do hidróxido de cálcio ser considerado padrão ouro para a terapia pulpar vital, limitações físicas tais como não adesão à dentina, dissolução em tecidos fluidos ou outros materiais dentários, e alteração da flexibilidade do dente, tem levado pesquisadores a procurar novas alternativas (FERNANDES et al., 2008).

Recentes tentativas para desenvolver diferentes materiais para capeamento pulpar têm resultado no desenvolvimento do agregado de trióxido mineral (MTA), que foi proposto para capeamento pulpar inicialmente em 1996 (MAHMOUD et al., 2010). Em 1995 o agregado de trióxido mineral foi introduzido por Torabinejad e Parirokh (2010) para selamento total de todo o caminho entre o sistema de canal radicular e a superfície externa do dente. Este material tornou-se conhecido como um material apropriado para capeamento pulpar por causa de vários efeitos positivos tais como alto efeito de selamento e alto pH, biocompatibilidade, estabilidade por longo período, prevenção de infiltração bacteriana, e estimulação de formação de cemento, osso e dentina (HASHEMINIA et al., 2010).

O MTA tem uma excelente habilidade seladora quando utilizado como material de selamento em perfurações acidentais ou como material de preenchimento apical. Além disso, quando o MTA foi usado para capeamento pulpar

direto, mostrou melhor interação com o tecido pulpar do que o hidróxido de cálcio e adesão à dentina. O MTA tem mostrado induzir menos inflamação pulpar e maior formação de estrutura mineralizada quando comparado com o cimento de hidróxido de cálcio (MAHMOUD et al., 2010). Karabucak et al. (2005) utilizaram MTA como material capeador após pulpotomia parcial para preservar a vitalidade dos tecidos pulpares em dois casos. Exames periódicos revelaram que o tratamento obteve sucesso na preservação da vitalidade da polpa e continuação do desenvolvimento dentário. Takita et al. (2006) investigaram os efeitos do MTA na proliferação de células pulpares humanas em cultura. Eles observaram que os componentes precipitados como íons cálcio do MTA têm uma maior capacidade proliferativa de células da polpa dental humana que o Dycal.

O MTA é composto de silicato de tricálcio, óxido de bismuto, silicato de dicálcio, aluminato de tricálcio e sulfato de cálcio hidratado. O MTA poderá conter também até 0,6% de resíduo insolúvel, incluindo sílica cristalina livre. Outros possíveis constituintes incluem óxido de cálcio, óxido de magnésio livre, potássio, e compostos de sulfato de sódio. A hidratação do pó resulta na formação de um gel finamente cristalino dos grupos hidratados dos componentes, com algum  $\text{Ca(OH)}_2$  também sendo formado (WITHERSPOON, 2008).

O MTA tem mostrado ter efeitos antibacterianos em algumas bactérias facultativas e nenhum efeito ou efeito restrito em bactérias anaeróbias. Este limitado efeito antibacteriano é menor que o demonstrado pelas pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$ . A capacidade do MTA de resistir a futuras penetrações de microorganismos aparenta ser alta. Em estudos in vitro, o MTA tem resistido à infiltração como esperado e repetidamente (WITHERSPOON, 2008).

Este material tem demonstrado capacidade de induzir formação de tecido duro pela polpa quando utilizado no capeamento direto e na pulpotomia. O MTA promove rápido crescimento celular in vitro. Comparado com  $\text{Ca(OH)}_2$ , em estudos animais, o MTA induz de forma consistente a formação de dentina em maior índice com uma integridade estrutural superior. Ele desenvolve mais pontes dentinárias completas e demonstra uma melhor capacidade em manter a integridade do tecido pulpar. Análise histológica em estudos com animais e humanos tem mostrado que o MTA estimula a formação de dentina reparadora, com espessa ponte dentinária, mínima inflamação, e simbólica hiperemia. O MTA parece induzir a formação de uma barreira dentinária mais rápido que o  $\text{Ca(OH)}_2$ . A ação do MTA para induzir a

formação de estrutura mineralizada não é conhecida, porém tem-se desenvolvido a teoria de que o óxido de tricálcio no MTA reage com fluidos tissulares formando  $\text{Ca(OH)}_2$ , resultando na formação de tecido duro de maneira similar ao  $\text{Ca(OH)}_2$ . (WITHERSPOON, 2008).

Há algumas diferenças entre o MTA e o hidróxido de cálcio. A primeira é que o MTA é comercializado em duas cores, branco e cinza. A versão cinza é devido a adição de metal. Outra diferença significativa é que o MTA promove algum selamento da estrutura dentária. O MTA também apresenta algumas desvantagens. Entre elas, é altamente solúvel apresentando perda de 24% após 78 dias quando armazenado em água. A presença de metal na versão cinza pode escurecer o dente. Outra desvantagem significativa é o tempo prolongado de presa do material, de aproximadamente 2 horas e 45 minutos. Isto requer que o capeamento pulpar feito com MTA seja feito em duas sessões, colocando um material temporário após a primeira sessão (HILTON, 2009).

### **3.3.3 Cimento de óxido de zinco-eugenol**

Formulações de óxido de zinco-eugenol têm sido usadas na odontologia por muitos anos como bases, cimentos e materiais restauradores temporários. No entanto, seu uso para capeamento pulpar direto é questionável. O eugenol é altamente citotóxico e é conhecido que o óxido de zinco-eugenol libera eugenol em concentrações que são citotóxicas. O óxido de zinco-eugenol também mostra uma alta desadaptação da interface (HILTON, 2009).

Presença de resposta inflamatória persistente, necrose pulpar, abscesso e ausência de formação de barreira dentinária têm sido observadas após capeamento pulpar direto com cimento de óxido de zinco-eugenol (Silva et al., 2009).

### **3.3.4 Cimento de ionômero de vidro**

Não tão citotóxico como o óxido de zinco-eugenol, o ionômero de vidro também é citotóxico quando em contato direto com células. As formulações convencionais tendem a ser menos tóxicas que as resinosas. Devido à habilidade do

ionômero de vidro em aderir quimicamente à estrutura dentária, isto pode prevenir a difusão de materiais potencialmente tóxicos através da dentina para a polpa. O ionômero de vidro também promove um excelente selamento bacteriano e mostra boa biocompatibilidade quando utilizado muito próximo mas não em contato direto com a polpa (HILTON, 2009).

Duas das vantagens deste material são a adesão à dentina e esmalte e a contínua liberação de flúor que aparenta ser suficiente para inibir a formação de placa bacteriana. A adesão pela troca de íons desenvolve uma união com a estrutura dentária que previne microinfiltrações, e a liberação contínua de flúor aparenta auxiliar na remineralização da dentina afetada por lesão de cárie (Gryst and Mount, 1999).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostra

O estudo foi realizado *in vitro* seguindo um modelo de cultura do órgão dentário com o objetivo de comparar o processo de reparo ocorrido no tecido pulpar após capeamento pulpar direto utilizando diferentes materiais odontológicos.

A amostra foi obtida após aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, conforme processo de nº077/2009 (Anexo 1). Foi constituída de 45 dentes terceiros molares hígidos e com ápice radicular ainda aberto, inclusos ou impactados, extraídos por motivos ortodônticos após obtenção do consentimento livre e esclarecido (Anexo 2 e 3) assinado pelo paciente ou responsável. Todos os doadores eram saudáveis, sendo 21 do gênero feminino e 24 do gênero masculino com idades entre 13- 21 anos (Tabela 1).

A amostra foi dividida de forma aleatória em cinco grupos:

- Grupo Controle (GC): dentes terceiros molares, nos quais não foram feitos capeamento pulpar direto com materiais odontológicos, as cavidades foram preenchidas apenas com o meio de cultura utilizado.

- Grupo tratado com MTA (MTA): dentes terceiros molares, nos quais foram feitos capeamento pulpar direto com MTA (lote 11390, Angelus, Brasil) seguindo orientações do fabricante.

-Grupo tratado com  $\text{Ca(OH)}_2$  [ $\text{Ca(OH)}_2$ ]: dentes terceiros molares, nos quais foram feitos capeamento pulpar direto com  $\text{Ca(OH)}_2$  P.A. (lote 582/09, Biodinâmica, Brasil).

-Grupo tratado com cimento de óxido de zinco-eugenol (OZE): dentes terceiros molares, nos quais foram feitos capeamento pulpar direto utilizando IRM (lote 430712, Dentsply, Brasil), seguindo as orientações do fabricante.

-Grupo tratado com cimento de ionômero de vidro (CIV): dentes terceiros molares, nos quais foram feitos capeamento pulpar direto utilizando cimento de ionômero de vidro 1 (lote 0909111, GC Corporation, Japão), seguindo as orientações do fabricante.

Cada um dos grupos citados foi composto por 9 amostras, sendo 3 amostras para cada período de análise: 1, 14 e 28 dias de cultura.



Grupo	Idade		Gêneros (frequência relativa%)	
	Média	Desvio padrão	Feminino	Masculino
GC	16,22	2,54	44,4	55,6
MTA	17,77	2,49	44,4	55,6
Ca(OH) <sub>2</sub>	17,77	2,73	44,4	55,6
OZE	16,55	1,51	44,4	55,6
CIV	18,22	1,72	55,6	44,4

**Tabela 1-** Características da população amostral incluída no estudo.

## 4.2 Cultura de dentes

Os dentes foram cultivados seguindo o novo modelo proposto por TÉCLES et al. (2005, 2007).

As amostras permaneceram incubadas com meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle medium* – DMEM (GIBCO, Invitrogen, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO, Invitrogen, USA) e 1% de antibiótico e antimicótico – 10000 unidades de penicilina G sódica, 10 mg de sulfato de estreptomicina, 20 µg de anfotericina B dissolvidos em 1 mL de solução salina a 0,85% (GIBCO, Invitrogen, USA), por 1, 14 e 28 dias a 37°C, 5%CO<sub>2</sub> e 70% de umidade. O meio de cultura foi trocado diariamente.

## 4.3 Coleta de amostras

Imediatamente após a exodontia, os dentes foram colocados em tubos falcon contendo 15 mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 3% de antibiótico e antimicótico.

## 4.4 Preparo cavitário

Uma única caixa oclusal foi preparada em cada dente com broca tronco-cônica diamantada nº 2131 (KGSorensen, São Paulo, Brasil), montada em uma caneta de alta-rotação irrigada com solução salina estéril e em seguida foi feita uma

exposição pulpar com uma broca diamantada esférica nº 1014 (KGSorensen, Brasil). As brocas foram trocadas a cada quatro preparos mantendo uma boa eficiência no corte.

Em seguida, as amostras foram imediatamente transportadas para o Laboratório de Biologia Molecular nos mesmos tubos falcon contendo o meio de cultura.

#### **4.5 Capeamento pulpar direto**

Dentro do fluxo laminar estéril, os dentes foram limpos com instrumentos estéreis, removendo o ligamento periodontal e restos da membrana epitelial pericoronária. Em seguida, a coroa do dente e o local da exposição pulpar foram secos com gaze estéril e o material selecionado para capeamento foi então introduzido na cavidade oclusal.

As coroas foram presas em fios ortodônticos metálicos previamente cortados, dobrados e esterilizados com a aplicação do selante Fluroshield (Dentsply, Brasil), e suspensas com apoio nos poços adjacentes ficando os ápices radiculares imersos no meio de cultura sem tocar no fundo da placa (Fig. 1a).

O local do capeamento não teve contato com o meio de cultura do poço.

#### **4.6 Preparo das amostras para avaliação histológica**

##### **4.6.1 Fixação das amostras**

Após o fim do período de cultura os fios ortodônticos foram removidos e as amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% em solução salina tamponada com sais de fosfato (phosphate-buffered saline – PBS) por 3 dias em temperatura ambiente (Fig. 1b).

#### **4.6.2 Descalcificação das amostras**

As amostras foram descalcificadas em solução contendo 12% de ácido fórmico, 8% de ácido clorídrico e água destilada por 4 dias a 37°C, a solução foi trocada uma vez durante este intervalo de tempo (Fig. 1c, d).

Depois, foram lavadas com água corrente por 15 minutos, neutralizadas em solução de sulfato de sódio a 4% em água destilada durante 15 minutos e lavadas novamente em água corrente por 10 minutos.

#### **4.6.3 Processamento das amostras**

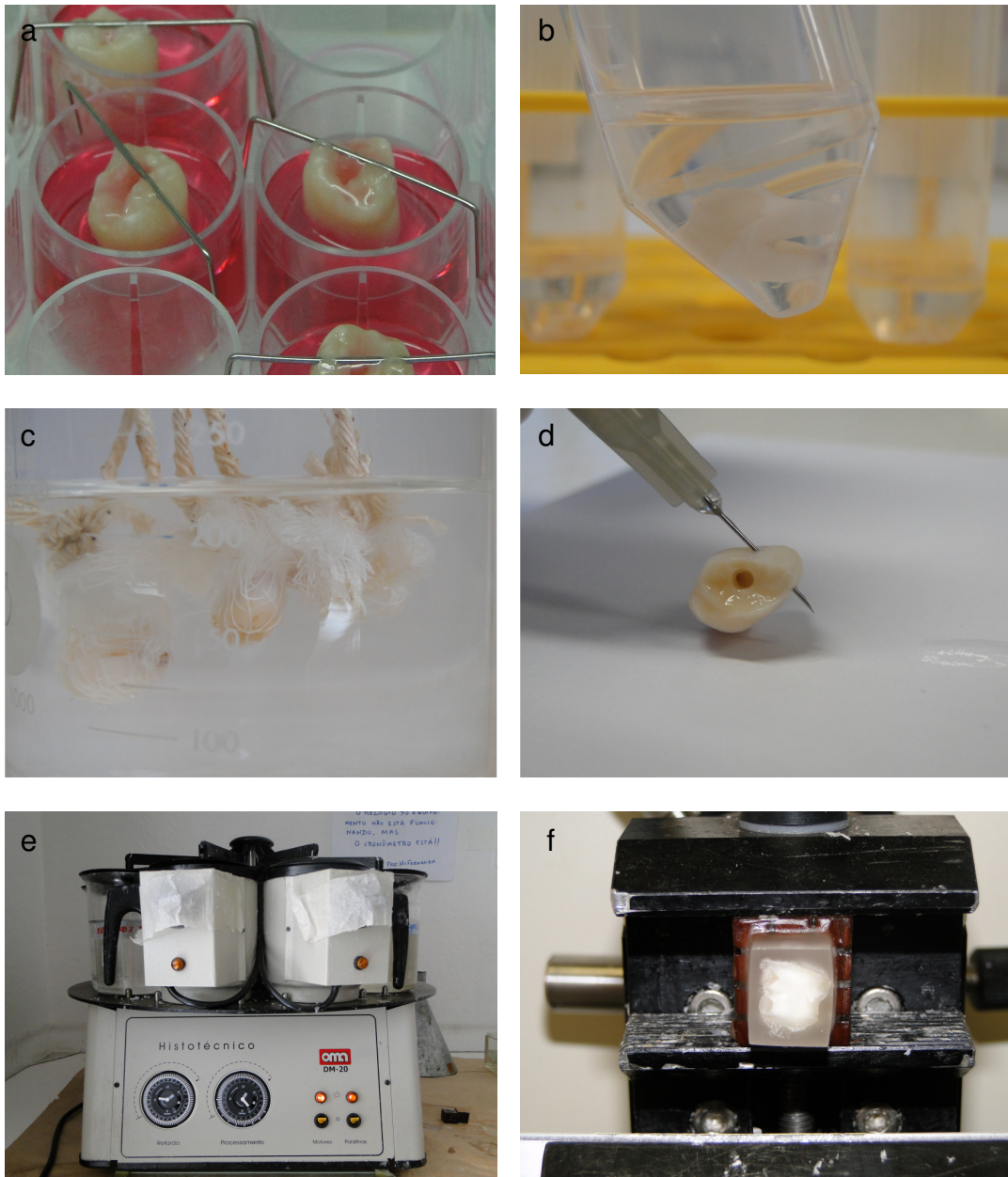
As amostras foram desidratadas, clarificadas e parafinizadas em soluções de alcoóis 80%, 90%, 100%, 100%, álcool-xilol 1/1, xilol 100%, xilol 100%, xilol%, parafina, parafina. Este processamento foi feito utilizando o aparelho histotécnico DM-20 (OMA, Brasil), sendo 45 minutos em cada banho. (Fig. 1e). Então, as amostras foram montadas em blocos de parafina.

#### **4.6.4 Cortes e coloração das lâminas**

As amostras foram processadas rotineiramente em cortes longitudinais com 5 µm de espessura utilizando o micrótomo Leica RM 2125 RT (Leica, Alemanha) (Fig. 1f).

Três cortes de cada amostra na região onde houve exposição pulpar foram colocados em lâminas e corados com Hematoxilina & Eosina.

Os cortes foram analisados utilizando o microscópio Axiophot (Zeiss, Alemanha) e programa Moticlimages Plus 2.0, onde foi feita a mensuração da estrutura mineralizada formada.



**Figura 1** – Cultura e processamento das amostras. Amostras em cultura (a). Fixação do órgão dentário por 3 dias (b). Amostras suspensas em solução ácida para descalcificação uniforme (c), e após descalcificação (d). Equipamento utilizado para processamento histotécnico (e). Amostra em bloco de parafina sendo cortada a  $5\mu\text{m}$  (f).

#### 4.7 Avaliação histológica

A avaliação histológica foi feita avaliando três aspectos diferentes no local da exposição pulpar, utilizando um aumento de  $\times 400$ : a reação inflamatória celular, incluindo tipo e intensidade da reação; as alterações no tecido pulpar, incluindo

hiperemia, necrose e camada de células odontoblásticas, e formação de estrutura mineralizada, incluindo continuidade e espessura. Estes aspectos foram analisados pelo patologista, de forma cega.

A avaliação foi feita segundo adaptações das escalas definidas por Hasheminia et al. (2010):

#### Inflamação

##### Tipo:

- (0) sem inflamação
- (1) inflamação aguda
- (2) inflamação crônica
- (3) mistura de inflamação aguda e crônica

##### Intensidade:

- (1) leve: 0-30 células inflamatórias
- (2) moderada: 30-60 células inflamatórias
- (3) avançada: mais que 60 células inflamatórias

#### Alterações no tecido pulpar

##### Hiperemia:

- (1) leve: 1-3 vasos sanguíneos
- (2) moderada: 3-5 vasos sanguíneos
- (3) severa: mais que 5 vasos sanguíneos

##### (b) Necrose:

- (0) sem necrose
- (1) sinais de necrose

##### (c) Camada de células odontoblásticas:

- (0) ausência de camada de células odontoblásticas
- (1) presença de camada de células odontoblásticas

#### Estrutura mineralizada

##### Continuidade:

- (1) completa
- (2) presente parcialmente
- (3) ausente

Espessura:

Três diferentes regiões onde houve formação de estrutura mineralizada, em cada amostra, foram medidas em  $\mu\text{m}$  e então foi obtido um valor médio.

#### **4.8 Análise estatística**

Para se comparar os diferentes grupos em cada período de cultura foi feita análise estatística. O teste Kruskal-Wallis foi usado para comparar inflamação, hiperemia, necrose, camada odontoblástica e barreira dentinária. Para se comparar a espessura da estrutura mineral formada em um grupo nos diferentes tempos e em um único tempo os diferentes grupos, foram utilizados os testes ANOVA, o post hoc da ANOVA, o teste de Bonferroni, e o teste Kruskal-Wallis.

Para testar qualquer das hipóteses, o nível de significância considerado foi o valor de  $p < 0,05$ . A análise estatística foi feita utilizando o programa SPSS versão 17.0.

#### **4.9 Fotomicrografia**

As fotos foram feitas em microscopia de luz, com o microscópio Axiophot (Zeiss, Alemanha) e programa Axiovision Releases 4.7.1.

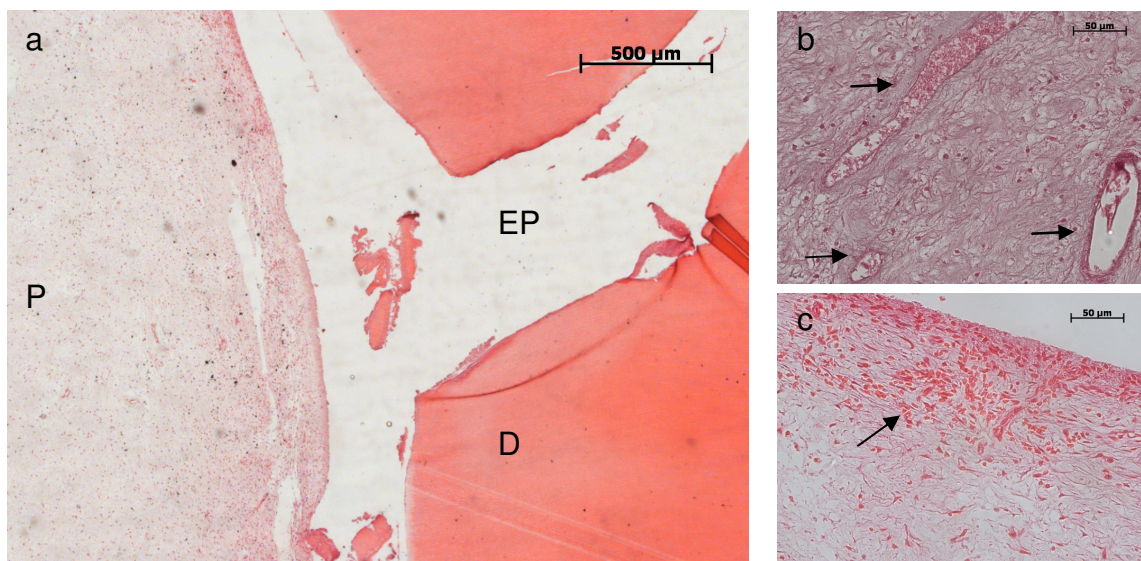
## 5. RESULTADOS

O modelo de cultura mostrou-se eficiente sendo capaz de reproduzir o modelo vivo. O tecido pulpar permaneceu preservado e as células se mantiveram viáveis para o processo de reparo, o qual pôde ser observado em todas as amostras.

### Análise das amostras por grupo

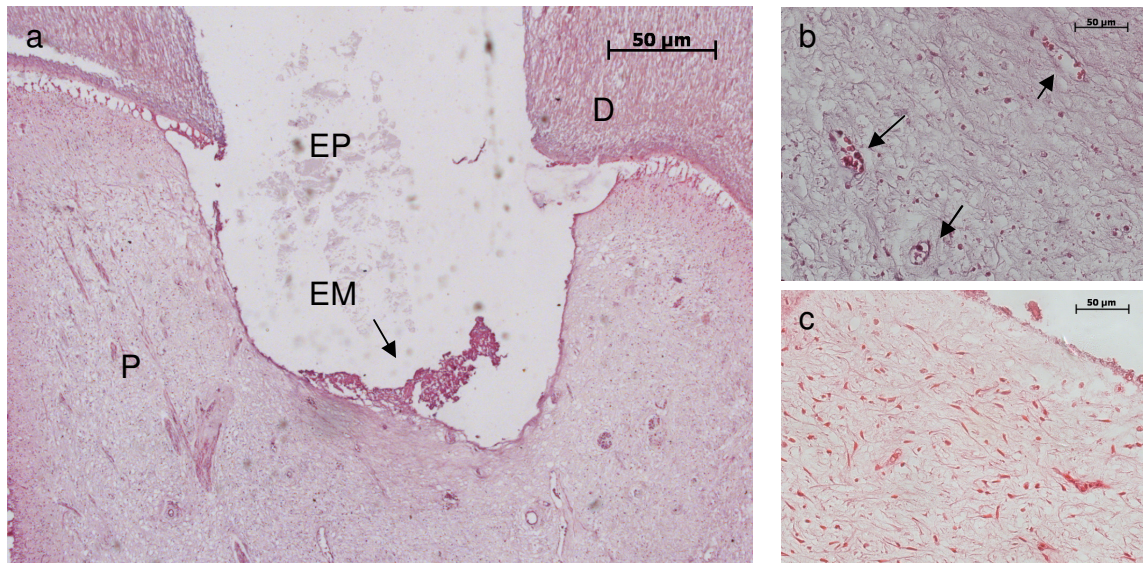
#### Grupo controle (GC)

Após 1 dia de cultura - O grupo controle apresentou infiltrado inflamatório crônico com intensidade moderada, hiperemia moderada, sem sinais de necrose no tecido pulpar e ausência da camada odontoblástica (Figura 2).



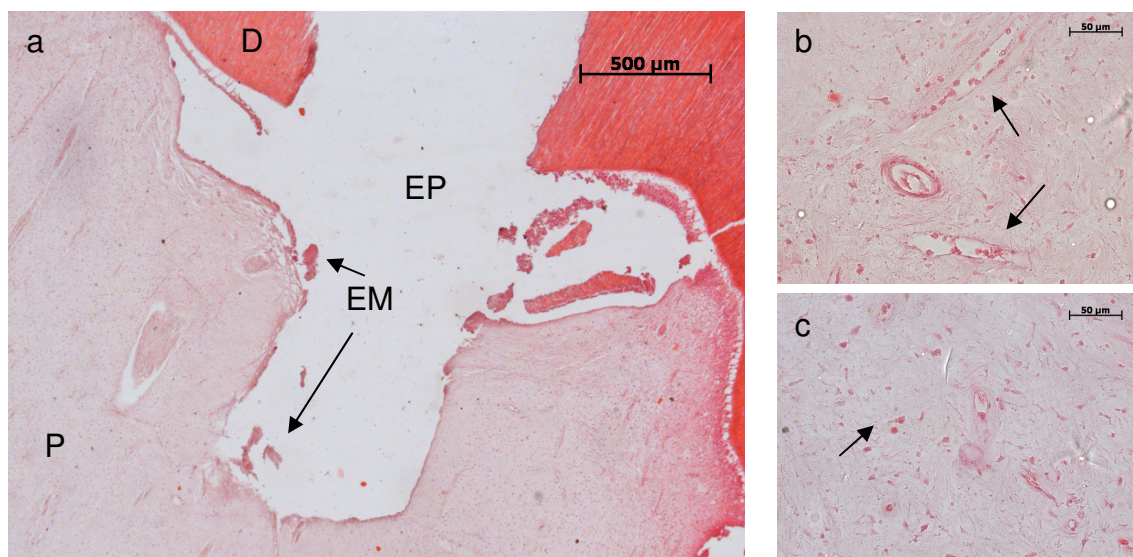
**Figura 2** – GC após 1 dia de cultura. Área de exposição pulpar (EP), tecido pulpar (P) e dentina (D) x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas) e infiltrado inflamatório (seta), x400 (b, c).

Após 14 dias de cultura - as amostras apresentavam infiltrado inflamatório crônico com intensidade moderada. Hiperemia moderada, ausência da camada odontoblástica e ausência de necrose também foram observadas. Estrutura mineralizada parcial foi formada em todas as amostras (Figura 3).



**Figura 3** – GC após 14 dias de cultura. Área de exposição pulpar (EP), estrutura mineralizada (EM), tecido pulpar (P) e dentina (D) x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas) e infiltrado inflamatório, x400 (b, c).

Após 28 dias de cultura - Foi observado infiltrado inflamatório misto, com intensidade intermediária em todas as amostras. Presença de hiperemia leve, sem sinais de necrose e ausência da camada odontoblástica. Formação de estruturamineralizada em algumas regiões do local da exposição (Figura 4).



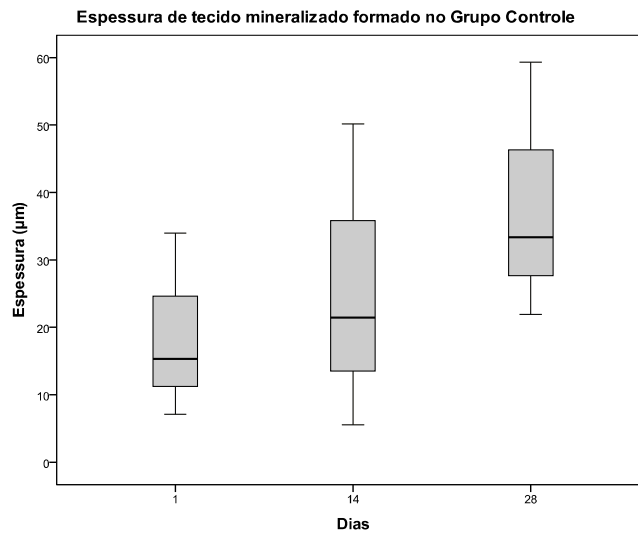
**Figura 4** – GC após 28 dias de cultura. Área de exposição pulpar (EP), estrutura mineralizada formada (EM), tecido pulpar (P) e dentina (D), x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas) e infiltrado inflamatório, x400 (b, c).



Tratamento	GC	Avaliação histológica				
		Escalas	1 dia	14 dias	28 dias	Frequência relativa (%)
Polpa dental	Inflamação	Tipo	2	100	100	33,3
			3	-	-	66,6
		Intensidade	1	-	33,3	33,3
			2	100	33,3	66,6
			3	-	33,3	-
		Hiperemia	1	33,3	33,3	66,6
	2		-	33,3	33,3	
	3		66,6	33,3	-	
	Necrose	0	100	100	100	
		1	-	-	-	
	Camada odontoblástica	0	100	33,3	100	
		1	-	66,6	-	
	Estrutura mineralizada	Continuidade	1	33,3	-	-
			2	66,6	66,6	66,6
			3	-	33,3	33,3
			Média ( $\mu$ m)			
Espessura			18,79	25,72	38,19	

**Tabela 2** – Resultados da análise histológica no local de exposição pulpar do grupo controle.

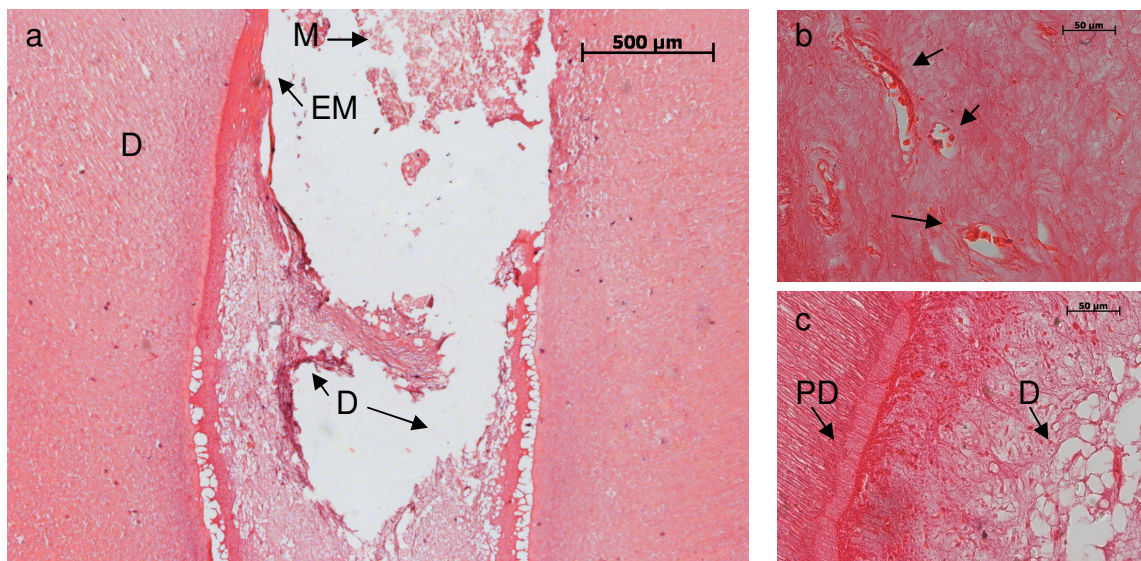
A espessura da estrutura mineralizada formada no GC nos diferentes tempos de cultura utilizando o teste ANOVA não apresentou diferença estatística significativa nos diferentes tempos de cultura, sendo  $p=0,486$  (Gráfico 1).



**Gráfico 1** – Boxplot da análise estatística do GC. Comparação da espessura da estrutura mineralizada formada após os diferentes períodos de cultura no grupo controle.

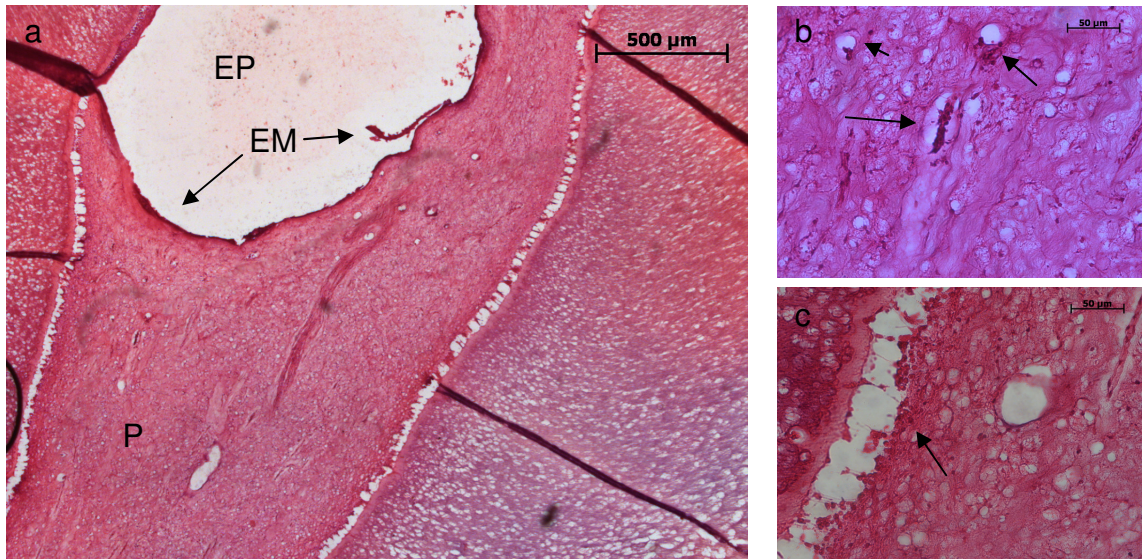
### Grupo tratado com MTA (MTA)

Após 1 dia de cultura - O grupo tratado com MTA apresentou inflamação crônica predominante, com intensidade moderada. Hiperemia severa, ausência de camada odontoblástica e presença de necrose também foram observadas. Houve formação de estrutura mineralizada. Presença de dissociação fibrilar compatível com edema também foi observada (Figura 5).



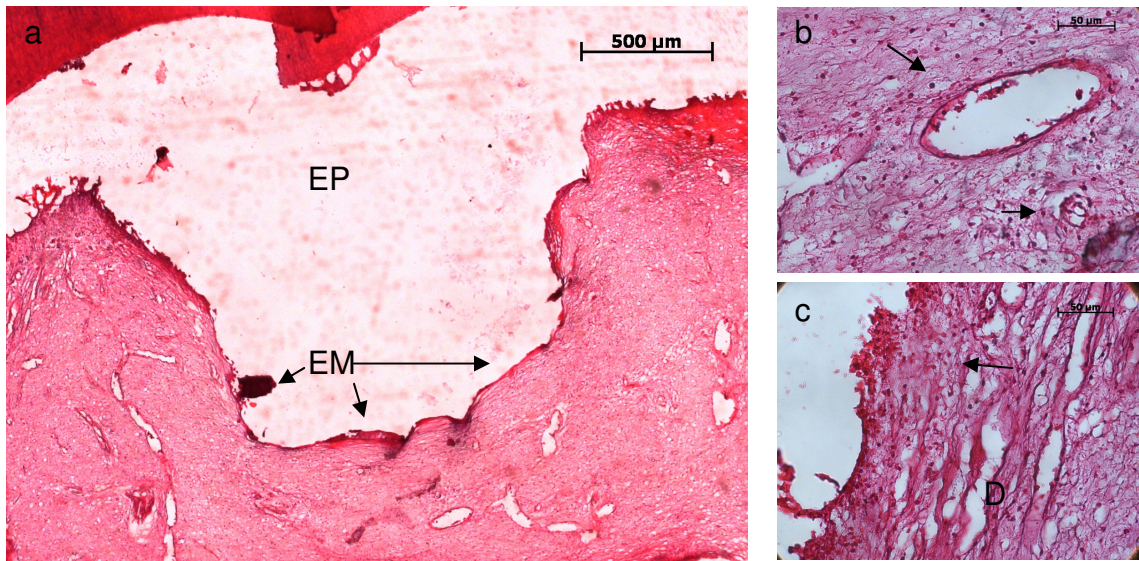
**Figura 5** – MTA após 1 dia de cultura. Área de exposição pulpar (EP), material utilizado (M), dissociação de fibras (D) e estrutura mineralizada formada (EM) x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas) e infiltrado inflamatório, edema e dissociação de fibras (D) e pré-dentina (PD) x400 (b, c).

Após 14 dias de cultura – Foi observado infiltrado inflamatório crônico com intensidade moderada, hiperemia severa, ausência da camada odontoblástica e nenhum sinal de necrose. Formação de estrutura mineralizada parcial também foi vista (Figura 6).



**Figura 6** – MTA após 14 dias de cultura. Área de exposição pulpar (EP), tecido pulpar (P) e estrutura mineralizada formada (EM), x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas) e infiltrado inflamatório e edema (seta) x400 (b, c).

Após 28 dias de cultura – Infiltrado inflamatório crônico com intensidade moderada e hiperemia moderada foram observados nestas amostras. Ausência da camada odontoblástica, ausência de necrose e formação de estrutura mineralizada total foram observadas (Figura 7).

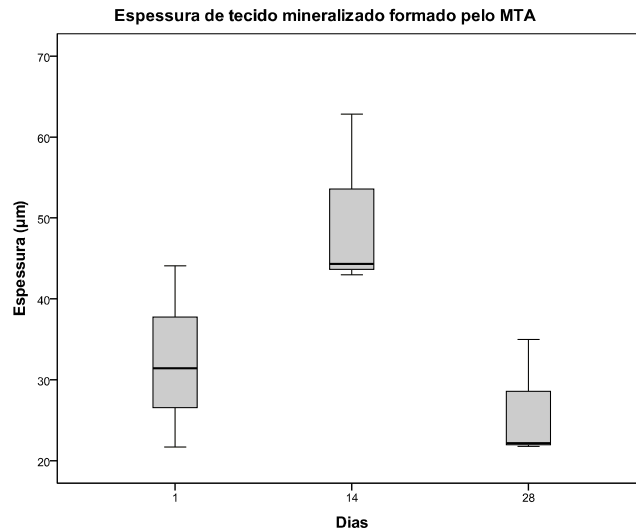


**Figura 7** – MTA após 28 dias de cultura. Área de exposição pulpar (EP), estrutura mineralizada formada (EM) e tecido pulpar (P), x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas) e infiltrado inflamatório (seta), edema e dissociação de fibras (D) x400 (b, c).

Tratamento		MTA				
				1 dia	14 dias	28 dias
Avaliação histológica		Escalas		Frequência relativa (%)		
Polpa dental	Inflamação	Tipo	2	66,6	100	100
			3	33,3	-	-
		Intensidade	1	-	100	66,6
			2	66,6	-	-
			3	33,3	-	33,3
	Hiperemia	1	-	66,6	66,6	
		2	-	-	33,3	
		3	100	33,3	-	
	Necrose	0	33,3	100	100	
		1	66,6	-	-	
Camada odontoblástica	0	100	100	100		
	1	-	-	-		
Estrutura mineralizada	Continuidade	1	33,3	33,3	100	
		2	66,6	33,3	-	
		3	-	33,3	-	
				Média (µm)		
		Espessura		32,39	50,04	26,30

**Tabela 3** – Resultados da análise histológica no local de exposição pulpar do grupo MTA.

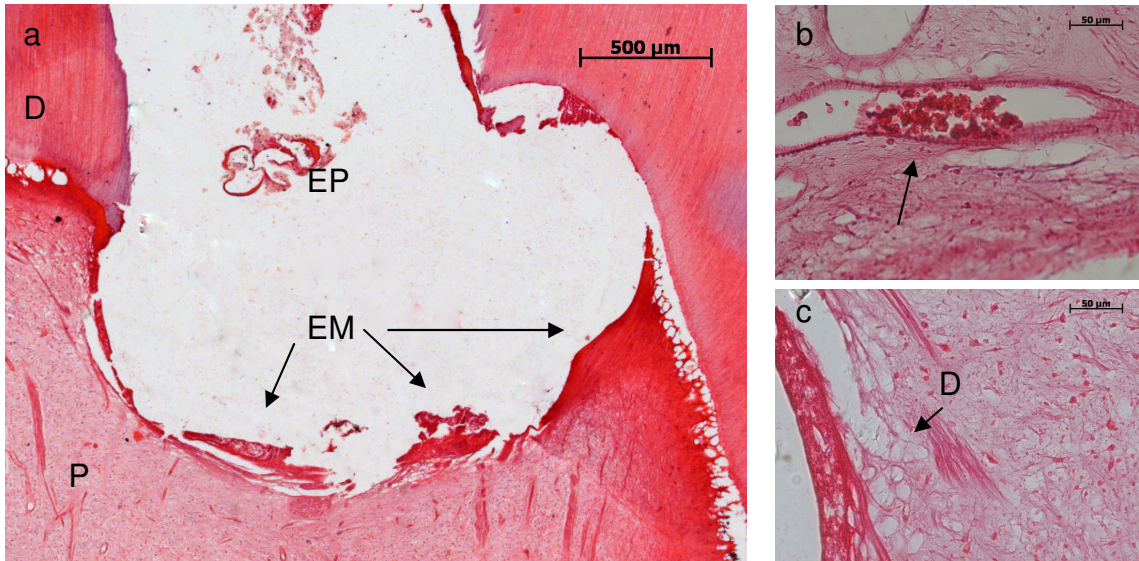
Quando as espessuras da estrutura mineralizada das amostras deste grupo foram comparadas nos diferentes tempos, usando o teste ANOVA, não houve diferença estatística ( $p=0,065$ ) (Gráfico 2).



**Gráfico 2** – Boxplot da análise estatística do MTA. Comparação da espessura da estrutura mineralizada formada após os diferentes períodos de cultura no grupo de amostras tratadas com MTA.

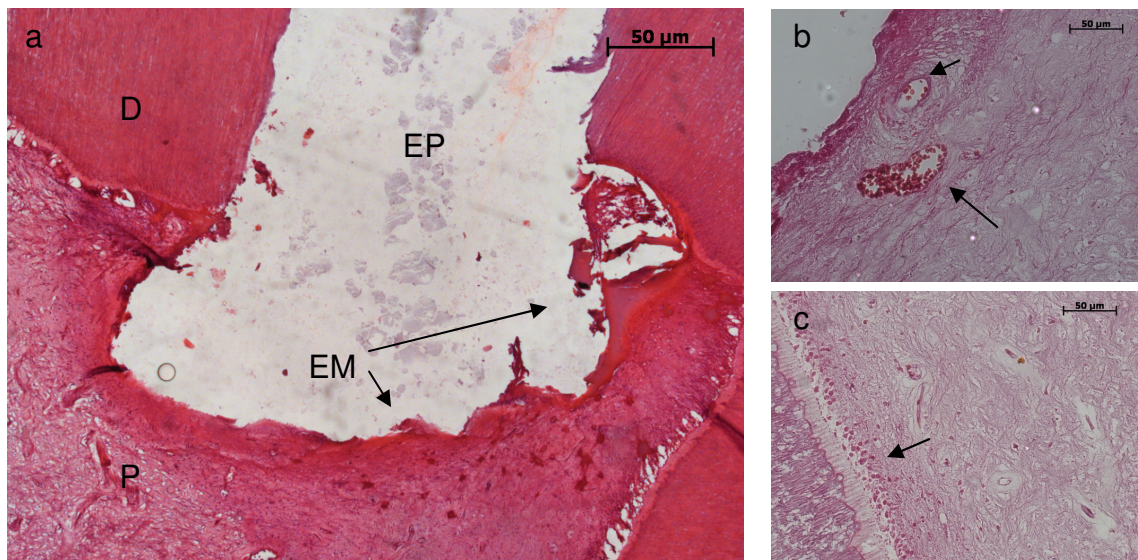
### **Grupo tratado com hidróxido de cálcio [Ca(OH)<sub>2</sub>]**

Após 1 dia de cultura - Observou-se presença de infiltrado inflamatório crônico com intensidade moderada, hiperemia severa, porém sem sinais de necrose e ausência da camada odontoblástica. Formação parcial de estrutura mineralizada. Dissociação fibrilar compatível com edema também foi observada neste período (Figura 8).



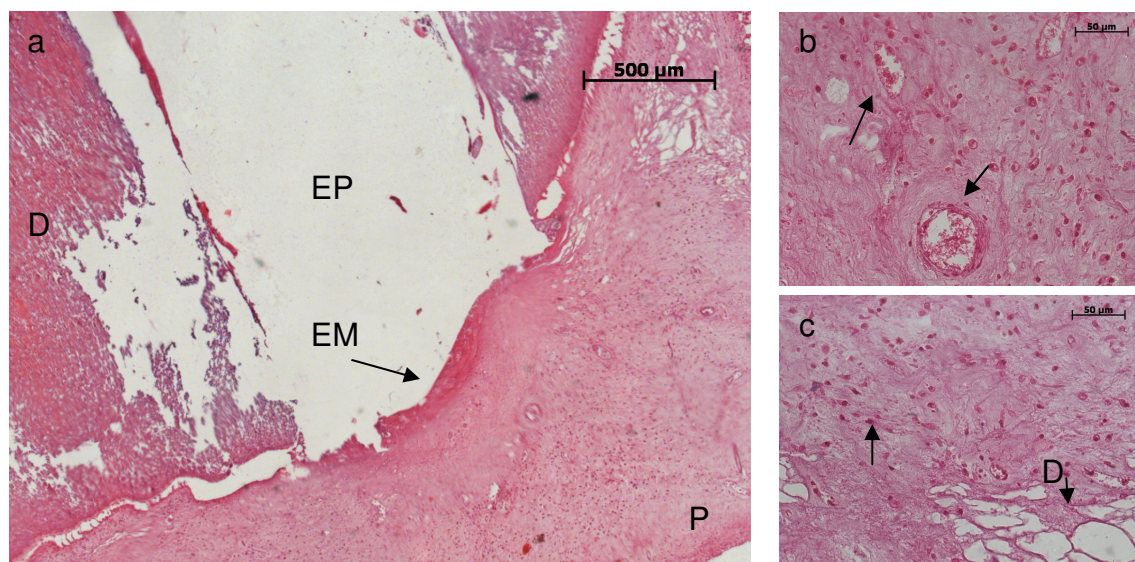
**Figura 8** -  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  após 1 dia de cultura. Área de exposição pulpar (EP), estrutura mineralizada formada (EM), tecido pulpar (P) e dentina (D), x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (seta) e infiltrado inflamatório e dissociação de fibras (D), x400 (b, c).

Após 14 dias de cultura – Infiltrado inflamatório crônico com intensidade moderada e hiperemia severa foram observados neste período. Ausência da camada odontoblástica e ausência de necrose foram constadas. Houve formação de barreira dentinária completa (Figura 9).



**Figura 9** -  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  após 14 dias de cultura. Área de exposição pulpar (EP), estrutura mineralizada formada (EM) e dentina (D), x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas) e infiltrado inflamatório (seta), x400 (b, c).

Após 28 dias de cultura – Infiltrado inflamatório crônico com intensidade moderada e hiperemia moderada foram observados. Presença de edema e dissociação de fibras em áreas restritas das amostras (Figura 10).



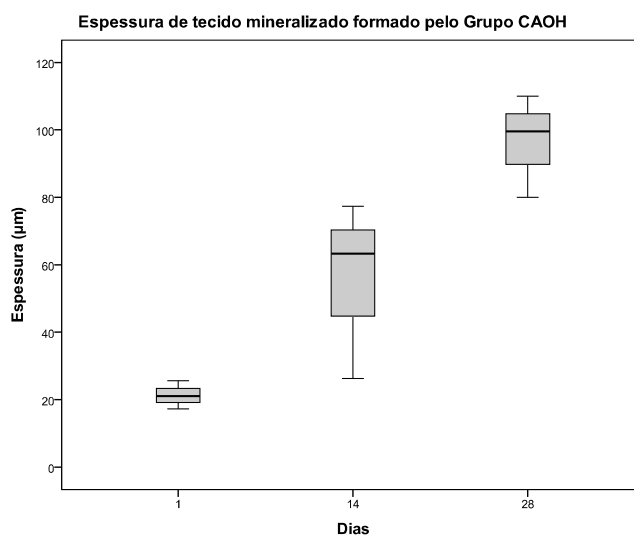
**Figura 10** -  $\text{Ca(OH)}_2$  após 28 dias de cultura. Área de exposição pulpar (EP), estrutura mineralizada formada (EM), dentina (D) e tecido pulpar (P), x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas) e infiltrado inflamatório (setas) e dissociação de fibras (D), x400 (b, c).

Avaliação histológica	Tratamento	$\text{Ca(OH)}_2$	Escalas	1 dia	14 dias	28 dias	
				Frequência relativa (%)			
Polpa dental	Inflamação	Tipo	2	66,6	100	<b>100</b>	
			3	33,3	-	-	
			Intensidade	1	-	-	33,3
				2	66,6	100	100
				3	33,3	-	-
		Hiperemia		1	-	-	-
				2	33,3	-	-
				3	66,6	100	100
		Necrose		0	100	100	100
		Camada odontoblástica		0	100	100	100
Barreira dentinária	Continuidade		1	-	100	100	
			2	66,6	-	-	
			3	33,3	-	-	

Espessura	Média ( $\mu\text{m}$ )		
		21,27	55,60

**Tabela 4** – Resultados da análise histológica no local de exposição pulpar do grupo  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Quando se comparou a diferença entre as espessuras da estrutura mineralizada formada nos diferentes períodos, utilizando o teste ANOVA, a espessura após 28 dias foi estatisticamente superior à espessura após 1 dia ( $p=0,006$ ) (Gráfico 3).

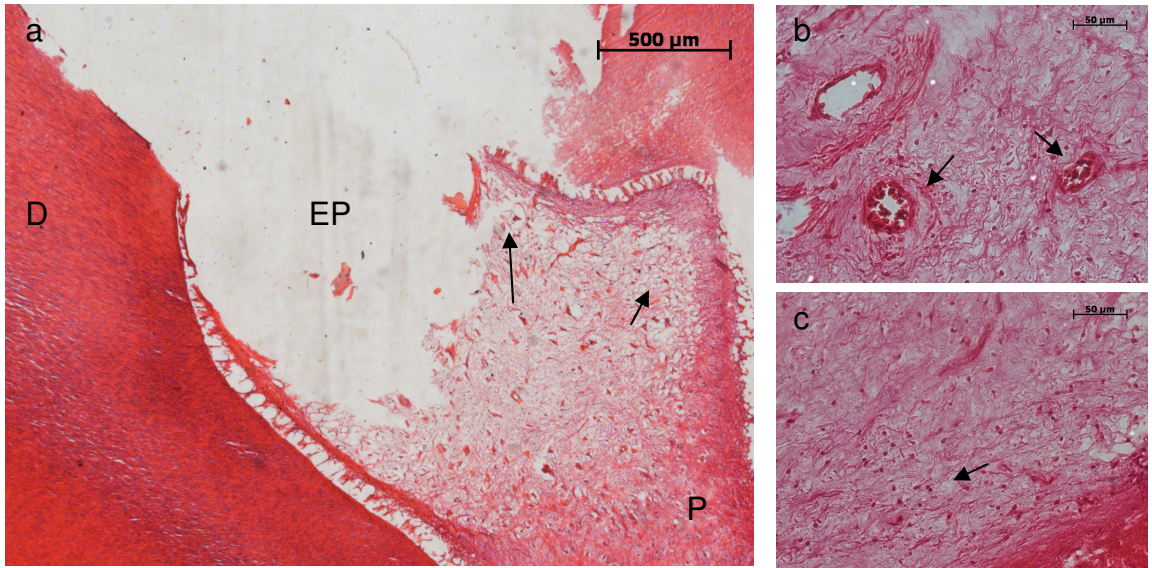


**Gráfico 3** – Boxplot da análise estatística do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Comparação da espessura da estrutura mineralizada formada após os diferentes períodos de cultura no grupo de amostras tratadas com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

### **Grupo tratado do cimento de óxido de zinco-eugenol (OZE)**

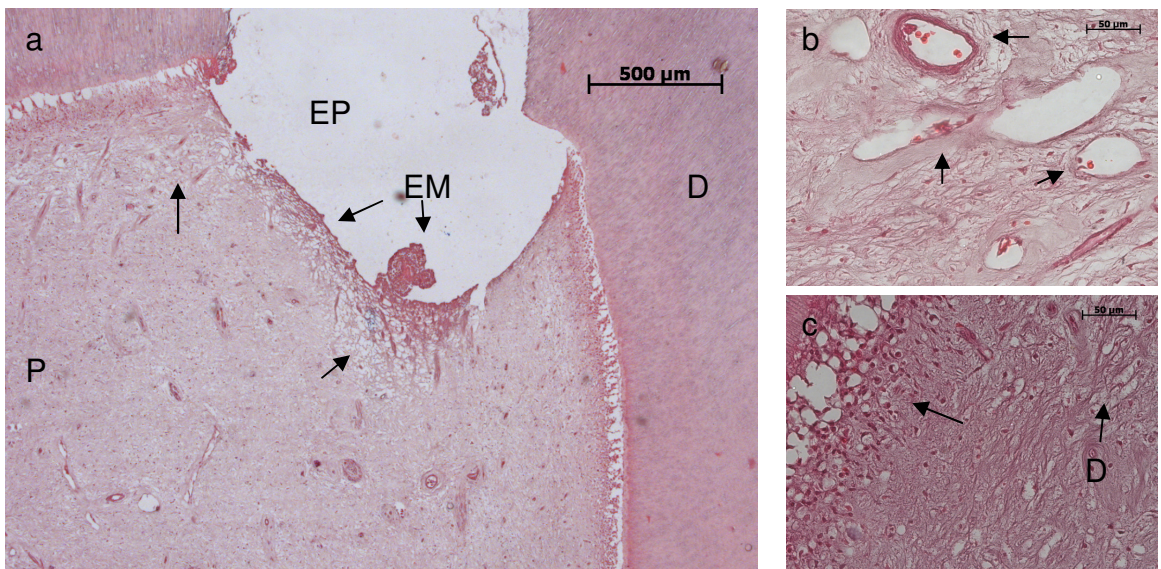
Após 1 dia de cultura - Observou-se presença de infiltrado inflamatório crônico com intensidade moderada e hiperemia severa. Presença de dissociação fibrilar compatível com edema, ausência de necrose e ausência da camada odontoblástica (Figura 11).





**Figura 11** – OZE após 1 dia de cultura. Área de exposição pulpar (EP), dentina (D), tecido pulpar (P), dissociação de fibras (setas), x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas) e infiltrado inflamatório (seta), x400 (b, c).

Após 14 dias de cultura – Infiltrado inflamatório crônico com intensidade moderada e hiperemia severa foram observados. Necrose e camada odontoblástica ausentes. Observou-se formação parcial de estrutura mineralizada (Figura 12).



**Figura 12** – OZE após 14 dias de cultura. Área de exposição pulpar (EP), estrutura mineralizada formada (EM), dissociação de fibras (setas), dentina (D) e tecido pulpar (P), x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas), e infiltrado inflamatório (seta) e dissociação de fibras (D), x400 (b, c).

Após 28 dias de cultura – Infiltrado inflamatório misto foi observado e hiperemia severa. Houve sinais de necrose em uma das amostras, presença de formação de estrutura mineralizada parcial (Figura 13).

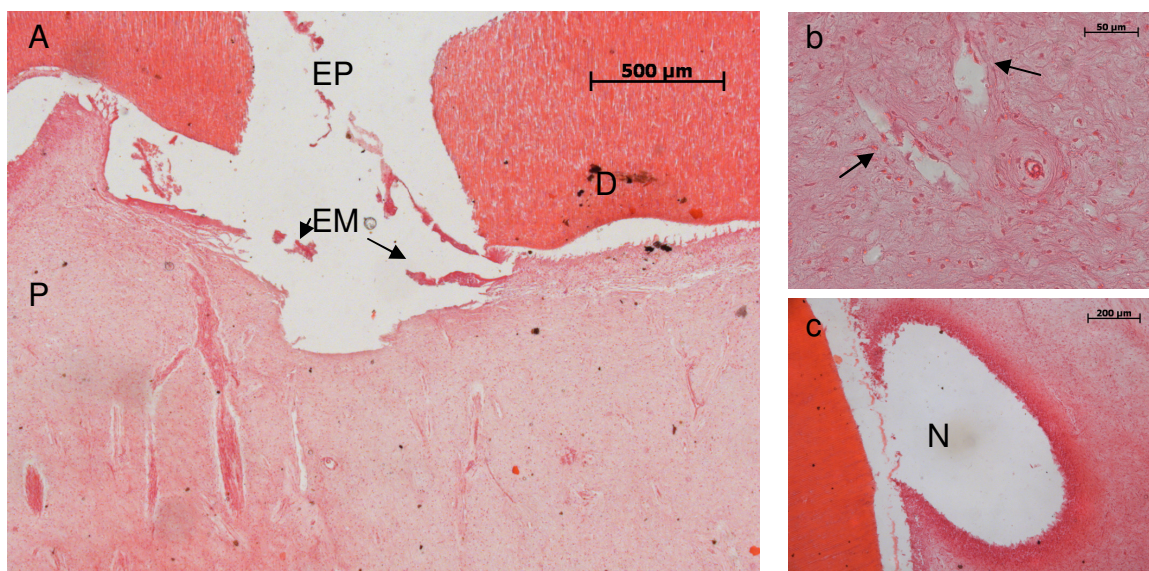


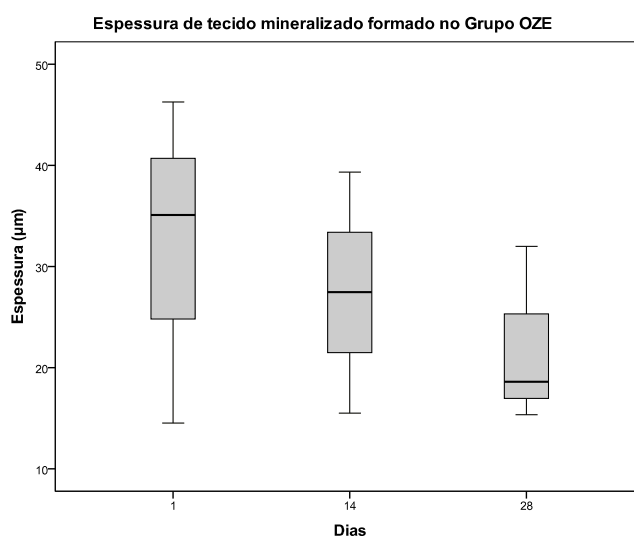
Figura 13 – OZE após 28 dias de cultura. Área de exposição pulpar (EP), estrutura mineralizada formada (EM), tecido pulpar P) e dentina (D), x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas), x400 (b) e área de necrose (N), x100 (c).

Tratamento	OZE		Escalas	1 dia	14 dias	28 dias
				Frequência relativa (%)		
Avaliação histológica						
Polpa dental	Inflamação	Tipo	2	100	100	66,6
			3	-	-	33,3
		Intensidade	1	33,3	-	
	2		33,3	100	33,3	
	3		33,3	-	66,6	
	Hiperemia	1	33,3	66,6	33,3	
		2	-	-	33,3	
		3	66,6	33,3	33,3	
	Necrose	0	100	100	66,6	
		1	-	-	33,3	
Camada odontoblástica	0	100	100	100		
	1	-	-	-		
Estrutura mineralizada	Continuidade	1	-	33,3	33,3	
		2	100	66,6	66,6	

	3	-	-	-
		Média (μm)		
Espessura	31,93	27,85	21,97	

**Tabela 5** – Resultados da análise histológica no local de exposição pulpar do grupo OZE.

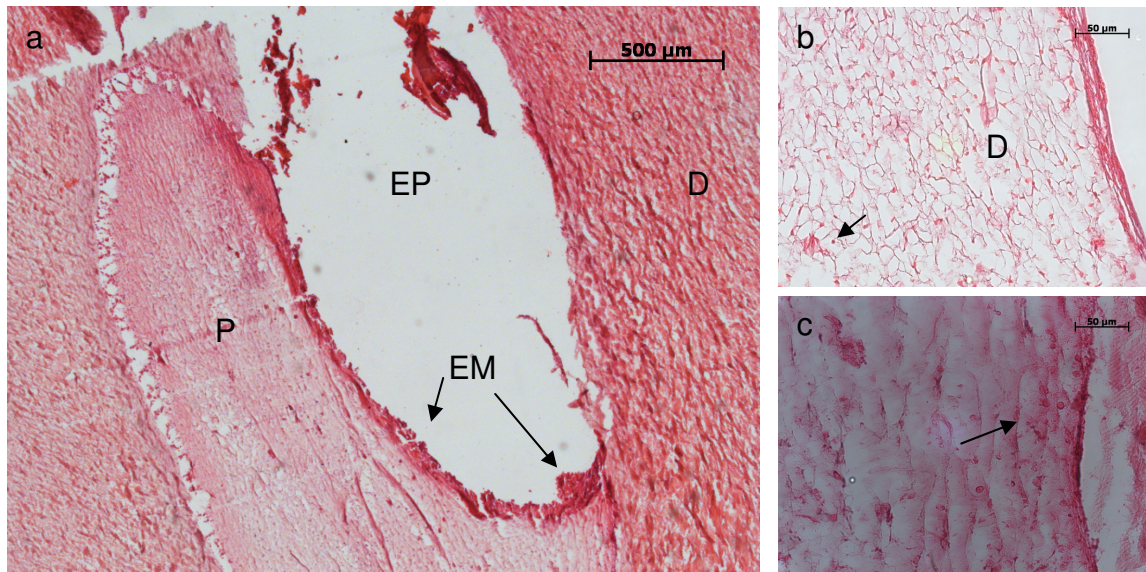
A espessura da estrutura mineralizada no grupo OZE não apresentou diferença estatisticamente significativa nos diferentes tempos de cultura (sendo  $p=0,647$ , teste ANOVA) (Gráfico 4).



**Gráfico 4** – Boxplot da análise estatística do OZE. Comparação da espessura da estrutura mineralizada formada após os diferentes períodos de cultura no grupo de amostras tratadas com óxido de zinco-eugenol.

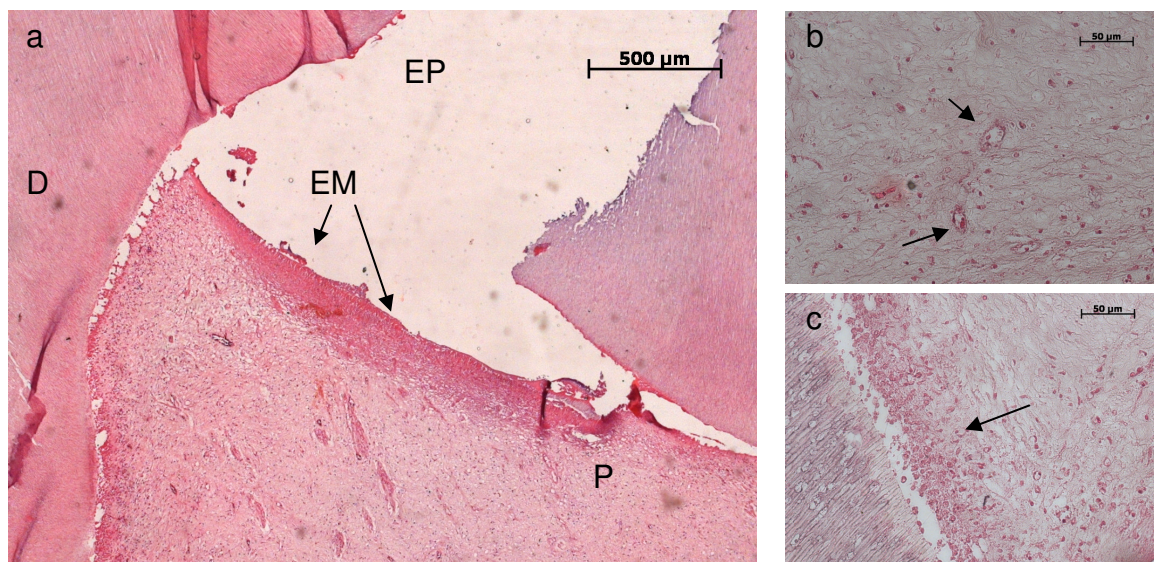
### **Grupo tratado com cimento de ionômero de vidro (CIV)**

Após 1 dia de cultura – Presença de infiltrado inflamatório crônico com intensidade leve, hiperemia severa, ausência da camada odontoblástica e sinais de necrose em uma das amostras foram observados. Formação de estrutura mineralizada parcial (Figura 14).



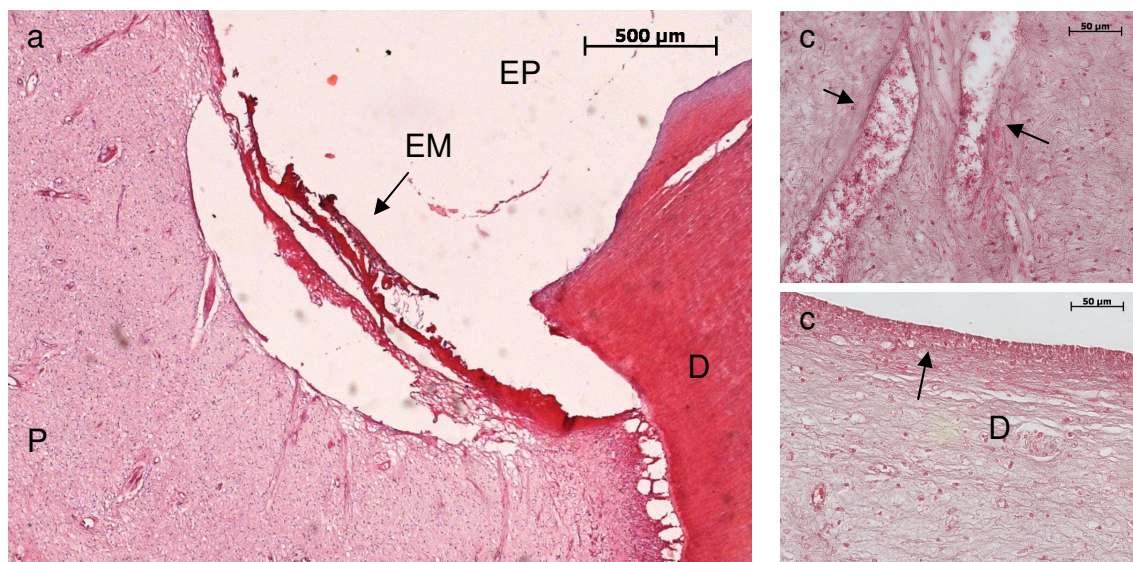
**Figura 14** – CIV após 1 dia de cultura. Área de exposição pulpar (EP), estrutura mineralizada formada (EM), dentina (D) e tecido pulpar (P), x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (seta), edema e dissociação de fibras(D), infiltrado inflamatório (seta), x400 (b, c).

Após 14 dias de cultura – Infiltrado inflamatório crônico com intensidade moderada, hiperemia severa, ausência de sinais de necrose e ausência da camada odontoblástica foram observados. Dissociação de fibras em área restrita. Formação de estrutura mineralizada completa (Figura 15).



**Figura 15** – CIV após 14 dias de cultura. Área de exposição pulpar (EP), estrutura mineralizada formada (EM), dentina (D) e tecido pulpar (P), x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas) e infiltrado inflamatório (seta), x400 (b, c).

Após 28 dias de cultura – Presença de infiltrado inflamatório crônico com intensidade avançada, hiperemia moderada, com ausência da camada odontoblástica e sinais de necrose em uma das amostras, foram constatados (Figura 16).



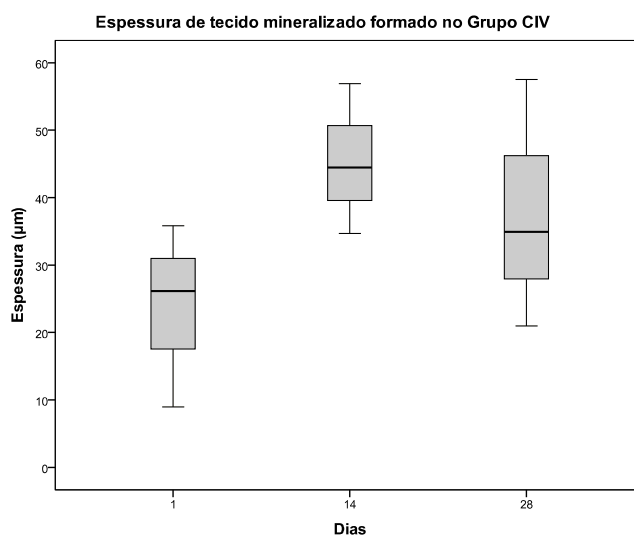
**Figura 16** – CIV após 28 dias. Área de exposição pulpar (EP), estrutura mineralizada formada (EM), dentina (D) e tecido pulpar (P), x50 (a). Presença vasos hiperêmicos (setas) e infiltrado inflamatório (seta), edema e dissociação de fibras (D) x400 (b, c).

Avaliação histológica	Tratamento	CIV	Escalas	Frequência relativa (%)		
				1 dia	14 dias	28 dias
Polpa dental	Inflamação	Tipo	2	100	100	66,6
			3	-	-	33,3
		Intensidade	1	100	-	33,3
	Hiperemia	Intensidade	2	-	66,6	-
			3	-	33,3	66,6
			1	-	-	66,6
	Necrose	Intensidade	2	33,3	33,3	-
			3	66,6	66,6	33,3
			0	66,6	100	66,6
	Camada odontoblástica	Intensidade	1	33,3	-	33,3
0			100	100	66,6	
1			-	-	33,3	
Estrutura mineralizada	Continuidade	1	66,6	100	100	
		2	33,3	-	-	

	3	-	-	-
		Média ( $\mu\text{m}$ )		
Espessura	23,65	45,35	37,78	

**Tabela 6** – Resultados da análise histológica no local de exposição pulpar do grupo CIV.

A espessura da estrutura mineralizada no grupo CIV não apresentou diferença estatisticamente significativa nos diferentes tempos de cultura ( $p= 0,263$ ) (Gráfico 5).



**Gráfico 5** – Boxplot da análise estatística do CIV. Comparação da espessura da estrutura mineralizada formada após os diferentes períodos de cultura no grupo de amostras tratadas com cimento de ionômero de vidro.

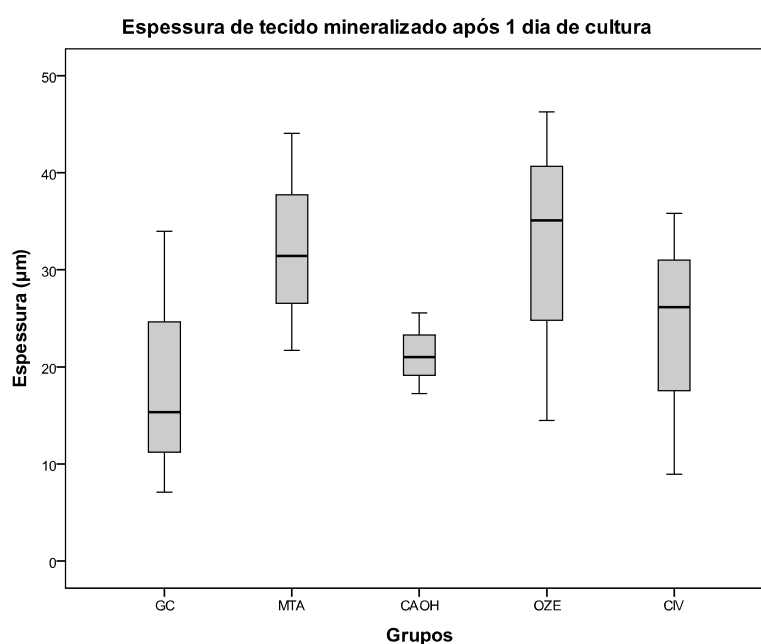
### **Análise entre os grupos**

Comparando os diferentes grupos após um dia de cultura não houve diferença estatística em relação à inflamação ( $p=0,520$ ), intensidade da inflamação ( $p=0,110$ ), hiperemia ( $p=0,852$ ), necrose ( $p=0,183$ ) e continuidade da estrutura mineralizada ( $p=0,248$ ).

Após 14 dias de cultura também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo  $p=1,000$  para inflamação,  $p=0,067$  para intensidade da inflamação,  $p=0,308$  para hiperemia,  $p=1,000$  para necrose,  $p=0,072$  para continuidade da estrutura mineralizada.

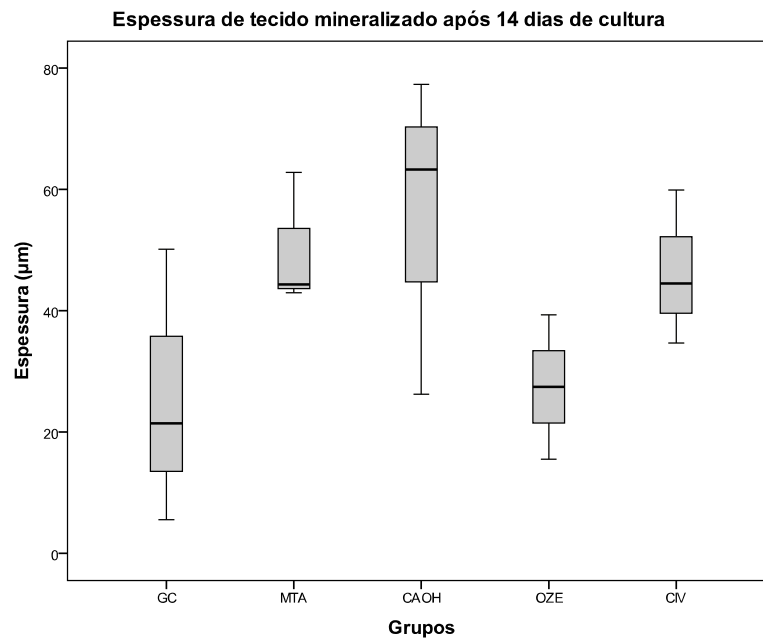
E após 28 dias de cultura os grupos também não apresentaram diferença estatística entre si, sendo  $p=0,532$  para inflamação,  $p=0,499$  para intensidade da inflamação,  $p=0,162$  para hiperemia,  $p=0,532$  para necrose e  $p=0,086$  para continuidade da estrutura mineralizada.

Comparando a espessura da estrutura mineralizada formada entre todos os grupos após 1 dia de cultura, teste ANOVA, não houve diferença estatisticamente significativa, sendo  $p=0,580$  (Gráfico 6).



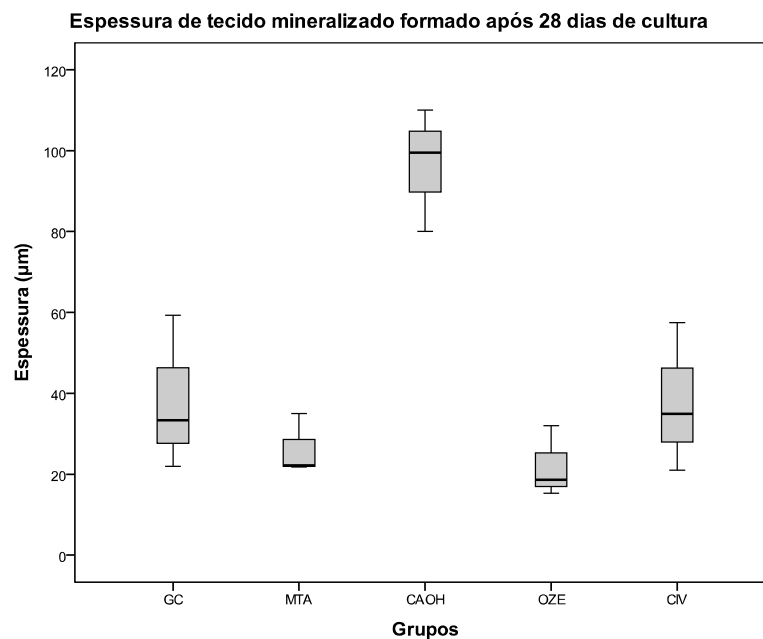
**Gráfico 6** – Boxplot da análise estatística da estrutura mineralizada entre grupos após 1 dia de cultura.

Comparando a espessura da estrutura mineralizada formada entre os grupos após 14 dias de cultura, teste ANOVA, não houve diferença estatisticamente significativa, sendo  $p=0,226$  (Gráfico 7).



**Gráfico 7** – Boxplot da análise estatística da estrutura mineralizada entre grupos após 14 dias de cultura.

Em relação às amostras dos diferentes grupos após 28 dias de cultura, teste Kruskal-Wallis, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,062$ ) (Gráfico 8).



**Gráfico 8** – Boxplot da análise estatística da estrutura mineralizada entre grupos após 28 dias de cultura.



## 6. DISCUSSÃO

Para a escolha de um material odontológico para o capeamento pulpar convencional ou como coadjuvante à engenharia de tecidos deve-se levar em conta a quantidade de estrutura mineralizada formada e a resposta pulpar àquele material.

Os materiais odontológicos utilizados não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no quesito resposta pulpar dentro das condições da presente experimentação. Porém o hidróxido de cálcio foi o único que não apresentou sinais de necrose em nenhuma das amostras independente do tempo de cultura.

Em relação à resposta pulpar, algumas amostras de grupos tratados com cimento de óxido de zinco-eugenol, cimento de ionômero de vidro e MTA apresentaram sinais de necrose. Em algumas amostras nos diferentes grupos, após um dia, foi constatado edema e dissociação de fibras, o que clinicamente representaria um possível quadro de pulpite.

O padrão de formação da estrutura mineralizada no local da exposição pulpar nos grupos CAOH e MTA ocorreram de forma semelhante, sendo mais intensa próxima às paredes de dentina. Este fato reforça outros estudos que afirmam que o hidróxido de cálcio promove a dissolução de moléculas presentes na dentina que estimulam a formação de tecido mineralizado (HILTON, 2009; IOHARA et al., 2004; NAKASHIMA, 2005).

O hidróxido de cálcio e o cimento de ionômero de vidro foram satisfatórios quanto a formação de estrutura mineralizada, mostrando-se capazes de formar uma estrutura mineralizada completa no local da exposição pulpar após 14 dias. Após 28 dias a formação de uma completa estrutura mineralizada no local da exposição pulpar também foi observada no grupo tratado com MTA.

O resultado da análise estatística da espessura da estrutura mineralizada formada mostrou não haver diferença significativa, porém, após 28 dias o hidróxido apresentou espessura muito superior ao grupo controle e ao grupo em que foi utilizado cimento de óxido de zinco-eugenol. Resultado que pode ser proveniente do pequeno número de amostras analisadas por período.

Em todos os grupos, independente do período de cultura foi observado a formação de pré-dentina. A formação de dentina secundária ocorre de forma lenta

ao longo da vida, fato já comprovado em estudos anteriores (SLOAN e SMITH, 2007; TÉCLÈS et al., 2007; MODENA et al, 2009).

## 7. CONCLUSÕES

O sucesso do capeamento pulpar depende de vários fatores, entre eles o tamanho da exposição, a idade do paciente, o material utilizado no capeamento, a causa da exposição, entre outros. Neste estudo alguns fatores foram controlados, como idade do paciente e tamanho da exposição pulpar. Porém, os materiais odontológicos utilizados não diferiram estatisticamente quanto aos quesitos analisados na resposta pulpar nem na espessura de estrutura mineralizada formada, dentro das condições do presente estudo.

Nos grupos tratados com cimento de ionômero de vidro, MTA e cimento de óxido de zinco-eugenol sinais de necrose foram constatados, o que mostra uma maior agressão ao tecido possivelmente por parte do material odontológico utilizado.

Embora os resultados obtidos com o hidróxido de cálcio tenham sido mais animadores, pela maior espessura da estrutura mineralizada formada, formação de estrutura completa após 14 dias e ausência de necrose, novos estudos utilizando materiais sintéticos como coadjuvantes ou não da engenharia de tecidos são necessários.

## **8. PERSPECTIVAS DO ESTUDO**

- Este estudo complementa a literatura, na qual não foram encontrados estudos que avaliassem diferentes materiais odontológicos utilizados para o procedimento de capeamento pulpar direto utilizando metodologias semelhantes.

- A metodologia proposta neste estudo pode ser utilizada em estudos futuros como um padrão, o que permitiria uma comparação entre estudos, além de reproduzir de forma semelhante a resposta do tecido pulpar.

- Vários fatores mediadores e diferenciadores responsáveis pela resposta pulpar à exposição ainda são desconhecidos e esta metodologia utilizada permite que estudos futuros os avaliem.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KIM, N.R. et al. **Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. v.108, p.e94- e100, 2009.

NAKASHIMA, M. E AKAMINE, A. **The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics.** J O E. v.31, p.711-718, 2005.

TÉCLÈS, O. et al. **Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury.** Arch Oral Biol. v.50, p.103-108, 2005.

TÉCLÈS, O. et al. **Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility.** J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, v.85B, p.180-187, 2007.

MODENA, K.C.S. et al. **Citotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials.** J Appl Oral Sci. v.17, p.544-554, 2009.

ABOUT, I. et al. **Pulpal inflammation responses following non-carious class V restorations.** Oper Dent. v.26, p.336-342, 2001.

BERGENHOLTZ, G. **Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations.** Crit Rev Oral Biol Med. v.11, p.467-480, 2000).

NGASSAPA, D. **Neurophysiological basis, aetiology and clinical aspects of hypersensitive teeth.** East African Med J. v.73, p.775-778.

MURRAY, P.E. et al. **Analysis of pulpal reactions to restorative procedures, materials, pulp capping, and future therapies.** Crit Rev Oral Biol Med. v.13, p.509-520, 2002.

MAHMOUD, S.H. et al. **Influence of selective immunosuppressive drugs on the healing of exposed dogs' dental pulp capped with mineral trioxide aggregate.** J O E. v.36, p.95-99, 2010.

GRONTHOS, S. et al. **Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.** P N A S. v.97, p.13625-13630, 2000.

GRONTHOS, S. et al. **Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells.** J Dent Res. v.81, p.531-535, 2002.

MIURA, M. et al. **SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth.** PNAS. v.100,p.5807–5812, 2003.

HILTON, T.J. **Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature.** Oper Dent. v.34, p.615-625, 2009.

HASHEMINIA, S.M. et al. **A comparative study of three treatment methods of direct pulp capping in canine teeth of cats: a histologic evaluation.** Lasers Med Sci. v.25, p.9-15, 2010.

CHRISTENSEN, G.J. **Pulp capping.** J Am Dent Assoc. v.129, p.1297-1299, 1998.

GÓRECKA, V. et al. **Direct pulp capping with a dentin adhesive resin system in children's permanent teeth after traumatic injuries: case reports.** Quintessence Int. v.31, p.241-248, 2000.

HAFEZ, A.A. et al. **Pulpotomy reconsidered: application of na adhesive system to pulpotomized permanent primate pulps.** Quintessence Int. v.31, p.579-589.

MIN, K.S. et al. **Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp.** J O E. v.34, p.666-670, 2008.

**FUKS, A.B. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. J O E. v.34, p.S18-S24, 2008.**

**TUNCA, Y.M. et al. The effect of mineral trioxide aggregate on the contractility of the rat thoracic aorta. J O E. v.33, p.823-826, 2007.**

**PEREIRA, J.C. et al. Human pulpal response to direct capping with an adhesive system. Am J Dent. v.13, p. 139-147, 2000.**

**FERNANDES, A.M. et al. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system and calcium hydroxide: an immunohistochemical analysis. Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod. v.105, p.385-390, 2008.**

**IOHARA, K. et al. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. J Dent Res. v. 83, p.590-595, 2004.**

**NAKASHIMA, M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. Cytokine Growth Factor Rev.v.16, p.369-376,2005.**

**TORABINEJAD, M. and PARIROKH, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive review – part II: leakage and biocompatibility investigations. J O E. v.36, p.190-202, 2010.**

**KARABUCAK, B. et al. Vital pulp therapy with mineral trioxide aggregate. Dent Traumatol.v.21, p.240-243, 2005.**

**TAKITA, T. et al. Effect of mineral trioxide aggregate on proliferation of cultured human dental pulp cells. Int Endod J. v.39, p.415-422, 2006.**

SILVA, L.A.B. et al. **Direct pulp capping with a self-etching adhesive system: histopatologic evaluation in dogs' teeth.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. v.108, p.e34-e40, 2009.

GRYST, M.E.I AND MOUNT, G.J.A.M. **The use of glass ionomer in special needs patients.** Aust Dent J. v.44, p.268-274, 1999.



## 9. ANEXOS

### 9.1 Parecer de Aprovação pelo Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

---

#### ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

**Registro de Projeto:** CEP-FM 077/2009.

**Título:** “Estudo da ativação, migração e proliferação de células-tronco da polpa de dentes decíduos e permanentes após exposição pulpar e durante o processo de reparo.”

**Pesquisador Responsável:** Orlando Ayrton de Toledo.

**Documentos analisados:** Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

**Data de entrega:** 15/09/2009.

Proposição do (a) relato (a)

Aprovação

Não aprovação.

**Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB:** 30/09/2009.

**Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB:** 30/09/2009.

---

#### PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 01 de Outubro de 2009.

  
Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Faculdade de Medicina-UNB

## 9.2

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos, está sendo convidado a participar da pesquisa "Estudo da ativação, migração e proliferação de células-tronco da polpa de dentes decíduos e permanentes após exposição pulpar e durante processo de reparo". Esta pesquisa é um projeto de Mestrado desenvolvido na Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília, que objetiva avaliar o comportamento de células-tronco presentes na polpa dental (parte 'viva' do dente).

Sua participação no projeto acima consiste em doar seus dentes sisos (terceiros molares) que, por motivo ortodôntico e/ou mau posicionamento e/ou falta de espaço, foi indicado a extração dos mesmos. Os riscos aos quais você será submetido são apenas os riscos comuns de uma extração, pois sua participação no projeto não lhe acarretará em nenhum outro risco.

A sua participação na pesquisa não lhe custará nada financeiramente e caso não queira participar da pesquisa, em nada influenciará o seu tratamento odontológico, podendo desistir da participação a qualquer momento. O sigilo e a privacidade dos participantes serão mantidos.

Após ser devidamente esclarecido(a) e ter compreendido todas as informações acima citadas, se aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Caso não aceite participar não haverá nenhum problema para você.

---

Assinatura do paciente ou responsável

---

Assinatura do pesquisador

Juliana Duarte Bittar

Tel: 61-9282-7009

Pós-graduanda em Ciências da Saúde - UnB

### 9.3

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu(sua) filho(a) \_\_\_\_\_,  
(idade) \_\_\_\_\_ anos, está sendo convidado a participar da pesquisa "Estudo da ativação, migração e proliferação de células-tronco da polpa de dentes decíduos e permanentes após exposição pulpar e durante processo de reparo". Esta pesquisa é um projeto de Mestrado desenvolvido na Faculdade de Ciências da Saúde – Universidade de Brasília, que objetiva avaliar o comportamento de células-tronco presentes na polpa (parte 'viva' do dente).

A participação do seu(sua) filho(a) consiste em doar seus dentes sisos (terceiros molares) que por motivos ortodônticos foi indicado a extração dos mesmos. Os riscos submetidos são apenas os riscos comuns de uma extração, pois a sua participação no projeto não lhe acarretará em nenhum outro risco.

A participação do seu(sua) filho(a) na pesquisa não lhe custará nada financeiramente e caso não queira participar da pesquisa, em nada influenciará o seu tratamento odontológico, podendo desistir da participação a qualquer momento. O sigilo e a privacidade dos participantes serão mantidos.

Após ser devidamente esclarecido(a) e ter compreendido todas as informações acima citadas, se aceitar que seu(sua) filho(a) faça parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Caso não aceite participar não haverá nenhum problema para você e seu(sua) filho(a).

Nome do responsável: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Juliana Duarte Bittar

Tel: 61-9282-7009

Pós-graduanda em Ciências da Saúde - UnB