PAULA LOURES VALLE LIMA

**Análise do efeito da aplicação direta de materiais capeadores à base de óleo
de copaíba sobre a polpa de molares murinos**

São Paulo

2018

PAULA LOURES VALLE LIMA

**Análise do efeito da aplicação direta de materiais capeadores à base de óleo
de copaíba sobre a polpa de molares murinos
Versão Corrigida**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, para obter o título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Dentística

Orientador: Prof. Dr. Giulio Gavini

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Lima, Paula Loures Valle.

Análise do efeito da aplicação direta de materiais capeadores à base de óleo de copaíba sobre a polpa de molares murinos / Paula Loures Valle Lima ; orientador Giulio Gavini . -- São Paulo, 2018.

138 p. : fig., tab. graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão Corrigida

1. Complexo dentinho-pulpar. 2. Regeneração pulpar. 3. Capeamento da polpa dentária. 4. Óleo-resina de copaíba. 5. Micro CT. I. Gavini, Giulio. II. Título.

Lima PLVL. Análise do efeito da aplicação direta de materiais capeadores à base de óleo de copaíba sobre a polpa de molares murinos 4. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia/Dentística.

Aprovado em: 19 / 03 / 2018

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a). Luciana Fávaro Francisconi dos Rios.

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Julgamento: Aprovada.

Prof(a).Dr(a). Carlos Alberto Adde

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada.

Prof(a).Dr(a). Elaine Fagas Iglesias

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Paulista

Julgamento: Aprovada

Prof(a).Dr(a). Rejane Andrade de Carvalho

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Julgamento: Aprovada

Prof(a).Dr(a). Giulio Gavini

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada.

Este trabalho dedico aos meus pais,
Marisa e Paulo Afonso. É pela
perseverança, honestidade, fé e humildade
com que aprendi a crescer que hoje
encontro felicidade em tudo que faço.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço **aos meus pais**, pela abnegação de me ter mais perto de suas vidas para que este projeto (de vida) pudesse ser realizado. Aprendemos muito nestes anos que se passaram. Paciência, compreensão, apoio, e a certeza de uma fase realizada nos seus mais belos sentidos. Eu os agradeço por participarem ativamente de toda a minha vida.

Ao meu Pai, **Nosso Senhor**, por ter me dado a força necessária para continuar diante de todas as dificuldades e a oportunidade de ter a presença de meus pais nesta jornada.

Ao meu irmão, **Francisco**, por ter acreditado em mim e ter enfrentado muitas dificuldades sem a minha ajuda, que foram muitas.

A minha avó, **Odete**, que sempre me apoiou e me aconselhou durante toda a sua vida. E mesmo morrendo, me disse: “É a neta que mais parece comigo”. Tive o privilégio de tê-la na minha vida. Saudades Eterna.

Ao meu tio, **Sérgio**, que diante das dificuldades por qual passamos no meu último ano de minha faculdade, apoiou meu estudo e o término da minha graduação. Eterna gratidão. *Em memória.*

Ao meu orientador do mestrado, **Raul Garcia**, por ter me dado a primeira oportunidade de continuar os meus estudos; o seu apoio foi muito importante para minha caminhada. *Em memória.*

Agradeço a minha amiga e Professora, **Rejane**. Tantas memórias me vem à cabeça, nem sei bem a que agradecer... O meu aprendizado durante esses tempos de convivência é incomensurável. Você é um grande exemplo! Eu agradeço todos os ensinamentos, a amizade, a confiança, o apoio. Muito obrigada do fundo do meu coração, por tudo.

Agradeço a meu orientador, **Giulio Gavini**. Sem ele não conseguiria terminar essa fase da vida. Obrigada pela oportunidade, confiança e paciência.

Um agradecimento mais que especial aos **familiares** que contei durante todo esse período, não só pelo suporte técnico e emocional, mas pelo incentivo e amizade. Muito obrigado **tio João, tia Roseli, tio Newton, tia Nancy, tia Ana, tio Homero, tia Maria do Carmo, tia Dulce**, vocês são uma mistura de sentimentos bons! Sem cada um de vocês, não teríamos força para ir tão longe!

AGRADECIMENTOS

À **FOUSP**, em nome do **Prof. Diretor Rodney Garcia Rocha**, pelo suporte acadêmico e de infraestrutura durante o curso de doutorado.

Aos **pacientes da FOUSP**, sejam aos das clínicas da Dentística, os quais confiaram e confiam seus tratamentos odontológicos aos alunos, pós-graduandos e professores da instituição; ou àqueles que um dia concordaram em doar material biológico para pesquisa no país.

À **Universidade Potiguar**, em nome da **Prof.^a Maria Aparecida**, na disponibilização de infraestrutura, material e suporte intelectual na execução desta pesquisa. Agradeço também a participação intelectual de todo o grupo, a qual incrementou significativamente a qualidade do projeto executado.

À **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, em nome da **Prof.^a Dra. Lelia Batista de Souza** e a **Técnica Sandrinha**, departamento de Patologia, pela colaboração e disponibilização de infraestrutura para a condução de experimentos.

Aos **Departamentos** de Cirurgia, Estomatologia, Biologia Oral e Dentística da FOUSP, pelo acolhimento ao pós-graduando e acesso ilimitado às suas dependências.

Aos **professores da FOUSP**, os quais tiveram papel importante na minha formação acadêmica no período de cumprimento de disciplinas.

Aos **professores do Departamento de Dentística** o meu muito obrigada por todos os ensinamentos e os ótimos períodos de convivência. As clínicas e laboratórios pré-clínicos foram sempre muito prazerosos e enriquecedores.

Aos **funcionários** da FOUSP e outros institutos, sem os quais seria impossível a execução dos trabalhos. **Aldo, Arnaldo, David, Leandro, Selminha e Soninha, Débora** (Departamento de Dentística); **Lili e Ana** (em nome do LELO); **Kátia e Alessandra** (Secretaria de Pós-Graduação); **Márcio Valentim** (Departamento de Genética, IB). E tantos outros que não tive tanto contato, mas que são insubstituíveis em suas tarefas para o bom andamento da instituição. Obrigada a todos pelo carinho, atenção, dedicação e ajudas preciosas.

Agradeço a todos os **alunos da graduação** que porventura tenham tido contato comigo nas aulas teóricas, seminários, laboratórios ou clínicas. Aprendi muito mais do que ensinei.

Aos **colegas de pós-graduação da Dentística** pela amizade e atividades que desenvolvemos juntos, em especial ao **Christian Bernal** que foi um amigo e companheiro de todas as horas.

À minha colega, **Elaine Faga Iglecias**, por me orientar e ajudar nas análises da micro-CT.

Agradeço a **Roberta Couto** e a **Prof. Dra. Márcia Martins Marques**, pela confiança de realizar esse trabalho.

Finalmente, agradeço às agências financiadoras que me suportaram nos últimos 4 anos na cidade de São Paulo. À **CAPES**, pelo bolsa de doutorado até o término do curso, e pela concessão da Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior por 7 meses. Além de agradecer a **FAPESP**, **CNPQ** pelo incentivo financeiro a pesquisa.

Devido ao período de 7 meses no exterior atuando como pesquisadora visitante na Universidade de Miami (Departamento de Neurologia sob orientação do Prof. Carlos Moraes), eu não poderia deixar de agradecer mais uma vez meus supervisores, colegas e amigos de Miami. Muito obrigada.

“Humildade não é se

Declarar pequeno.

Humildade é reconhecer

Suas forças e suas fraquezas

E perante isso,

Buscar o seu melhor”

Autor Desconhecido

RESUMO

Lima PLVL. Análise do efeito da aplicação direta de materiais capeadores à base de óleo de copaíba sobre a polpa de molares murinos [tese] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Este estudo translacional avaliou o efeito da aplicação direta de materiais capeadores à base de óleo de copaíba sobre a polpa dentária de ratos. O biomaterial foi analisado de acordo com os processos inflamatórios, reparadores e regenerativos. Cavidades classe I foram preparadas na face oclusal dos molares superiores e inferiores de ratos da linhagem Wistar (n=120). Posteriormente, uma cavidade padronizada foi realizada com broca carbide esférica 1/4. Exposições pulpares foram obtidas e após a hemostasia com algodão estéril e água destilada, foi realizado o capeamento pulpar com aplicação de biomateriais diretamente no tecido pulpar. Os biomateriais utilizados foram: COP (Óleo de Copaíba); $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (hidróxido de cálcio), $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +COP; MTA (agregado trióxido mineral); MTA+COP; BIODENTINA (Biodentine®); BIODENTINA+COP. Todas as cavidades foram restauradas com cimento provisório. Os animais foram sacrificados após o período de 7, 14, 28 dias de acordo com os princípios de ética e experimentação animal. Vinte e um grupos foram criados a partir da combinação de tempos e materiais, cada grupo foi constituído de 5 animais. As peças foram preparadas e processadas pela técnica histológica e coradas pela HE (hemotoxilina e eosina) realizando cortes aleatórios, sendo analisados ao microscópio óptico em 100X de aumento por 2 examinadores. Os critérios avaliados foram: respostas inflamatória e degenerativa, organização tecidual, dentina reacional e reparativa. No último tempo experimental (28 dias) de todos os grupos foi analisado a superfície (mm^2) e o volume (mm^3) da ponte de dentina formada pela técnica da micro-CT (microtomografia computadorizada) de alta resolução. Os dados foram estatisticamente analisados utilizando o teste T pareado, determinando a superfície e volume da dentina reparadora formada entre os grupos experimentais. Nas análises histológicas foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney realizando comparações entre os grupos ($\alpha=5\%$). A BIODENTINA demonstrou uma tendência de acelerar o processo de regeneração pulpar, iniciando a deposição de dentina reparativa ao sétimo dia do capeamento. Este material apresentou uma dentina mais

espessa em comparação com os outros biomateriais. O MTA também demonstrou uma eficiência na formação da ponte dentinária, entretanto em 20% das amostras não foi observada a presença de dentina reparadora. Ao acrescentar o COP nestes materiais, a formação da ponte dentinária apresentava heterogênea e incompleta, além disso esses grupos continham um processo inflamatório aumentado. A dentina reparadora do grupo de Ca(OH)_2 demonstrou presença de túnel, com característica heterogênea. A adição do COP ao Ca(OH)_2 aumentou a formação de dentina nas paredes ao redor da câmara pulpar em 80% das amostras, porém esta dentina não apresentava melhora na qualidade. Desta forma, o capeamento pulpar com COP isolado ou associado a Ca(OH)_2 , MTA e BIODENTINA não formou uma ponte de dentina completa e homogênea no local da exposição pulpar.

Palavras-chave: Complexo dentino-pulpar. Regeneração pulpar. Capeamento pulpar. Óleo-resina de copaíba. Micro CT.

ABSTRACT

Lima PLVL. Analysis of the effect of the direct application of copaiba oil based capping materials on pulp murine teeth [thesis] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Corrected version.

This translational study evaluated the effect of the direct application of copaiba oil based capping materials on the rat pulp. The biomaterial was analyzed according to inflammatory, repairing and regenerative processes. Class I cavities were prepared on the occlusal surface of the upper and lower molars of Wistar rats ($n = 120$). Subsequently, standardized cavities was performed with $\frac{1}{4}$ spherical carbide drill. Pulp exposures were obtained and after their hemostasis with sterile cotton and distilled water, pulp capping was done with application of biomaterials directly on the pulp tissue. The biomaterials used were: COP (Copaíba oil); $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (calcium hydroxide), $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +COP; MTA (aggregate mineral trioxide); MTA+COP; BIODENTINE (Biodentine®); BIODENTINA+COP. All cavities were restored with temporary cement. The animals were sacrificed after the period of 7, 14, 28 days according to the principles of ethics and animal experimentation. Twenty-one groups were created from the combination of times and materials, each group consisted of 5 animals. The specimens were prepared and processed by histological technique and stained by HE (haemotoxin and eosin); randomized cuts were examined under optical microscope with 100X enlargement by two different examiners. The evaluated criteria were inflammatory and degenerative response, tissue organization, reactive and reparative dentin. In the last experimental period (28 days) of all groups, the surface (mm^2) and the volume (mm^3) of the reactive and reparative dentin formed were analyzed by the high-resolution micro-CT (computerized microtomography) technique. The data were statistically analyzed using the paired T-test, determining the surface and volume of the reparative dentin formed between the experimental groups. In the histological analyzes, the non-parametric Mann-Whitney test was used, comparing groups ($\alpha = 5\%$). BIODENTINE demonstrated a tendency to accelerate the process of pulpal regeneration, initiating the deposition of reparative dentin on the seventh day of the capping. This material had a thicker dentin compared to the other biomaterials. The MTA also demonstrated an efficiency in the formation of the dentin bridge; however,

20% of the samples did not observe the presence of reparative dentin. When adding the COP in these materials, the formation of the dentin bridge was heterogeneous and incomplete, in addition these groups contained an increased inflammatory process. The repair dentin of the Ca(OH)_2 group showed a tunnel with a heterogeneous characteristic. The addition of COP to Ca(OH)_2 increased dentin formation in the walls around the pulp chamber in 80% of the samples, but this dentin did not show improvement in quality. Thus, pulp cap with COP isolated or associated with Ca(OH)_2 , MTA and BIODENTINE did not form a complete and homogeneous dentin bridge at the site of pulp exposure.

Keywords: Dentino-pulp complex. Pulp regeneration. Pulpal capping. Oil-resin of copaiba. Micro CT.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1	Mesa de trabalho ilustrando a forma de contenção do rato Wistar para a realização do procedimento odontológico.....	55
Figura 4.2	Exposição pulpar nos molares superiores.....	56
Figura 4.3	Sequência do preparo das peças: fixação, desidratação e corte. A- Fixação das peças com formol 10%. B- Descalcificação das peças com EDTA 10%. C- Maxila D- Mandíbula. E- Corte longitudinal da maxila. F- Corte longitudinal na região dos dentes.....	59
Figura 4.4	Microtomógrafo de raios-X SkyScan.....	64
Figura 4.5	Posicionamento dos espécimes no suporte do Micro CT.....	65
Figura 4.6	Digitalização das peças em 3D.....	65
Figura 4.7	Imagem inicial no programa CTAn.....	66
Figura 4.8	Seleção do dente correspondente a cada grupo no programa CTAn	66
Figura 4.9	Seleção da região de interesse (ROI) contemplando material, dentina, polpa.....	67
Figura 4.10	Volume de interesse (VOI) contemplando material, dentina, polpa...	67
Figura 4.11	A- Imagem original do ROI (material, dentina, polpa). B e C- Imagem binária correspondente ao material e material + dentina respectivamente; ao lado apresenta um histograma com intervalo de densidade necessária para binarizar o material obturador e dentina. D- Imagem do ROI para análise.....	68
Figura 4.12	Ferramenta <i>custom processing</i> com <i>plug-ins</i> para criação de lista de tarefas (<i>Task lists</i>).....	68
Figura 4.13	Primeira lista de tarefas (<i>Task list</i>).....	69
Figura 4.14	A- Imagem original do ROI. B- Imagem demonstrando ROI XOR material+ dentina, ou seja, ROI menos material+dentina	69
Figura 4.15	Segunda lista de tarefas (<i>Task list</i>)	70
Figura 4.16	Segunda análise. A- Azul representa a polpa. B- Imagem da dentina e polpa. C- Imagem demonstrando ROI XOR polpa, ou seja, ROI menos a polpa. Imagem da dentina	70

Figura 5.1	Fotomicrografias dos espécimes do grupo SEM MATERIAL. A: período de 7 dias, necrose parcial no tecido pulpar. B: período de 14 dias, necrose total no tecido pulpar da câmara pulpar. C: período de 28 dias, necrose total.....	85
Figura 5.2	Fotomicrografias dos espécimes do grupo óleo-resina de copaíba (COP). A: No 7º dia, foi demonstrado necrose parcial com ausência de formação de ponte dentinária. B: período de 14 dias, necrose parcial, moderado processo inflamatório e deposição dentina na parede lateral da câmara pulpar. C: período de 28 dias, vitalidade pulpar em alguns cornos, com pequena deposição dentina abaixo da exposição pulpar; porém na maioria dos casos apresentou necrose parcial.....	86
Figura 5.3	Fotomicrografias dos espécimes do grupo hidróxido de cálcio isolado [Ca(OH) ₂]. A: No 7º dia, foi demonstrado pequenas áreas de deposição de tecido mineralizado abaixo da exposição pulpar B: período de 14 dias, necrose e formação de tecido dentinário incompleto na área de exposição pulpar. C: período de 28 dias, necrose parcial e formação de tecido dentinário na área de exposição pulpar.....	87
Figura 5.4	Figura 5.4- Fotomicrografias dos espécimes do grupo hidróxido de cálcio associado ao óleo-resina de copaíba [Ca(OH) ₂ +COP]. A: período de 7 dias foi possível observar uma necrose parcial do tecido pulpar sem formação da ponte dentinária. B: período de 14 dias, necrose parcial e presença de fibrose. C: período de 28 dias, necrose parcial.....	88
Figura 5.5	Fotomicrografias dos espécimes do grupo agregado de trióxido mineral (MTA). A: período de 7 dias observa necrose parcial e formação irregular de tecido dentinário no local da exposição pulpar. B: período de 14 dias, necrose parcial e deposição irregular de dentina terciária. C: período de 28 dias, o espécime apresentou vitalidade pulpar; deposição lateral de dentina terciária e ponte dentinária completa.....	89
Figura 5.6	Fotomicrografias dos espécimes do grupo agregado de trióxido mineral associado ao óleo-resina de copaíba (MTA+COP). A: período de 7 dias foi demonstrado necrose parcial e deposição irregular de tecido duro. B: período de 14 dias apresentou necrose parcial com processos inflamatórios moderado, deposição de tecido duro de maneira irregular no interior da câmara pulpar. C: período de 28 dias, demonstrou necrose parcial com deposição de tecido duro irregular.....	90
Figura 5.7	Fotomicrografias dos espécimes do grupo BIODENTINA. A: período de 7 dias foi demonstrado vitalidade pulpar e uma ponte dentinária com pequena área de comunicação do material capeador com a polpa. B: período de 14 dias, vitalidade pulpar e uma ponte	

	dentinária aparentemente completa no local da exposição pulpar. C: período de 28 dias, vitalidade pulpar e uma ponte dentinária completa e espessa.....	91
Figura 5.8	Fotomicrografias dos espécimes do grupo BIODENTINA associado ao óleo-resina de copaíba (BIODENTINA+COP). A: período de 7 dias apresentou moderado processo inflamatório com uma pequena formação irregular de tecido duro abaixo da exposição pulpar. B: período de 14 dias, observou uma necrose parcial do tipo coagulativa e uma formação irregular de tecido duro. C: período de 28 dias, deposição de tecido duro no local da exposição pulpar.....	92
Figura 5.9	A- Grupo SEM MATERIAL. B- Grupo COP. C- Grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$. D- Grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +COP. E- Grupo MTA. F- Grupo MTA+COP. G- Grupo BIODENTINA. H- Grupo BIODENTINA+COP.....	121

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1	Gráficos referentes ao índice de necrose do grupo de 7 dias.....	94
Gráfico 5.2	Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Inflamação Crônica) com nível de significância de $p < 0,05$	95
Gráfico 5.3	Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Edema) com nível de significância de $p < 0,05$	96
Gráfico 5.4	Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Exsudato Purulento) com nível de significância de $p < 0,05$	97
Gráfico 5.5	Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Fibrose) com nível de significância de $p < 0,05$	98
Gráfico 5.6	Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Material Eosinófilo) com nível de significância de $p < 0,05$	99
Gráfico 5.7	Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Proliferação Fibroblástica) com nível de significância de $p < 0,05$	100
Gráfico 5.8	Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Ponte de dentina - localização) com nível de significância de $p < 0,05$	101
Gráfico 5.9	Gráficos referentes aos grupos de 14 dias (Inflamação Aguda) com nível de significância de $p < 0,05$	103
Gráfico 5.10	Gráficos referentes aos grupos de 14 dias (Inflamação Crônica) com nível de significância de $p < 0,05$	104
Gráfico 5.11	Gráficos referentes aos grupos de 14 dias (Edema) com nível de significância de $p < 0,05$	105
Gráfico 5.12	Gráficos referentes aos grupos de 14 dias (Uniformidade da Camada de Odontoblastos) com nível de significância de $p < 0,05$	106
Gráfico 5.13	Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Edema) com nível de significância de $p < 0,05$	108
Gráfico 5.14	Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Bactéria) com nível de significância de $p < 0,05$	109
Gráfico 5.15	Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Uniformidade da Camada de Odontoblastos) com nível de significância de $p < 0,05$	110

Gráfico 5.16	Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Ponte de dentina - morfologia) com nível de significância de $p < 0,05$	111
Gráfico 5.17	Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Ponte de dentina - continuidade) com nível de significância de $p < 0,05$	112
Gráfico 5.18	Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Ponte de dentina - espessura) com nível de significância de $p < 0,05$	113
Gráfico 5.19	Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Ponte de dentina - localização) com nível de significância de $p < 0,05$	114
Gráfico 5.20	Gráficos referentes ao processo inflamatório, comparando 14 e 28 dias, com nível de significância de $p < 0,05$	116
Gráfico 5.21	Gráficos referentes a presença e ausência de necrose nos grupos dos materiais, comparando os grupos de 14 e 28 dias.....	117
Gráfico 5.22	Gráficos referentes a formação de ponte dentinária, comparando 14 e 28 dias, com nível de significância de $p < 0,05$	118
Gráfico 5.23	Análise da superfície (mm^2) de dentina formada pelos materiais analisados, com nível de significância de $p < 0,05$	119
Gráfico 5.24	Análise do volume (mm^3) de dentina formada pelos materiais analisados, com nível de significância de $p < 0,05$	120

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1	Divisão dos grupos, Biodentina, tempo experimental, número de animais.....	57
Quadro 4.2	Concentração utilizado na hematoxilina.....	60
Quadro 4.3	Concentração utilizado na eosina	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Superfície da dentina (mm^2) avaliada após 28 dias de exposição pulpar e inserção dos materiais avaliados (médias e desvios-padrão).....	119
Tabela 5.2	Volume da dentina (mm^3) avaliada após 28 dias de exposição pulpar e inserção dos materiais avaliados (médias e desvios-padrão).....	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Acetoneto de Fluocinolona
ALP	Do inglês <i>alkaline phosphatase</i> (fosfatase alcalina)
BGLAP	Do inglês <i>bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein</i> (osteocalcina)
BSP	Do inglês <i>bone matrix protein 1</i> (proteína da matriz óssea 1)
Ca(OH) ₂	Hidróxido de Cálcio
CaSR	Receptores Sensíveis ao Cálcio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CPFA	Acetoneto de Fluocinolona
COP	Óleo de Copaíba
CTAN	Do inglês CT-Analyser (análise computadorizada)
DBCA	Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos
DMP-1	Do inglês <i>dentin matrix protein 1</i> (proteína da matriz dentinária 1)
DPP	Do inglês <i>dentin phosphoprotein</i> (fosfoproteína dentinária)
DSPP	Do inglês <i>dentin sialophosphoprotein</i> (sialofosfoproteína dentinária)
EDTA	Do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Do inglês US Food and Drug Administration (Administração de droga e alimento da US)
HE	Hematoxilina e eosina
micro-CT	Tomografia microcomputadorizada
3D	Três dimensões
MMPs	Metaloproteinases
MTA	Agregado Trióxido Mineral
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPN	Osteopontina
pH	Potencial Hidrogeniônico

RGD	tripeptídeo-Argenina-Glicina-Aspartato
ROI	Região de interesse
RUNX-2	Do inglês <i>runt-related transcription factor 2</i> (fator de transcrição relacionados com Runt 2)
SIBLINGS	Proteínas da matriz extracelular fosforilada
sp.	Abreviatura científica para espécie.
S. mutans	<i>Streptococcus mutans</i>
S. sanguinis	<i>Streptococcus sanguinis</i>
TGF- β 1	Do inglês <i>Transforming growth factor beta 1</i> (Fator de crescimento β 1)
TOP	Imagem inicial
USP	Universidade de São Paulo
XOR	Subtração de imagens
α -TCP	Cimento α -tricálcio-fosfato

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{2+}	Íon cálcio
OH^-	Radical hidroxila
SiO_2	Óxido de silício
CaO_2	Óxido de cálcio
MgO	Óxido de magnésio
K_2SO_4	Sulfato de potássio
Na_2SO_4	Sulfato de sódio
CaCl_2	Cloreto de cálcio
β	Alfabeto grego beta
α	Alfabeto grego alfa
$\mu\text{mol/L}$	Micromol por litro
$\mu\text{mol/L/mm}^2$	Micromol por litro por milímetro quadrado
μl	Mitrolitro
g	Grama
$^\circ\text{C}$	Graus Celsius
min	Minuto
kV	Quilovolt
mA	Miliampere
μm	Micrômetro
mm	Milímetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	30
2.1	Complexo dentino-pulpar.....	30
2.2	Marcadores de diferenciação odontogênica.....	33
2.3	Processos inflamatórios.....	35
2.4	Capeamento pulpar.....	37
2.5	Biomateriais testados para o capeamento pulpar.....	38
2.5.1	Hidróxido de Cálcio $[Ca(OH)_2]$	39
2.5.2	Agregado Trióxido Mineral (MTA).....	40
2.5.3	Biodentina (Biodentine®).....	42
2.5.4	Agregado Trióxido Mineral (MTA) e Hidróxido de Cálcio $[Ca(OH)_2]$	44
2.5.5	Biodentina e Agregado Trióxido Mineral (MTA).....	46
2.5.6	Outros Biomateriais testados para o capeamento pulpar direto.	47
2.6	Óleo-resina de Copaíba (COP).....	49
3	PROPOSIÇÃO.....	53
4	MATERIAL E MÉTODO.....	54
4.1	Preparo das substâncias.....	54
4.2	Preparo dos animais.....	55
4.3	Procedimentos experimentais.....	55
4.4	Grupos experimentais.....	56
4.5	Análise morfológica.....	58
4.6	Microtomografia computadorizada (micro-CT) de alta resolução.....	64
4.7	Metodologia de avaliação.....	66
4.8	Análise Estatística.....	70
5	RESULTADOS.....	71
5.1	Análise morfológica descritiva.....	71
5.1.1	Análise morfológica descritiva – 7 dias.....	71
5.1.1.1	SEM MATERIAL – Controle.....	71

5.1.1.2	COP.....	71
5.1.1.3	Ca(OH) ₂	72
5.1.1.4	Ca(OH) ₂ +COP.....	72
5.1.1.5	MTA.....	72
5.1.1.6	MTA+COP.....	73
5.1.1.7	Biodentina.....	73
5.1.1.8	Biodentina+COP.....	74
5.1.2	Análise morfológica descritiva – 14 dias.....	74
5.1.2.1	SEM MATERIAL – Controle.....	74
5.1.2.2	COP.....	74
5.1.2.3	Ca(OH) ₂	75
5.1.2.4	Ca(OH) ₂ +COP.....	76
5.1.2.5	MTA.....	77
5.1.2.6	MTA+COP.....	77
5.1.2.7	BIODENTINA.....	78
5.1.2.8	BIODENTINA+COP.....	79
5.1.3	Análise morfológica descritiva – 28 dias.....	79
5.1.3.1	SEM MATERIAL – Controle.....	79
5.1.3.2	COP.....	80
5.1.3.3	Ca(OH) ₂	80
5.1.3.4	Ca(OH) ₂ +COP.....	81
5.1.3.5	MTA.....	82
5.1.3.6	MTA+COP.....	82
5.1.3.7	BIODENTINA.....	83
5.1.3.8	BIODENTINA+COP.....	83
5.2	Análise estatística da microscopia.....	93
5.2.1	7 dias.....	93
5.2.2	14 dias.....	102
5.2.3	28 dias.....	107
5.2.4	Relação dos 14 e 28 dias.....	115
5.3	Microtomografia computadorizada de alta resolução.....	119
5.3.1	Superfície da dentina.....	119
5.3.2	Volume da dentina.....	120

6	DISCUSSÃO.....	123
7	CONCLUSÕES.....	132
	REFERÊNCIAS.....	133
	ANEXOS.....	157

1 INTRODUÇÃO

O objetivo da Odontologia Restauradora Conservadora é restabelecer a forma e a função dos dentes preservando os tecidos dentais e a vitalidade do complexo dentino-pulpar. Neste sentido, existe no mercado uma variedade de materiais restauradores que apresentam, como ação principal, paralisar o processo carioso, permitindo desse modo a recuperação do órgão pulpar e a reconstrução da estrutura dental perdida. Entretanto, ainda não há um material restaurador ideal capaz de reproduzir características físicas e químicas do tecido dental sadio e que mantenha a vitalidade pulpar. Além do mais, grande parte dos materiais odontológicos atuais apresenta vida útil curta e precisam ser constantemente reparados ou substituídos. Por isso inúmeras pesquisas na área têm sido conduzidas na busca por materiais capazes de não só restaurar, mas também reestruturar o complexo dentino-pulpar.

Desta forma, quando a vitalidade desse complexo é comprometida por lesões de cáries profundas, primeiramente, deve realizar exame clínico com os testes de sensibilidade (teste quente e frio, precursão vertical e horizontal) para diagnosticar se a polpa está em estado que possa se realizar procedimentos restauradores associados ao capeamento pulpar indireto ou direto da dentina injuriada. Em um capeamento pulpar direto, a polpa exposta é diretamente protegida com uma substância biocompatível para dar a este tecido a oportunidade de formar uma dentina reparadora a fim de manter a vitalidade do dente. Assim, os materiais utilizados para este fim devem apresentar propriedades biológicas favoráveis, preservando a viabilidade das células pulpares e estimulando o recrutamento de células progenitoras (indiferenciadas) ao local da injúria com o objetivo de formar apatita e fornecer um selamento biológico. Portanto, estes materiais devem apresentar algumas características importantes: 1) capacidade de controle da infecção e da inflamação do tecido; 2) adesividade à dentina; 3) ser de fácil manipulação; 4) promover formação de dentina reparadora; e 5) ser biocompatível.

Até o momento, um grande número de materiais bioativos têm sido avaliados, sem contudo, encontrar um que apresente todas as características listadas anteriormente.

O material de eleição mais indicado e utilizado para a proteção do complexo dentino-pulpar é o hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ devido suas características

bioestimuladoras. Outro material utilizado para esse fim é o agregado trióxido mineral (MTA) que atua de forma muito semelhante ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$, mas ao contrário deste, toma presa. A segunda geração de materiais à base de silicato de cálcio também tem sido indicada como capeador pulpar direto. Nesse grupo, destaca-se a Biodentina que possui capacidade de promover proliferação celular e biomineralização.

O $\text{Ca}(\text{OH})_2$ apresenta atividade antibacteriana, devido ao seu elevado pH (pH=12,5). Entretanto, a alcalinidade estimulada por esse produto é diminuída após algum tempo depois de sua inserção, além disso é facilmente dissolvido pelos fluidos dos túbulos dentinários deixando espaço o que favorece a microinfiltração bacteriana, seguida de pulpite irreversível e necrose pulpar. No tecido pulpar, o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ induz a formação de uma zona de necrose por coagulação, saturada de íons de cálcio, adquirindo assim a capacidade de formar barreira de tecido mineralizado (dentina reparadora).

O MTA é um material bioativo que, além da atividade antimicrobiana, promove um ambiente ideal para a regeneração pulpar. Além disso, estudos mostram que o MTA tem capacidade de induzir o processo de osteogênese e formação de tecidos duros.

A Biodentina apresenta biocompatibilidade, habilidade de induzir as células pulpares ao processo de diferenciação osteogênica e mineralização. Ademais, este material pode formar uma ponte dentinária homogênea no local da exposição pulpar, semelhante ao MTA.

Estudos mostram que outros materiais e estratégias tem aumentado a eficiência do capeamento pulpar direto através da formação da ponte de dentina reparativa com nenhum efeito químico tóxico, proporcionando, assim, melhores resultados do que os fornecidos pelo $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Um dos materiais que tem sido indicado como anti-inflamatório no processo de regeneração tecidual é o Óleo de Copaíba (COP). Esse produto, uma resina extraída do tronco de árvores do gênero *Copaifera* sp., tem sido utilizado rotineiramente pela população amazônica, devido às suas propriedades medicinais como ação antisséptica e analgésica.

O COP apresenta *in vitro* funções celulares como proliferação, migração e diferenciação de células tronco de polpas dentárias humanas e quando utilizado em meios condicionados por $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou MTA melhora as propriedades destes materiais.

Mediante o exposto, este trabalho de pesquisa translacional tem como objetivo analisar o efeito da aplicação direta destes materiais capeadores à base de Óleo de Copaíba sobre a polpa dentária murina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Complexo dentino-pulpar

A dentina e a polpa são estruturas que se apresentam intimamente relacionadas, desde a formação até o dente completamente formado, constituindo o complexo dentino-pulpar (Harada et al., 2008).

A dentina apresenta características distintas do tecido pulpar (Hebling et al., 2010), apesar de apresentar a mesma origem embriológica e permanecerem interligadas durante toda a vida funcional do dente. Esse complexo dentino-pulpar faz com que toda a agressão à dentina atinja instantaneamente o tecido pulpar (Hebling et al., 2010; Huang, 2011).

O tecido dentinário é mineralizado, avascular, permeado por túbulos dentinários. Essa estrutura é composta por 70% de componentes inorgânicos, principalmente de cristais de apatita; 20% de componentes orgânicos, particularmente de colágeno do tipo I; e 10% de água que compõem o fluído localizado no interior dos túbulos dentinários (Marshall et al., 1997; Goldberg et al., 2011). Ainda que o colágeno seja a proteína mais abundante na dentina (90%), proteínas não colagenosas também podem ser encontradas e exercem funções biológicas importantes na resposta do complexo dentino-pulpar frente a agentes agressores como a cárie dentária (Goldberg et al., 2011).

Esse tecido encontra-se subjacente ao esmalte dentário e representa a maior porção do dente. A dentina é composta por microtúbulos com diâmetro entre 1 e 2 μm rodeados por uma camada hipermineralizada e escassa de colágeno denominada de dentina peritubular, e composta por uma matriz intertubular cujo material orgânico é mais concentrado (Marshall et al., 1997; Bertassoni et al., 2012).

A dentina peritubular é formada durante toda a vida do dente, motivo pelo qual pode aumentar, devido a alguns estímulos (atrição) e a idade do paciente, com consequente obliteração das extremidades dos túbulos dentinários (Bertassoni et al., 2012).

A matriz intertubular é composta de fibrilas de colágeno tipo I associadas a proteínas não colágenas e proteoglicanas, que formam uma rede orgânica tridimensional, reforçada por cristais de apatita (Marshall et al., 1997).

O tecido dentinário também apresenta no seu interior collagenases e gelatinases que compõem a família das metaloproteinases (MMPs) que são enzimas responsáveis pela degradação das fibras colágenas (Mazzoni et al., 2011).

A dentina contém uma camada não mineralizada que se mantém no dente adulto e separa os odontoblastos da dentina mineralizada (Pré-dentina). Essa camada impede o contato entre a dentina mineralizada e o tecido pulpar, evitando-se a reabsorção desse tecido (Cate, 2008; Hebling et al., 2010).

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado e innervado (Tziafas et al., 2000). Esse tecido é constituído por 25% de matéria orgânica (células e matriz extracelular) e 25% de água (Cate, 2008; Hebling et al., 2010). Na camada periférica, junção entre a polpa e a pré-dentina, estão localizados os odontoblastos cuja função biológica é a dentinogênese (Tziafas et al., 2000). A preservação deles é importante para a manutenção da integridade biológica e física do complexo dentino-pulpar (Hebling et al., 2010).

Na região subodontoblástica, logo abaixo dos odontoblastos, encontram-se duas zonas: uma mais periférica, caracterizada por ser uma região pobre em células e na qual se observam vasos e fibras nervosas (Zona Acelular de Weil); a outra, subjacente à anterior, apresenta inúmeras células principalmente as indiferenciadas (Zona Rica em Células). A região central da polpa é formada por tecido conjuntivo frouxo (Tziafas et al., 2000; Mjör et al., 2001; Cate, 2008; Hebling et al., 2010), inúmeros fibroblastos e algumas células mesenquimais indiferenciadas (Mjör et al., 2001; Hebling et al., 2010). Ao redor dos vasos sanguíneos e linfáticos existem células endoteliais, perivasculares e neurais, macrófagos, linfócitos T, fibras colágenas e elásticas imersas em uma matriz extracelular (MEC) (Mjör et al., 2001; Hebling et al., 2010).

A MEC do tecido pulpar é composta por macromoléculas como glicoproteínas, glicosaminoglicanas (sulfato de condroitina, sulfato de heparina, sulfato de queratina e ácido hialurônico), fibronectina (glicoproteína de adesão) e as metaloproteinases (MMPs) (Tziafas et al., 2000; Mjör et al., 2001; Hebling et al., 2010), que são importantes para a formação da dentina ao redor da polpa.

Essa matriz apresenta uma estrutura complexa formada por proteínas secretadas e glicoconjugados que interagem tridimensionalmente e formam uma rede capaz de regular funções celulares como diferenciação e a expressão de genes específicos em cada tecido. Além disso, esta estrutura participa de eventos celulares como adesão, migração, proliferação, diferenciação celular, apoptose e angiogênese (Goldberg; Smith, 2004).

A cárie dentária e os danos traumáticos são as principais ameaças ao tecido pulpar (Tziafas; Kodonas, 2010; Smith et al., 2012). A resposta do complexo dentino-pulpar dependerá do tipo e da intensidade dessa injúria. Nos casos dos danos de pequena extensão e intensidade, sem destruição dos odontoblastos locais, é formada uma camada de dentina reacional (odontoblastos pós-mitóticos tentam produzir uma barreira para evitar a agressão pulpar). Já nas injúrias de grandes extensões ou intensidade, com exposição pulpar, geralmente a camada odontoblástica subjacente é destruída e há estímulo para que células indiferenciadas iniciem o processo de proliferação, diferenciação e migração, a fim de produzir uma dentina reparativa (dentina formada por nova geração de células odontoblásticas, diferenciadas de uma população de células progenitoras/células tronco) que, na maioria das vezes, origina um tecido do tipo osteóide (Tziafas; Kodonas, 2010; Smith et al., 2012). Vale ressaltar que essa dentina reparadora pode ser formada desde que o agente agressor não exceda a capacidade de reparo da polpa (Huang, 2011).

Após a remoção do agente agressor, a proteção do complexo dentino-pulpar deve ser realizada pela aplicação de uma ou mais camadas de material capeador antes da restauração propriamente dita. Dessa maneira, diminui-se a possibilidade de contaminação do tecido pulpar, principalmente pela toxicidade de alguns materiais restauradores ou pela reinfilhação de bactérias (Cohenca et al., 2013).

Estudo realizado por Harada et al. (2008) em molares de ratos demonstrou que células indiferenciadas localizadas na camada subodontoblástica migraram e se diferenciaram em novas células do tipo símile, compensando a camada odontoblástica perdida após o preparo cavitários. Posteriormente, a reorganização da polpa dentária foi concluída pela proliferação das células mesenquimais presentes na polpa (Harada et al., 2008).

Desde modo, a proteção do complexo dentino-pulpar visa à formação de uma ponte de dentina (Dentina Reparativa) que se caracteriza por um evento similar ao observado durante a dentinogênese primária (Goldberg; Smith, 2004).

2.2 Marcadores de diferenciação odontogênica

Visando-se o reparo pulpar, as células-tronco da polpa dentária diferenciam-se em células odontoblastos-*símile*. Estas células expressam colágeno tipo I, colágeno tipo V e macromoléculas não colagenosas como: sialofosfoproteína dentinária (DSPP, do inglês *dentin sialophosphoprotein*), proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1, do inglês *dentin matrix protein 1*), osteocalcina (BGLAP do inglês *bone gamma-carboxyglutamic*), fosfatase alcalina (ALP do inglês *alkaline phosphatase*), proteoglicanas e glicoproteínas. Estes componentes são responsáveis pela mineralização e formação do tecido reparativo (Goldberg et al., 2011; Suzuki et al., 2012).

A proteína DPP (fosfoproteína dentinária, do inglês *dentin phosphophoryn*) é a mais abundante das proteínas não colágenas presentes na dentina. Essa proteína é expressa pelo gene da sialoproteína dentinária (DSPP) encontrado nos odontoblastos (Gu et al., 2000; Wei et al., 2007).

Alguns trabalhos mostraram que a DPP pode atuar como iniciador e modulador para a produção de cristais de hidroxiapatita (Boskey et al., 1990; Saito et al., 2003). Ademais, essa proteína exibiu uma alta capacidade no fechamento da exposição pulpar, induzindo a diferenciação das células mesenquimais humanas em células semelhantes ao odontoblastos (Koike et al., 2014).

A DMP-1 (proteína de matriz dentinária-1) é uma proteína não colágena altamente ácida e fosforilada, presente na matriz da dentina mineralizada (George et al., 1993). Esta proteína estimula o processo de mineralização da dentina devido à sua capacidade de se ligar ao Ca^{2+} , favorecendo a nucleação de cristais de apatita sobre fibrilas do colágeno. A DPM-1 também parece regular o processo de diferenciação celular (Massa et al., 2005). Além disso, o bloqueio dessa proteína interrompeu o processamento de algumas proteínas relacionadas à mineralização como osteocalcina em cultura de osteoblastos (Narayanan et al., 2001).

A osteocalcina (BGLAP) é uma proteína não colágena, secretada na fase final da diferenciação dos osteoblastos. A presença de três resíduos do ácido γ -carboxiglutamato permite com que esta proteína se ligue ao cálcio e, conseqüentemente, à hidroxiapatita. Assim sendo, esta proteína apresenta duas

funções: regula a mineralização óssea e a atividade dos osteoblastos (Neve et al., 2013).

A fosfatase alcalina também está relacionada com a formação de tecido ósseo durante o processo de mineralização. Portanto, essa proteína enriquece o ambiente com fosfato inorgânico e proporciona a nucleação de cristais de hidroxiapatita (Goldberg et al., 2011).

Outra proteína encontrada em muitos tecidos mineralizados é a OPN (osteopontina). Esta proteína apresenta diversas funções que incluem: (1) fixação celular e via de sinalização em sua sequência RGD (tripeptídeo-Argenina-Glicina-Aspartato); (2) regulação da formação e remodelamento do tecido mineralizado; (3) interação com Ca^{2+} , influenciando a conformação proteica da OPN; (4) inibição do crescimento do cristal apatita em osso e dentina; (5) migração celular (Butler; Ritchie, 1995). Assim, é aceitável que a osteopontina apresenta um papel não somente nos estágios iniciais da formação da matriz e/ou calcificação da dentinogênese reparativa, mas também em vários eventos celulares e moleculares, atuando na geração de novas células odontoblásticas, incluindo migração e diferenciação de seus progenitores (Kuratate et al., 2008).

A sialoproteína óssea (BSP) é uma proteína não colagenosa que é capaz de interagir os osteoblastos e osteoclastos com a superfície celular, além de iniciar a formação dos cristais de hidroxiapatita. Esta proteína parece ser restrita ao tecido mineralizado; sendo sintetizada no osso, dentina e cimento (Butler; Ritchie, 1995).

Runx-2 (fator de transcrição relacionados com Runt 2, do inglês *Runt-related transcription factor 2*) é uma proteína que é requerida durante o desenvolvimento do dente, especialmente na diferenciação dos odontoblastos. Deste modo, Runx-2 é importante na determinação da linhagem de odontoblastos e célula odontoblástica derivada do mesênquima (Zanini et al., 2012).

Outras proteínas importantes para a reparação e regeneração pulpar são as proteínas da matriz extracelular fosforilada (SIBLINGs). Essas proteínas são sintetizadas pelos odontoblastos e subjacentes as células Hoehl da polpa dental. As SIBLINGs, como a maioria das proteínas da MEC, estão relacionadas aos processos de mineralização e, conseqüentemente, aos processos de regeneração pulpar (Abd-Elmeguid et al., 2012; Abd-Elmeguid et al., 2013). Em contraste, as MMPs estão relacionadas ao processo catalítico. Elas agem sobre a cadeia procolágena de fibrilação, contribuindo para a clivagem dos propeptídeos amino e carboxil. Em adição,

MMPs desempenham um papel na clivagem da DSPP e DPP (Zheng et al., 2009). Portanto, as duas moléculas proteicas contribuem para a redução do processo inflamatório e mais tarde agindo como um agente de regeneração.

Moléculas da família SIBLINGs, MMPs, mediadores estão envolvidos na formação da ponte de dentina reparativa. Estas moléculas estão implicadas na formação direta da osteo/ortodentina, obliterando a exposição pulpar. Ademais, uma alternativa possível sugere que processos inflamatórios também contribuem para a produção da dentina reparativa; demonstrando a existência de diferentes vias na reparação do tecido dentinário após a exposição pulpar (Goldberg et al., 2015).

2.3 Processos Inflamatórios

A inflamação aguda e imunidade inata, a humoral e a mediada por células proporcionam ao hospedeiro condições necessárias para combater patógenos e promover o processo de reparo (Hargreaves; Goodis, 2009).

O tecido pulpar é constantemente sujeito a impactos ambientais como: toxinas bacterianas, calor, trauma mecânico, materiais restauradores (Chan et al., 2005). Seguindo a essas várias lesões, as células pulpares têm capacidade intrínseca para reparar, diferenciar em odontoblastos e produzir várias proteínas da matriz dentinária (Chan et al., 2005). Desta forma, nem toda reação inflamatória resulta em um perigo permanente.

Em vista de uma série de resultados publicados, o processo inflamatório deveria ser reexaminado (clínico e histológico) para entender os efeitos potenciais e benéficos desse processo (Goldberg et al., 2008). Estes estudos abrem caminhos para o entendimento mais profundo dos eventos moleculares e celulares que levam ao reparo do tecido pulpar, bem como ao desenvolvimento de materiais ideais para promover a reparação e regeneração pulpar (Goldberg et al., 2008). Desta forma, a pulpotomia parcial e total, capeamento pulpar direto e indireto em dentes permanentes imaturos e dentes maduros seriam uma opção de tratamento viável para a reparação do tecido pulpar (Bergenholtz et al., 2013).

A iniciação e a resolução da inflamação aguda e crônica são mediadas pela ativação de monócitos e macrófagos, que são responsáveis pela fagocitose dos agentes patogênicos por meio de receptores especializados (Alongi et al., 2010).

Além dos monócitos e macrófagos, células progenitoras/células tronco (Gonzalez-Mejia; Doseff, 2009) são recrutadas pelo tecido pulpar a fim de promover a recuperação da polpa após a realização de uma pulpotomia ou capeamento pulpar direto (Zhang et al., 2015).

Na polpa inflamada pode ser encontrada vasodilatação dos vasos sanguíneos, fator de crescimento endotelial vascular, e pericistos que podem ser originados de células endoteliais. A presença de vasos aumentados indica aumento da pressão do fluido tecidual; maior fluxo externo de fluido dentinário; e assim aumento da dor (Matthews; Vongsavan, 1994). Ademais esse aumento beneficia a migração celular do sistema imune para o local inflamado contribuindo para o processo de reparo tecidual (Cooper et al., 2010). Neste processo, a neogênese também é requerida para a regeneração e cura, altamente controlada pelo microambiente (Goldberg, 2014). Deste modo, durante o reparo da dentina ocorrem processos inflamatórios e estímulos que são essenciais para a formação do novo tecido mineralizado (Zhai et al., 2013; Le Clerc et al., 2013).

Alguns estudos têm mostrados que os fibroblastos da polpa (Coil et al., 2004; Chan et al., 2005; Briso et al., 2006) e da gengiva (Gutierrez-Venegas et al., 2005; Letzelter et al., 1998) podem secretar muitos tipos de citocina em resposta a vários estímulos; da mesma maneira que os odontoblastos, células endoteliais e células imunes (Durand et al., 2006; Pääkkönen et al., 2007). Algumas citocina apresentam homologia estrutural que estimulam o deslocamento de leucócitos e regulam a migração do sangue para a área inflamada (Nagaoka et al., 1996; Ogura et al., 2005), além de aumentar a deposição de colágeno no tecido pulpar (Barkhordar et al., 2002; Chan et al., 2005). Desta maneira, a síntese de colágeno pelos fibroblastos durante o processo inflamatório é um evento chave para o reparo do tecido pulpar (Chan et al., 2005).

Estudos estão utilizando células tronco da polpa dental humana como modelo para inflamação *in vitro* induzida por *nemosis* (processo de ativação celular e morte em fibroblastos pulpares de humanos). Em resposta a esse processo, a morte celular é acompanhada pela liberação de ciclooxigenase-2 e prostaglandina, que são

enzimas e mediadores biológicos importantes durante o processo inflamatório (Le Clerc et al., 2013).

O modelo suporta que os fibroblastos esferóides e as interações dessas células com as células tronco direcionadas a *nemosis* podem contribuir para o tratamento da inflamação do tecido pulpar. Neste processo, existem migrações celulares que são caracterizadas pelo deslocamento celular da raiz para a câmara pulpar (Le Clerc et al., 2013). Assim sendo, Hirata et al. (2014) relataram que células tronco apicais podem migrar do ápice em direção à coroa, onde a diferenciação de progenitores ocorre, ajudando no processo de reparação do tecido dentário.

2.4 Capeamento pulpar

A resposta da reparação mais visível à exposição pulpar é a deposição da dentina que fornece odontoblastos e outras células pulpares (Franz et al., 1984; Ferracane et al., 2010). A formação da dentina pode ser afetada pelo grau da lesão mecânica, inflamação e infiltração bacteriana, além do tipo de material capeador e material restaurador (Murray et al., 2002).

Desta forma, a dentina reacionária é formada seguindo o capeamento pulpar indireto com cimentos que liberam cálcio e está localizada debaixo de uma linha traumática do cálcio. Esta nova dentina formada aparece como tubular (estrutura ortodentina), ou como atubular com aparência semelhante ao osso (semelhante a estrutura da osteodentina). Ela contém osteócitos aprisionados dentro da lacuna dos osteoblastos, ligados por canalículos finos que são criados e interconectados a rede de osteócitos (Cox et al., 1996).

Entretanto, quando a polpa está totalmente exposta a cavidade bucal, a superfície desse tecido pode ser danificada por injúrias químicas. A fim de evitar possíveis lesões irreversíveis, é realizado o procedimento de capeamento pulpar direto, promovendo migração e diferenciação de células semelhantes aos odontoblastos e, conseqüentemente, induzindo a formação de uma dentina reparadora no local da polpa exposta. Esta pode ser homogênea, conter debris celulares e apresentar túneis que podem criar uma comunicação entre a cavidade e a parte superficial da polpa favorecendo uma recontaminação bacteriana. Muito

provável que isso é a principal causa das falhas do capeamento pulpar depois de um curto período de tempo (Cox et al., 1996).

Diante do exposto, durante uma exposição pulpar os procedimentos de capeamento pulpar direto devem ser realizados imediatamente com o intuito de preservar a vitalidade da polpa e induzir a formação de uma dentina reparadora (Hebling et al., 1999; Parisay et al., 2015); diminuindo a microinfiltração (de bactérias e de produtos tóxicos dos materiais restauradores) e o processo de inflamação pulpar (Delfino et al., 2010).

Dessa maneira, os materiais utilizados para o capeamento devem estimular a formação da dentina, manter a vitalidade pulpar, liberar flúor para prevenir cáries secundárias, aderir a dentina remanescente, aderir ao material restaurador, ser resistente, estéril, radiopaco, fornecer vedamento bacteriano biocompatíveis, fácil manipulação (Cohen; Combe, 1994; Tjaderhane, 2002; Ferracane et al., 2010; Qureshi et al., 2014).

Além disso, existem outros fatores que podem influenciar no reparo dentinário, como: idade do dente, condição periodontal e estágio de formação da raiz. Outros fatores clínicos também devem ser ressaltados: tamanho da exposição, natureza (traumática, mecânica) da lesão e contaminação de microrganismos (Delfino et al., 2010; Qureshi et al., 2014).

Atualmente, nenhum material capeador disponível comercialmente preenche todos os requisitos para um resultado de sucesso, apesar do progresso rápido neste campo (Dominguez et al., 2003; Accorinte et al., 2008; Parirokh et al., 2011; Silva et al., 2015), necessitando de inúmeros estudos para este fim. Assim, é importante ter conhecimento dos potenciais efeitos benéficos da relação entre os materiais de capeamento pulpar direto com o complexo dentino-pulpar para obter resultados mais satisfatórios (Ferracane et al., 2010).

Ressalte-se que os principais materiais a serem utilizados para o capeamento pulpar direto na atualidade são o hidróxido de cálcio $[Ca(OH)_2]$, Agregado de Trióxido Mineral (MTA) (Bakland; Andreasen, 2012) e a Biodentina (Malkondu et al., 2014).

2.5 Biomateriais testados para o capeamento pulpar

2.5.1 Hidróxido de Cálcio [Ca(OH)₂]

Em 1920, Hermann e colaboradores iniciaram as pesquisas que utilizaram o hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂] como capeador pulpar (Mohammadi; Dummer, 2011). Desde então, o Ca(OH)₂ é considerado o material de escolha para o capeamento pulpar direto, estimado como padrão-ouro, quando comparado a novos materiais desenvolvidos para esse mesmo fim (Mohammadi; Dummer, 2011).

O Ca(OH)₂ possui pH elevado, em torno de 12,5 a 12,8, o que permite uma ação bactericida e bacteriostática. Em contato com o tecido pulpar exposto, libera íons de cálcio (Ca²⁺) e hidroxila (OH⁻) que se precipitam sob a forma de carbonato de cálcio, atuando como núcleos de calcificação distrófica (Schroder, 1985; Mohammadi; Dummer, 2011). Esse material permite também a atração de fatores de crescimento (TGF-β), fibronectina e tenascina, que são importantes para a regulação da diferenciação das células odontoblastóides e, conseqüentemente, a formação da dentina terciária (Yoshida et al., 1996; Shiba et al., 1998).

Entretanto, os efeitos benéficos (ação antimicrobiana e aumento de pH) do Ca(OH)₂ são limitados por uma área de necrose, que pode causar ligeira irritação do tecido vital (Kitasako et al., 2008; Bal et al., 2011; Mohamed; Dummer, 2011; Hilton et al., 2013). Entretanto, este efeito necrótico pode estimular a formação de um tecido de reparação no local da lesão (Cooper et al., 2010).

No trabalho *in vivo* realizado por Demarco et al. (2001) foi observado que o hidróxido de cálcio produziu ponte dentinária sem a presença de uma resposta inflamatória e apresentou uma baixa citotoxicidade *in vitro* quando comparado com dois adesivos dentinários (*Clearfil Liner Bond 2*, *Scotchbond Multi-Purpose Plus*). O Ca(OH)₂ também foi capaz de produzir um tecido mineralizado que expressou importantes marcadores odontogênicos como o sialofosfoproteína e a osteopontina (Tran et al., 2012).

Assim, o mecanismo do hidróxido de cálcio Ca(OH)₂ implica em um aumento do pH (alcalino) produzindo uma necrose superficial por coagulação das proteínas (Schroder, 1985). A presença dos íons de cálcio estimula a precipitação do carbonato de cálcio na área da exposição e, assim, contribui para o início da mineralização. Então, a diferenciação das células pulpares ocorre; células apresentam características

fenotípicas semelhantes as células odontoblastos e forma uma matriz rica em colágeno semelhante a dentina e a pré-dentina (Goldberg et al., 2015).

Em trabalhos clínicos sobre o capeamento pulpar com Ca(OH)_2 ou com seus compósitos revelam que a taxa de sucesso decresce com o aumento do período de acompanhamento. Deste modo, reportam que 1-2 anos depois da terapia pulpar vital, a taxa de sucesso é maior que 90% (Mumaw; Cooper, 1957; Armstrong; Hoffman, 1965; Beetke et al., 1990). Depois de 2-5 anos, as taxas de sucesso decaem para 81,8% a 37% (Horsted et al., 1985; Barthel et al., 2000; Auschill et al., 2003; Al-Hiyasat et al., 2006; Mente et al., 2010). Dez anos após a terapia pulpar com a pasta de Ca(OH)_2 , o resultado do tratamento é considerado um sucesso em somente 13% dos casos (Barthel et al., 2000).

Essa porcentagem pequena de sucesso ocorre devido a presença de algumas desvantagens incluindo inflamação da superfície pulpar e necrose após o capeamento pulpar; a presença de defeitos de túnel na ponte de dentina, que deixa de proporcionar uma vedação hermética provocando uma infecção recorrente; alta solubilidade devido fluídos dentinários; falta de aderência; e degradação ao longo do tempo (Holland et al., 1979; Prosser et al., 1982; Cox et al., 1996; Kitasako et al., 2008; Hilton et al., 2013). Como resultados das desvantagens, vários novos materiais tem sido testado durante as últimas 2 décadas como alternativas para Ca(OH)_2 .

2.5.2 Agregado de Trióxido Mineral (MTA)

O Agregado de Trióxido Mineral (MTA) tem sido investigado para o uso odontológico desde 1990. Apesar disso, seu primeiro relato na literatura foi realizado por Torabinejad et al. (1995) e seu uso em Endodontia foi aprovado pela FDA (US Food and Drug Administration) apenas em 1998 (Naik et al., 2014).

O MTA apresenta consistência forte de partículas hidrofílicas, constituída pelo cimento refinado de Portland e óxido de bismuto. Esse material contém silicato de dicálcio, silicato de tricálcio, aluminato de tricálcio, alumínio férrico tetracálcio e outras partículas menores, como: SiO_2 , CaO_2 , MgO , K_2SO_4 e Na_2SO_4 , que modificam suas propriedades químicas e físicas (Naik et al., 2014).

O MTA apresenta pH de 12,5, similar ao do hidróxido de cálcio, o que lhe confere também propriedades antimicrobianas (Naik et al., 2014). Diferentemente do que ocorre com o Ca(OH)_2 , esse pH do MTA permanece alto por longo período, assim sua atividade antimicrobiana é mantida durante todo processo de reparo tecidual (Torabinejad et al., 1995; Chailertvanitkul et al., 2014). Adicionalmente, o material não sofre dissolução como o Ca(OH)_2 (Torabinejad et al., 1995; Chailertvanitkul et al., 2014). Esse produto também tem a capacidade de induzir a diferenciação de células progenitoras que expressam receptores sensíveis ao cálcio (CaSR) e proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2) (Baek et al., 2005; Maeda et al., 2010).

Estudos tem reportado que o MTA apresenta boas características físicas e excelente adaptação marginal (Torabinejad et al., 1995; Chailertvanitkul et al., 2014), além de ser biocompatível (Kettering; Torabinejad, 1995) e promover a proliferação das células pulpares (Moghaddame-Jafari et al., 2005; Couto, 2013). O MTA também estimula inúmeros tipos celulares, tal como fibroblastos e células semelhantes a osteoblastos, além de induzirem a expressão de gene de proteínas relacionadas à dentinogênese como: osteopontina, osteonectina, osteocalcina (Nakayama et al., 2005; Tani-Ishii et al., 2007; Kuratate et al., 2008).

Apesar disso, o MTA apresenta algumas desvantagens, tais como: tempo de presa prolongado, dificuldade de manipulação e alteração de cor dentária (Parirokh; Torabinejad, 2010). Assim, muitas tentativas têm sido feitas para melhorar o gerenciamento clínico do MTA como a adição de um acelerador de presa ou modificador funcional dual (Bortoluzzi et al., 2008; Villat et al., 2010). Por conseguinte, a adição de cloreto de cálcio ao MTA permitiu um aumento do pH imediato e uma diminuição do tempo de presa, além de melhorar as suas propriedades mecânicas (Bortoluzzi et al., 2008; Villat et al., 2010; Parirokh et al., 2011).

Existe no mercado o MTA branco e o MTA cinza, sendo que o MTA branco foi introduzido no intuito de reduzir a pigmentação de estruturas dentárias causadas pelo MTA cinza. A diferença entre essas duas formas do MTA tem sido reportada estar nas concentrações do alumínio, magnésio e compostos de ferro. O MTA branco não apresenta a fase do alumínio férrico que dá a cor cinza ao MTA (Asgary et al., 2005).

Estes dois tipos de MTA são biocompatíveis ao tecido pulpar (Holland et al., 2002; Bidar et al., 2011) e promovem uma redução no crescimento celular após 28 dias de sua inserção (Camilleri et al., 2004). Ademais, esses materiais não

apresentaram diferenças no nível de secreção da interleucina 1 β , que é uma citocina envolvida nas reações inflamatórias dos tecidos periapical e pulpar (Bidar et al., 2011).

O cimento Portland tem sido introduzido com propriedades similares ao MTA. Tem sido notado nenhuma diferença nos efeitos biológicos do MTA e no cimento de Portland em termos de inflamação, necrose pulpar, formação de tecido fibroso e duro (Bidar et al., 2014). No entanto, as duas substâncias não são exatamente as mesmas (Saidon et al., 2003; Kaup et al., 2015); MTA contem menos quantidade de gipso do que o Portland, que é composto de partículas menores e incorporado ao óxido de bismuto para aumentar a sua radiopacidade (Kaup et al., 2015).

Desta forma, o mecanismo do MTA implica na formação de uma camada de necrose fina associada a poucas células inflamatórias no tecido pulpar nos momentos iniciais após a sua inserção; no sétimo dia pode ser observado uma formação de barreira dentinária fina; e, no décimo quarto dia, a ponte de dentina apresentava-se totalmente formada com estrutura tubular e células subjacentes, como odontoblastos (Kuratate et al., 2008). Logo, o MTA induziu o reparo do tecido duro, nos casos de exposição pulpar, com uma qualidade melhor e sem presença de túneis quando comparado com o Ca(OH)_2 . No entanto, devido as suas desvantagens, o Ca(OH)_2 tem sido mais utilizado clinicamente (Torabinejad; Parirokh, 2010).

2.5.3 Biodentina (Biodentine®)

A Biodentina (*Septodont, Saint Maur des Fossés, França*) é um novo silicato de cálcio caracterizado como um cimento restaurador com propriedades mecânicas similares a dentina (Laurent et al., 2008; Laurent et al., 2012; Zanini et al., 2012; Raskin et al., 2012; Tran et al., 2012; Koubi et al., 2013). Esse material é constituído pelo cimento baseado no MTA e por substâncias que aumentam algumas de suas propriedades tal como as propriedades físicas (Malkondou et al., 2014).

Este material é composto por uma porção de pó e outra de líquido. O pó consiste em diversas substâncias como: silicato tricálcio, silicato dicálcio, carbonato de cálcio, carga de óxido, óxido de ferro, óxido de zircônia. O líquido, por outro lado, contém cloreto de cálcio como acelerador e polímero hidrossolúvel que serve como um agente redutor em água (Malkondou et al., 2014). Devido à sua consistência

semelhante ao cimento fosfato, a troca de íons é possível (Villat et al., 2010). O cloreto de cálcio acelera a reação de hidratação e o policarboxilato reduz a quantidade de água necessária para misturar, fornecendo consistência adequada, que também contribui para o fácil manuseio da mistura. Carbonato de cálcio no pó atua como uma nucleação na massa hidratante, aumentando a hidratação e tempo de presa mais rápido. As partículas mais finas no pó com áreas superfícies maiores também contribui para o tempo curto de presa: a área específica da superfície de Biodentina foi relatada como sendo cerca de 2,8 vezes mais rápida em comparação com o de MTA branco (Camilleri et al., 2013).

Devido a sua composição, a Biodentina apresenta algumas vantagens em relação ao MTA como: fácil manipulação, melhor selamento marginal, presa rápida, níveis mais baixos de porosidade e estabilidade de cor (Malkondu et al., 2014). Sendo que as propriedades apreciáveis da Biodentina incluem as boas propriedades físicas e sua capacidade de estimular a regeneração dos tecidos, bem como uma boa resposta da polpa (Malkondu et al., 2014). Esse cimento dental pode formar uma camada de dentina em qualquer parte da coroa ou da raiz dentária (Niranjani et al., 2015; Cuadros-Fernandez et al., 2016).

A Biodentina promove um aumento significativo na proliferação, migração e adesão das células tronco, refletindo nas propriedades de bioatividade e biocompatibilidade desse material (Luo et al., 2014). Desta forma, sugere que a Biodentina promove nenhum sinal moderado ou severo na resposta inflamatória pulpar (Chang et al., 2014; Malkondu et al., 2014).

Alguns estudos demonstraram que a Biodentina permite a formação de uma área mineralizada no interior da cavidade cariada. Assim, a Biodentina tem potencial para ser utilizada em cavidade cariada profunda, quer a polpa esteja ou não exposta (Priyalakshmi; Ranjan, 2014; Chang et al., 2014).

Deste modo, a Biodentina é um material que promove a formação de uma ponte dentinária no local da injúria, com baixa porosidade (Tran et al., 2012; Malkondu et al., 2014), com formação de túbulos dentinário (Tran et al., 2012; Malkondu et al., 2014), com a presença de gene de proteínas relacionadas à dentinogênese como: sialoproteína dentinária (DSP), osteopontina (OPN) desde o sétimo dia após a sua inserção (Tran et al., 2012).

A Biodentina pode induzir a mineralização logo após a sua aplicação no local da injúria. O processo da mineralização ocorre na forma de osteodentina,

expressando marcadores de odontoblastos, aumentando a secreção de TGF- β 1 das células pulpare, e, conseqüentemente, iniciando o processo de mineralização (Laurent et al., 2012). Este material possui pH alto como o MTA e o Ca(OH)_2 , causando irritação na área exposta, além de promover efeitos inibitórios sobre o microrganismo. A zona de necrose coagulativa, as vezes presente, pode provocar a divisão e migração de células precursoras na superfície do substrato (Laurent et al., 2012). Logo, a Biodentina induz a aposição da dentina reacionária pela estimulação odontoblástica e pela dentina reparadora por diferenciação celular (Laurent et al., 2012).

De Rossi et al. (2014) demonstraram que a Biodentina é capaz de induzir a formação de uma dentina terciária mais grossa (acima de 0,5mm) quando comparado com o MTA, sendo esta observada pela radiografia periapical primeiro do que no MTA. Adicionalmente, Nowicka et al. (2013) mostraram que a Biodentina tem uma eficácia clínica semelhante ao MTA, podendo ser considerado uma alternativa interessante para esse material já que a Biodentina apresenta vantagens em relação ao MTA como manipulação mais fácil e presa mais rápida.

2.5.4 Agregado de Trióxido Mineral (MTA) e Hidróxido de Cálcio [Ca(OH)_2]

A aplicação de materiais biocompatíveis sobre a polpa exposta protege o complexo dentino-pulpar contra a irritação química durante os procedimentos operatórios, toxicidade do material restaurador, penetração de bactérias (Min et al., 2008; Parirokh et al., 2011; Zarrabi et al., 2011; Laurent et al., 2012; Zanini et al., 2012).

Numerosos estudos tem mostrado que o Ca(OH)_2 deveria ser o material de escolha entre os materiais capeadores (Iwamoto et al., 2006; Qudeimat et al., 2007; Tuna; Olmez, 2008). Entretanto, tem sido reportado que esse material pode formar uma ponte de dentina com defeitos de túneis promovendo a microinfiltração de bactérias e de substâncias tóxicas (Cox et al., 1996; Aeinehchi et al., 2003; Nair et al., 2008; Asgary; Kamrani, 2008).

Contudo, outros trabalhos tem demonstrado que o tecido pulpar responde de maneira favorável ao MTA, depositando barreira completa de tecido mineralizado em

tempo menor e com incrementos maiores de dentina se comparado ao Ca(OH)_2 (Ford et al., 1996; Aeinehchi et al., 2003; Accorinte et al., 2008; Min et al., 2008; Eskandarizadeh et al., 2011; Bakland; Andreasen, 2012). Além disso, esse material apresenta resposta inflamatória mínima e mantém a polpa remanescente com características de normalidade (Tran et al., 2012). Mente et al. (2010) evidenciaram também que o MTA manteve a vitalidade pulpar por mais tempo do que o Ca(OH)_2 na técnica do capeamento pulpar direto.

Como o MTA estimula a formação da dentina mais rápido do que o hidróxido de cálcio (Faraco; Holland, 2001; Accorinte et al., 2008; Min et al., 2008; Nair et al., 2008; Eskandarizadeh et al., 2011), este promove um melhor reparo pulpar resultando em um aumento da taxa de sucesso em procedimentos clínicos (Faraco; Holland, 2001; Asgary; Kamrani, 2008; Accorinte et al., 2008; Zarrabi et al., 2010).

Em alguns estudos foi demonstrado que o índice de sucesso dos tratamentos pulpares com o MTA tem sido superior àqueles realizados com as técnicas à base de hidróxido de cálcio, que giram em torno de 98% e 94-96%, respectivamente (Holland et al., 1999; Tabarsi et al., 2010; Tran et al., 2012). Aguilar e Linsuwanont (2011) também encontraram o mesmo resultado quando compararam clinicamente a taxa de sucesso do capeamento pulpar com Ca(OH)_2 e o MTA.

No estudo de meta-análise cujo objetivo foi avaliar a efetividades dos materiais capeadores pulpares [MTA e Ca(OH)_2] em trabalhos clínicos; foi observado que o MTA teve uma taxa de sucesso maior, apresentando respostas inflamatórias menores e formação da ponte de dentina mais satisfatória do que o Ca(OH)_2 . Concluindo que o MTA poderia ser utilizado como substituto do Ca(OH)_2 (Li et al., 2015).

Ensaio clínico realizado em 229 dentes humanos tratados com capeadores pulpares diretos [MTA e Ca(OH)_2] e avaliados entre 2001 a 2011 (média = 42 meses), observaram que MTA proporciona melhores resultados a longo prazo em comparação com Ca(OH)_2 , isto é, 80,5% de sucesso quando utilizaram o MTA e 59% de sucesso com o Ca(OH)_2 . Sendo que os autores recomendam a colocação de uma restauração permanente imediatamente após o capeamento pulpar direto melhorando o prognóstico do dente (Mente et al., 2014).

Entretanto, no trabalho de Iwamoto et al. (2006), nenhuma diferença significativa em estudos clínicos e histológicos foi encontrada entre o MTA e o Ca(OH)_2 . Este resultado também foi encontrado em dois estudos randomizados que

demonstraram que o MTA e o Ca(OH)_2 apresentaram resultados similares depois da exposição pulpar causado por cáries (Qudeimat et al., 2007; Tuna; Olmez, 2008).

Diante de inúmeros resultados favoráveis, o MTA tem sido recentemente recomendado como um potencial material capeador pulpar, provomendo reparo do complexo dentino-pulpar (Nair et al., 2009; Masuda-Murakami et al., 2010; Parirokh et al., 2011; Al-Hezaimi et al., 2011; Li et al., 2015).

2.5.5 Biodentina e Agregado de Trióxido Mineral (MTA)

Biocompatibilidade e citotoxicidade têm sido levadas em consideração quando o material é utilizado nos casos de perfuração ou reparação, preenchimento retrogrado ou agente de capeamento pulpar, evitando seus efeitos tóxicos ao redor do tecido injuriado. Assim, foi demonstrado que a Biodentina e o MTA apresentam citotoxicidade semelhantes em testes *in vitro* (Zhou et al., 2013). Similarmente, pesquisadores encontraram um padrão similar da expressão da citocina entre a Biodentina e o MTA (Nunez et al., 2014). Adicionalmente a esses dados, os dois materiais também apresentaram uma similaridade na biocompatibilidade e na expressão de alguns genes (Runx-2, osteopontina, colágeno tipo 1 α , fosfatase alcalina) responsáveis pelo processo de regeneração pulpar (Perard et al., 2013).

A Biodentina e o MTA foram capazes de promover a diferenciação odontoblástica e iniciação da mineralização e, conseqüentemente, a formação de dentina reparativa de modo similar. Foi observado também um aumento similar da secreção do TGF- β 1 entre estes dois materiais capeadores (Laurent et al., 2012). Entretanto, a Biodentina mostrou a habilidade de produzir mais cristais de apatita do que o MTA (Han; Okiji, 2013).

Os dois cimentos de tricálcio à base de silicato induziram a formação de dentina terciária no local da exposição pulpar depois de 30 dias da inserção do material. Essa nova dentina apresentava homogenia; ao contrário dos grupos de hidróxido de cálcio cuja a camada continha poros. Porém, nos casos de ápice aberto, foi demonstrado uma reparação inicial melhor no grupo de Biodentina do que no grupo de MTA (Han; Okiji, 2013; Elumalai et al., 2015).

Ao realizar capeamento pulpar direto com MTA e Biodentina em terceiros molares humanos, foi observado uma formação de dentina terciária completa com odontoblastos bem dispostos e ausência de resposta inflamatória pulpar (Nowicka et al., 2013).

Atualmente, foi também demonstrado *in vitro* que não houve diferenças significantes entre os materiais MTA e Biodentina, e ambos induziram de forma semelhante a expressão do gene osteopontina, fosfatase alcalina e Runx-2. *In vivo*, a Biodentina estimulou marcadores de mineralização semelhantes ao MTA, mas a coloração foi mais intensa na polpa dentária radicular e nas pontes dentinárias. Diante desses resultados sugere que a Biodentina é mais vantajosa ao longo do tempo no tratamento de capeamento pulpar direto (Daltoé et al., 2016).

No entanto, estudos adicionais são necessários para determinar qual material seria mais vantajoso em cada tratamento clínico.

2.5.6 Outros Biomateriais testados para o capeamento pulpar direto

Atualmente, tem sido pesquisado inúmeros biomateriais com o intuito de encontrar um material que possa regenerar o complexo dentino-pulpar de maneira mais eficiente, prolongando a vitalidade do dente.

Um dos materiais que tem sido estudado é o Acetoneto de Fluocinolona (AF) que é um corticosteróide sintético comumente usado para a aplicação tópica principalmente nas doenças dermatológicas e lesões vesículo erosivas na cavidade oral (Lozada; Silverman, 1980). Interessantemente, uma ampla variedade de concentração do AF tem efeito na proliferação de alguns tipos celulares, tais como nos fibroblastos da pele e células da polpa dentária (Fisher; Maibach, 1971; Kirk; Mittwoch, 1977; Muincharern et al., 2011). Este efeito é dependente da concentração; alta concentração inibi a atividade mitótica, mas concentração baixa aumenta a atividade levemente (Fisher; Maibach, 1971). Uma concentração específica (0,1-10 $\mu\text{mol/L}$) do AF também pode estimular a matriz extracelular e formação de tecido duro na polpa dental humana (Muincharern et al., 2011).

Recentemente, um novo material para capeamento contendo AF (CPAF) está sendo desenvolvido. Este material é um cimento de hidróxido de cálcio que é capaz

de liberar os íons de hidroxila e apresenta uma concentração específica de AF (0,1-10 $\mu\text{mol/L}$ / mm^2). Quando comparado com MTA e Ca(OH)_2 convencional, foi observado nenhuma diferença significativa nas respostas inflamatórias e na formação da dentina. Porém, após 30 dias, o grupo CPAF apresentou uma diminuição da inflamação em relação ao Ca(OH)_2 . A formação da ponte de dentina foi encontrada em 78%, 63%, 100% nos grupos de Ca(OH)_2 , MTA e CPAF, respectivamente. Assim, este material pode ser utilizado como agente de capeamento pulpar em polpas inflamadas (Louwakul; Lertchirakarn, 2015).

O cimento α -tricálcio-fosfato (α -TCP) de endurecimento rápido foi desenvolvido na Coreia para ser utilizado em procedimentos de capeamento pulpar direto. Quando comparado com o MTA foi observado que estes dois materiais apresentam odontogenicidade similar tanto *in vitro* quanto *in vivo*, enquanto que o α -TCP apresenta um tempo de presa mais rápido. Entretanto, α -TCP apresenta propriedades físicas inferiores incluindo solubilidade e resistência a compressão em relação ao MTA. Sendo necessário estudos clínicos de longo prazo para o uso desse material (Lee et al., 2014).

Como visto, o MTA (*ProRoot MTA*; *Dentsply*, Tulsa) apresenta resultados notáveis ao ser utilizado como capeador pulpar direto (Parirokh; Torabinejad, 2010; Torabinejad; Parirokh, 2010; Hilton et al., 2013; Choi et al., 2013; Mente et al., 2014; Yoo et al., 2014). Entretanto, este material apresenta muitas limitações, tornando-o pouco utilizado nestes procedimentos (Parirokh; Torabinejad, 2010; Choi et al., 2013; Jang et al., 2013). Por estas razões, recentemente foi introduzido o MTA baseado em pozolan de presa rápida (*Endocem*; Maruchi, Wonju, Coreia) que está ganhando atenção como uma alternativa de material capeador devido a sua manipulação, presa rápida, respostas biológicas aceitáveis (Choi et al., 2013; Jang et al., 2013). No estudo randomizado em que analisou a utilização do *Pro-Root MTA* e *Endocem* em humanos maiores de 19 anos, observou-se que esses materiais exibiram uma similaridade de sucesso como capeador pulpar direto até um ano após o tratamento. Entretanto, os dentes restaurados com cavidades classe V apresentaram uma taxa de sucesso menor quando comparados aos dentes restaurados em outras classes (Jang et al., 2015). Diante desse resultado, são necessários outros estudos sobre este material para que possa justificar a substituição do *Pro-Root MTA*.

O *iRoot BP Plus* (*Innovative Bioceramix Inc*, Vancouver, Canadá) é um recém material desenvolvido da cerâmica bioativa à base de silicato de cálcio. Este material

apresenta em forma de massa de vidraceiro branco. *iRoot BP Plus* não somente exibe biocompatibilidade satisfatória (Al Anezi et al., 2010; Ma et al., 2011; Hirschman et al., 2012), habilidade de selamento (Nair et al., 2011), e atividade antimicrobiana (Lovato; Sedgley, 2011), mas também regula a expressão de genes relacionados com a mineralização (Zhang et al., 2010; Zhang et al., 2013).

Em um trabalho *in vivo* foi demonstrado que o *iRoot BP Plus* pode induzir a formação da ponte de dentina reparativa. Esta capacidade indutora desse material foi observada mais cedo e mais fortemente do que o MTA. Além do mais, os locais da polpa exposta tratados com *iRoot BP Plus* e MTA exibiram respostas inflamatórias similares uma semana após o capeamento. Assim, uma camada recém-formada de dentina foi observada após quatro semanas em três quartos dos espécimes do grupo MTA e em todas as amostras do grupo *iRoot BP Plus*. A ponte de dentina induzida por esse material apresentava homogênea e sem poros. Diante disso, sugere que *iRoot BP Plus* pode ser utilizado como agente capeador pulpar direto (Liu et al., 2015).

No estudo clínico realizado por Alshwaimi et al. (2016) para avaliar a resposta da polpa dental humana durante um capeamento pulpar direto utilizando a pasta de betametasona / gentamicina e MTA, observou-se que o MTA obteve uma resposta pulpar melhor, com menos inflamação e uma ponte de dentina mais espessa após 8 semanas quando comparado com esta pasta. Este resultado confirma a eficácia do MTA no capeamento pulpar direto. Mais estudos são necessários para avaliar o efeito da biocompatibilidade da pasta de betametasona / gentamicina utilizada para este fim.

Apesar de todos esses trabalhos ainda não se encontrou um material ideal para ser utilizado clinicamente nos procedimentos de capeamento pulpar direto.

2.6 Óleo-resina de copaíba (COP)

O gênero arbóreo *Copaifera*, da família *Caesalpinaceae*, é composto de mais de 30 espécies nativas da América Latina e pode ser encontrado entre Honduras e o sul do Brasil. Dessas, somente nove espécies foram estudadas e comprovaram algum efeito biológico (Leandro et al., 2012).

Pesquisadores apontam sesquiterpenos e diterpenos como os componentes predominantes e responsáveis pela atividade biológica do óleo de copaíba (Veiga

Junior et al., 2007); porém, alguns autores advertem a respeito da citotoxicidade do produto (Montes et al., 2012). Assim, há necessidade de estudos para se descobrir o verdadeiro potencial terapêutico da planta.

No Brasil, essa árvore localiza-se na região Amazônica, e as espécies são conhecidas como “copaibeira” ou “pau d’óleo”. O corte no tronco das árvores fornece uma substância na forma de óleo-resinoso cuja coloração pode variar de amarela a marrom. Esse óleo é empregado industrialmente em vernizes para a restauração de pinturas antigas e como aromatizante em alimentos (Veiga Junior; Pinto, 2002). Tal substância é empregada também, na medicina popular, tanto em administração oral quanto tópica, como anti-inflamatório, antisséptico, antitumoral, para tratamento de bronquites e doenças da pele (Veiga Junior et al., 2007).

Uma das áreas em que o uso do COP tem sido estudado é na Odontologia. Várias pesquisas têm demonstrado sua ação antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória nesta área (Bandeira et al., 1999; Pedreira, 2007; Santos et al., 2008; Pieri et al., 2010; Garcia et al., 2011; Lima et al., 2011; Pieri et al., 2012; Dias-da-Silva et al., 2013).

Pesquisadores observaram a superioridade do COP comparado à clorexidina como agente antimicrobiano oral, principalmente contra o *Streptococcus mutans* (Pieri et al., 2010; Pieri et al., 2012). Foi demonstrado também que a COP pode ser utilizado na limpeza de cavidades dentárias com sucesso na redução de bactérias (Bandeira et al., 2016).

No trabalho realizado por Santos et al. (2008) foi observado que óleo de copaíba teve ação antimicrobiana sobre as bactérias Gram-positivas, diminuindo sua viabilidade. Porém, não houve nenhum efeito sobre as bactérias Gram-negativas e leveduras. Além do mais, esses autores demonstraram que o COP promoveu danos à parede celular das bactérias. Esse resultado sugere que o óleo de copaíba pode ser uma substância em potencial para o tratamento de doenças infecciosas.

Além disso, a forma de utilização da copaíba, ou seja, o óleo ou a resina, pode levar a diferentes resultados. Desta forma, atividade antibacteriana contra o *Streptococcus mutans* foi melhor observada com a utilização do óleo de copaíba isolado do que com a resina (Bandeira et al., 1999). O mesmo resultado foi observado por Simões et al. (2016), demonstrando a eficiência do óleo de copaíba sobre inúmeras cepas de *Streptococcus* sp.

O COP também foi utilizado tanto por via oral quanto tópica após extração dental *in vivo*. Os pesquisadores observaram melhora no processo de reparo ósseo alveolar com aumento da formação de trabéculas ósseas. Entretanto, o uso tópico da substância promoveu ulcerações e aumento das células inflamatórias, motivo pelo qual seu uso é limitado (Dias-da-Silva et al., 2013). Adicionado a esses resultados, o uso tópico de COP em úlceras traumáticas no dorso da língua não acelerou o processo de cura oral dessas feridas (Wagner et al., 2017).

Em outro estudo, os pesquisadores utilizaram o COP associado com biovidro e tecido adiposo em defeitos ósseo no maxilar do rato. Os autores demonstraram reparação óssea, embora não sejam estatisticamente significantes em comparação com subgrupos tratados com meloxicam ou controle (Silva et al., 2015).

Outra descoberta do uso do COP, na Odontologia, foi seu efeito antitumoral em pesquisa *in vivo*. Neoplasia foi induzida na mucosa bucal de hamster e o óleo-resinoso de copaíba foi aplicado no local da lesão e foram observadas diminuições macro e microscópica das lesões (Pedreira, 2007). Além disso, COP promoveu multiplicação celular em meio de cultura com células MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*), e consequentemente, demonstrou ter um efeito positivo no processo de cicatrização (Nogueira et al., 2012).

Pesquisas realizadas nas últimas duas décadas na Odontologia apontam o óleo de copaíba como substituto do eugenol (Costa et al., 1996; Veiga Junior et al., 2008; Cascon, 2004; Ramos, 2006). A mistura do COP com o óxido de zinco produziu uma menor irritação no local quando comparado ao eugenol (Ribeiro, 1989). Quando utilizaram o hidróxido de cálcio juntamente com o óleo de copaíba observaram uma melhor capacidade antimicrobiana, em relação à formulação com o eugenol (Ribeiro, 1989; Veiga Junior et al., 2008). Apesar dessa pasta apresentar inicialmente um efeito irritante, o COP potencializou as propriedades do Ca(OH)_2 , ou seja, sua compatibilidade tecidual e sua capacidade indutora de formação de tecido mineralizado (Bandeira et al., 1999). Estes resultados corroboram aqueles de Pinheiro (1993) em que o cimento obturador com o óleo de copaíba, Ca(OH)_2 e óxido de zinco, mostrou uma maior eficiência nas infiltrações apicais em obturações de canais radiculares. Ao utilizarem Ca(OH)_2 juntamente com o óleo-resina de copaíba, Vasconcelos et al. (2008) também demonstraram uma atividade antibacteriana frente ao *S. mutans* e ao *S. sanguinis*. Diante disso, o óleo de copaíba apresentou-se com grande potencial para o uso como veículo ao cimento de Ca(OH)_2 .

Pesquisadores também demonstraram *in vivo* que duas pastas endodônticas (hidróxido de cálcio e própolis) utilizadas com dois veículos (óleo de Copaíba não fracionada e fração volátil do óleo de Copaíba) promoveram uma reação inflamatória moderada no período inicial durante um curto período de tempo; no entanto, os eventos histopatológicos (processos inflamatórios) diminuíram significativamente no período final de observação (Garcia et al., 2011).

Em outro estudo, foi avaliado o efeito citotóxico de um novo material para o canal radicular à base do óleo de copaíba (Biosealer) em células semelhantes a osteoblastos. Com base nos resultados do teste de viabilidade celular, demonstrou-se que o selante experimental à base de COP não foi citotóxico (Garrido et al., 2015). Os autores acreditam que esse fato pode estar relacionado às propriedades inerentes do COP, como a compatibilidade biológica (Garcia et al., 2011; Almeida et al., 2012), propriedades reparadoras (Stupp et al., 2008) e anti-inflamatórias (Kobayashi et al., 2011). O mesmo resultado foi observado por Garrido et al. (2015), indicando possível biocompatibilidade deste novo cimento endodôntico com o tecido pulpar.

Desta forma, o COP é um material biocompatível com o tecido pulpar (Garcia et al., 2011), podendo induzir a formação de tecido mineralizado subsequente ao material protetor (Lima et al., 2011).

Diante do exposto, o departamento de dentística da Faculdade de Odontologia da USP iniciou estudos sobre a utilização do óleo-resina de copaíba como material de capeamento pulpar. O primeiro estudo foi realizado *in vitro* com células tronco de polpa de dente decíduo onde foi observado que essa substância promoveu proliferação, diferenciação e migração das células, além de melhorar características dos materiais atualmente utilizados para capeamento pulpar direto [MTA e Ca(OH)_2] (Couto, 2013). Dando sequência a esta investigação do potencial regenerativo do COP, este trabalho translacional teve como objetivo analisar o efeito da aplicação direta de potenciais materiais capeadores à base de óleo de copaíba sobre a polpa dentária de ratos.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de biomateriais [Ca(OH)₂, MTA, Biodentina] utilizados isoladamente ou associados ao óleo-resina de copaíba sobre a polpa dentária de ratos na técnica de capeamento pulpar direto.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental, utilizado neste projeto, seguiu os princípios de ética e experimentação animal e na Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal que visam ao aprimoramento de condutas na experimentação animal.

O Projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Potiguar (Parecer # 002/2015) (Anexo A) pela Universidade de São Paulo – Faculdade de Odontologia (Parecer # 005/2017) (Anexo B).

4.1 Preparo das substâncias

O óleo-resina de copaíba (COP) *in natura* foi obtido pelo método de exsudação artificial, através de orifícios feitos no tronco da árvore *Copaifera reticulata* Ducke, mantida no herbário da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, Belém, PA, Brasil) (Parecer # 183939), seguindo as orientações internacionais sugeridas pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O COP foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental da Universidade Federal do Pará – UFPA, sendo o mesmo material utilizado em estudos anteriores (Couto, 2013).

O COP foi utilizado como óleo-resina extraído, de forma isolada. O Ca(OH)_2 foi preparado nas proporções de 1 g de hidróxido de cálcio PA [Ca(OH)_2 , Biodinâmica®] para 960 µl de água destilada estéril. O agregado de trióxido mineral (MTA Angelus®) foi preparado nas proporções de 1 g para 760 µl de água destilada estéril. A Biodentina (BIODENTINE®, Septodont) foi manipulada de acordo com o fabricante (1 cápsula de pó misturada com 5 gotas do líquido).

As pastas de COP em associação ao Ca(OH)_2 ou ao MTA foram preparadas de acordo com as formulações utilizadas por Couto em 2013 e que foram patenteadas (INPI BR10201300555). Ca(OH)_2 +COP composto por 1 g de Ca(OH)_2 para 70 µl de COP e o MTA+COP nas proporções de 1 g de MTA para 20 µl de COP. A

BIODENTINA+COP foi preparado com 1 g de Biodentina (pó e líquido) para 10 µl de COP.

4.2 Preparo dos animais

Foram utilizados, neste estudo, 120 ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, *Rodentia*, *Mammalia*), fêmeas, com 8 semanas de idade e massa corporal média de 250-350 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas de polietileno padrão (5 animais por caixa), em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura na faixa de 22°C a 27°C, umidade de 45 a 65% e ambiente organizado e higienizado), e receberam ração moída e amolecida; e água *ad libitum*.

4.3 Procedimentos experimentais

Inicialmente os animais foram pesados e anestesiados com injeção intramuscular com o anestésico *Zoletil® 50* (Virbac 0,3mg/100mg). Os animais foram posicionados em mesa de trabalho (Figura 4.1) e foi realizada a desinfecção extra e intrabucal com solução de clorexidina a 2% e 0,12%, respectivamente.

Figura 4.1- Mesa de trabalho ilustrando a forma de contenção do rato Wistar para a realização do procedimento odontológico

Fonte: a autora.

Cavidades classe I na face oclusal foram realizadas de forma padronizada nos primeiros molares superiores e inferiores de ambos os lados, utilizando broca esférica carbide ¼ (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil) em alta rotação. A exposição pulpar foi realizada com mínima pressão e a cavidade teve profundidade igual ao diâmetro da broca (Figura 4.2). Após a exposição pulpar, as cavidades foram submetidas à limpeza com algodão estéril e água destilada durante 2 minutos. Todos os procedimentos foram realizados com isolamento relativo utilizando cone de papel estéril, preconizado por Carvalho (1992).

Figura 4.2- Exposição pulpar nos molares superiores

Fonte: a autora.

Logo após a exposição pulpar, os biomateriais foram aplicados utilizando a técnica do capeamento pulpar direto. Os biomateriais utilizados foram COP, Ca(OH)_2 , Ca(OH)_2 +COP, MTA, MTA+COP, BIODENTINA, BIODENTINA+COP. As cavidades foram imediatamente seladas com o material obturador Obtur® (Maquira, Maringá, PR, Brasil) e os animais foram colocados em gaiolas individuais até se recuperarem da anestesia.

4.4 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos em Grupo Controle e em Grupo Tratado com Biomateriais, cada grupo foi constituído por cinco animais em três tempos (7, 14 e 28 dias) (Quadro 4.1).

Quadro 4.1- Divisão dos grupos, biomateriais, tempo experimental, número de animais

Grupos Experimentais	Biomaterial	Tempo experimental	Número de animais
G1: Controle positivo	SEM MATERIAL	7 dias – 5 ratos	15
		14 dias – 5 ratos	
		28 dias – 5 ratos	
G2: COP	Óleo-resina de copaíba (COP)	7 dias – 5 ratos	15
		14 dias – 5 ratos	
		28 dias – 5 ratos	
G3: Ca(OH)₂	Hidróxido de Cálcio PA [Ca(OH) ₂]	7 dias – 5 ratos	15
		14 dias – 5 ratos	
		28 dias – 5 ratos	
G4: Ca(OH)₂+COP	Hidróxido de Cálcio PA [Ca(OH) ₂] + Óleo-resina de copaíba (COP)	7 dias – 5 ratos	15
		14 dias – 5 ratos	
		28 dias – 5 ratos	
G5: MTA	Agregado de trióxido mineral branco (MTA)	7 dias – 5 ratos	15
		14 dias – 5 ratos	
		28 dias – 5 ratos	
G6: MTA+COP	Agregado de trióxido mineral branco (MTA) + Óleo-resina de copaíba (COP)	7 dias – 5 ratos	15
		14 dias – 5 ratos	
		28 dias – 5 ratos	
G7: BIODENTINA	Cimento a base de silicato tricálcio (Biodentina)	7 dias – 5 ratos	15
		14 dias – 5 ratos	
		28 dias – 5 ratos	
G8: BIODENTINA+COP	Cimento a base de silicato tricálcio (Biodentina) + Óleo-resina de copaíba (COP)	7 dias – 5 ratos	15
		14 dias – 5 ratos	
		28 dias – 5 ratos	
Total de ratos utilizados			120

Fonte: a autora.

4.5 Análise morfológica

A eutanásia dos animais foi realizada nos tempos experimentais de 7,14 e 28 dias. As cabeças dos animais foram fixadas por 24 horas em solução tamponada de formol 10% em temperatura ambiente. Uma vez fixado, a peça foi lavada com água corrente e transferida para o álcool 70%, onde permaneceu até o início da análise do tecido.

Posteriormente, as peças anatômicas foram dissecadas e desmineralizadas em solução de EDTA 10% a 4°C por aproximadamente 3 a 6 meses, esta solução foi trocada a cada 3 dias (Figura 4.3 A, B).

Logo após a lavagem das peças, a maxila e mandíbula foram separadas e individualmente seccionadas, com o auxílio de bisturi, no plano sagital, dividindo em hemiarcada direita e esquerda. Por fim, foram realizados cortes longitudinais na área dos molares (Figura 4.3 C, D, E, F). Os espécimes foram neutralizados com sulfato de sódio 5% por 24 horas e passaram pelo processamento histológico convencional: desidratação em cadeias crescentes de concentração de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina. A desidratação promoveu a troca da água dos tecidos e a sua substituição por álcool por concentração crescente (70%, 95%, 100%); a diafanização foi a etapa seguinte, com a substituição do álcool por xilol; finalmente, a etapa de impregnação, o xilol foi substituído por parafina fundida a 60° em pequenos blocos. Neste momento, foi realizado a catalogação do bloco para posterior identificação da peça.

A próxima etapa consistiu na utilização do micrótomo para obter cortes sucessivos, delgados e uniformes, a partir dos blocos de parafina com as peças incluídas. Desta maneira, foi obtido cortes de 4µm. As fitas obtidas a partir do micrótomo foram transferidas para o banho-maria (água entre 3° e 8° abaixo do ponto de fusão da parafina), com auxílio de uma pinça para o distendimento das fitas. Posteriormente, os cortes foram separados individualmente utilizando lâminas de vidro limpas. A superfície das lâminas foi revertida por uma camada fina de albumina, facilitando a adesão da peça. As lâminas juntamente com os cortes obtidos foram transferidas para a estufa onde ficaram por 10 minutos. Após esse tempo, esse conjunto foram colocados em um suporte inclinado. Finalmente, os cortes foram depositados em uma estufa a 60° para secagem durante 24 horas.

Figura 4.3- Sequência do preparo das peças: fixação, desidratação e corte. A- Fixação das peças com formol 10%. B- Descalcificação das peças com EDTA 10%. C- Maxila D- Mandíbula. E- Corte longitudinal da maxila. F- Corte longitudinal na região dos dentes

Fonte: a autora.

Para corar as peças incluídas em parafina foi necessário a retirada da parafina e a hidratação da peça. Este procedimento foi realizado a partir de uma sequência de banhos em xilol (1º banho de xilol: 5 min; 2º banho de xilol: 2 min; 3º banho de xilol: 1 min), álcool em concentração decrescente (álcool 100%: 1min; álcool 95%: 1 min; álcool 70%: 1 min) e água (2min).

Após a hidratação, os cortes foram corados em HE (hematoxilina de Harris e eosina). De acordo com Junqueira e Carneiro (2013), a hematoxilina foi dissolvida no álcool e o alúmen na água destilada previamente aquecida. Posteriormente, as duas soluções foram misturadas e aquecidas até a fervura. O óxido de mercúrio foi adicionado à solução que foi resfriada (Quadro 4.2). O ácido acético foi colocado na solução fria para finalmente ser filtrada. A eosina foi dissolvida em água destilada e acrescentar o álcool 95%; juntar o álcool 80% e ácido acético (Quadro 4.3).

Quadro 4.2- Concentração utilizado na hematoxilina

Hematoxilina	2,5g
Álcool 95%	25ml
Alúmen de amônio ou potássio	50g
Água destilada	500ml
Óxido vermelho de mercúrio	1,25g
Ácido acético	20ml

Fonte: Laboratório de análise patológica Dra. Lelia Batista de Souza.

Quadro 4.3- Concentração utilizado na eosina

Eosina	2,5g
Água destilada	50 ml
Álcool 95%	200 ml
Álcool 80%	750 ml

Fonte: Laboratório de análise patológica Dra. Lelia Batista de Souza.

Após desparafinar e hidratar os cortes, estes foram corados com hematoxilina durante 15 minutos. Logo após a coloração, os materiais foram lavados com água corrente por 10 min; corados em eosina por 10 min; os cortes foram lavados em água e desidratados em álcool 70% rapidamente; e então diafinizados e montados em resina.

A montagem final da lâmina consistiu em depositar uma gota de resina líquida sobre o corte que está aderido à lâmina de vidro e cobri-lo com uma lamínula. A lâmina montada foi catalogada de acordo com o grupo à qual pertence.

Após a coloração das lâminas foi realizado análise em microscopia de luz.

As análises dos materiais foram por observação da organização tecidual em relação à resposta inflamatória, formação de tecido mineralizado e necrose tecidual para os cortes histológicos corados por HE.

Foram utilizadas as seguintes análises por escores, baseados no Faraco e Holland (2001), Faraco Junior e Holland (2004), Koike et al. (2014).

a. Em relação à resposta inflamatória avaliada

Processos Inflamatórios	Agudo	Neutrófilos
		Mastócitos
	Crônico	Linfócitos
		Plasmócitos
		Macrófagos
		Eosinófilos
		Células gigantes

1	Ausente ou poucas células (até 2 por campo de maior aumento – 400X).
2	Fraco, até 10 células por campo de maior aumento – 400X.
3	Moderado, entre 11 e 25 células por campo de maior aumento – 400X.
4	Intenso, mais de 25 células por campo de maior aumento – 400X.

Edema	1: ausente (no terço analisado).
	2: presente (no terço analisado).

b. Eventos degenerativos

Necrose	1: Ausente.
	2: Presente.
Necrose liquefativa	1: ausente, não há necrose no terço analisado.
	2: presente, há necrose liquefativa com pequenas áreas de microabscessos.
	3: moderado, há necrose liquefativa e abscesso envolvendo mais da metade do terço analisado.
	4: intenso, há necrose liquefativa, abscesso com exsudato em todo o terço analisado.
Necrose coagulativa	1: ausente, não há necrose coagulativa no terço analisado.
	2: presente, há necrose coagulativa com pequenas áreas isquêmicas e acelulares.
	3: moderado, há necrose coagulativa envolvendo mais da metade do terço analisado.
	4: intenso, há necrose coagulativa, com áreas isquêmicas e acelulares em todo o terço analisado.

Fibrose	1: ausente (no terço analisado).
	2: presente (no terço analisado).

Calcificação distrófica	1: ausente (no terço analisado).
	2: presente (no terço analisado).

Exsudato Purulento	1: ausente (no terço analisado).
	2: presente (no terço analisado).

Material Eosinófilo	1: ausente (no terço analisado).
	2: presente (no terço analisado).

Bactérias (Microorganismos)	1: ausente.	
	2: presente	1: localizado próximo ao material capeador.
		2: em contato com a polpa.
		3: envolve moderada região da polpa.

c. Eventos Morfológicos

Uniformidade da camada Odontoblástica	1: regular e odontoblastos com morfologia normal.
	2: irregular, com ausência de odontoblastos em algumas áreas.
	3: irregular, com ausência de odontoblastos, ou com odontoblastos em necrose.

Pré-dentina	1: Ausente	
	2: Presente	Normal
		Espessada

d. Eventos de reparação

Proliferação Fibroblástica	1: ausente (no terço analisado).
	2: presente (no terço analisado).

Tecido de granulação	1: ausente, não há sinais de formação de tecido de granulação.
	2: fase inicial, tecido de granulação com grande quantidade de vasos e fibroblastos.
	3: fase reparativa, tecido de granulação com poucos vasos e maior proliferação fibroblástica

Vasos	Quantidade	1: ausente ou poucos vasos (até 10 por campo de maior aumento – 400X).
		2: fraco, entre 11 e 20 vasos por campo de maior aumento – 400X.
		3: moderado, entre 21 e 30 vasos por campo de maior aumento – 400X.
		4: intenso, mais de 30 vasos por campo de maior aumento – 400X.
	Distribuição	1: próximos uns dos outros.
		2: espaçados.
	Maturação	1: vasos jovens, neoformados, abertos.
		2: vasos maduros, completamente fechados.

Ponte de Dentina	Continuidade	1: ponte de dentina completa, não há exposição pulpar.
		2: há pequenas áreas de comunicação do material capeador com a polpa.
		3: somente deposição lateral de tecido duro nas paredes da cavidade de exposição da polpa.
		4: ausência de ponte de dentina e ausência de deposição lateral de tecido duro.
	Morfologia	1: dentina ou pré-dentina e tecido duro irregular.
		2: apenas deposição irregular de tecido duro.
		3: apenas uma pequena camada de deposição de tecido duro.
		4: sem deposição de tecido duro.
	Espessura	1: até 250 µm.
		2: de 150 a 249 µm.
		3: de 1 a 149 µm.
		4: Ponte parcial ou ausente.
	Localização	1: ocluindo a área de exposição sem invadir o espaço da polpa.
		2: ponte invadindo o espaço da polpa ao lado da parede dentina oposta.
		3: ponte atingiu a parede de dentina oposta.
		4: nenhuma ponte ou apenas deposição de tecido duro nas paredes da cavidade da exposição.

4.6 Microtomografia computadorizada (micro-CT) de alta resolução

O método do micro-CT não necessita da desmineralização do espécime e, portanto, é capaz de fornecer informações adicionais sobre a variação na radiopacidade dos tecidos duros. Além de ser um método não invasivo que possibilita análises em 3D de densidade e volume tecidual. Primeiramente, as cabeças dos animais foram fixadas em formol 10% durante 24 horas. Posteriormente, cada peça anatômica foi envolvida em parafina para evitar a desidratação durante o processo de digitalização. O tempo experimental utilizado para esta análise foi de 28 dias. Nesta análise, foi utilizado 10 dentes / 5 animais de cada grupo, sendo que o grupo controle (SEM MATERIAL e COP) foram eliminados desta análise.

As maxilas e as mandíbulas foram separadas e posteriormente foram levadas para o micro tomógrafo de alta resolução (SkyScan 1176; Bruker micro-CT, Kontich, Bélgica) (Figura 4.4) localizado no laboratório de microtomografia do Instituto de Biologia da USP – São Paulo. As peças anatômicas foram posicionadas separadamente e voltadas para baixo, incorporado em um material de impressão de alta precisão (Speedex; Colten, Cuyahoga Falls, OH, EUA). Cada peça anatômica foi posicionada num suporte de amostras e foram trazidas para o leito de fibras de carbono do *scanner* micro-CT (Figura 4.5). A digitalização das peças foi em 56 kV, 397 mA, 360° de rotação, 0,5° de passo rotacional, resolução de 9 μ m, resultando uma imagem do tamanho do voxel em torno de 16 mm. O filtro usado foi o de cobre e de alumínio.

Figura 4.4- Microtomógrafo de raios-X SkyScan 1176

Fonte: a autora.

Figura 4.5- Posicionamento dos espécimes no suporte do Micro CT

Fonte: a autora.

A duração do processo de digitalização de cada peça foi de 56 minutos. Posteriormente, as imagens foram reconstruídas no software NRecon v.1.6.9 (Brucker micro-CT), utilizando o algoritmo de reconstrução cone-beam Feldkamp modificado, que resultou em aproximadamente 800-900 secções transversais por espécime (Figura 4.6).

As análises das imagens foram realizadas no *software* (CTAn, DataView, CTVol) em algoritmo de superfície e de pixel para avaliar a densidade da dentina (parte mineral) da câmara pulpar de cada amostra. A reconstrução 3D da amostra foi submetida à análise volumétrica.

Figura 4.6- Digitalização das peças em 3D

Fonte: a autora.

4.7 Metodologia de avaliação

Primeiramente, foi utilizado o programa dataset para realização do plano de análise. As imagens foram abertas no programa CTAn, para o cálculo de parâmetros quantitativos e construção dos modelos visuais em 3D. A partir desse programa foi selecionado o dente correspondente a cada grupo determinando a região de interesse (ROI). A imagem inicial (top) foi determinada pelo início do aparecimento do dente e a imagem final (bottom) foi relacionada ao desaparecimento deste. Foi criada o mesmo ROI para todas as imagens e depois salva para posterior análise (Figuras 4.7 e 4.8).

Figura 4.7- Imagem inicial no programa CTAn

Fonte: a autora.

Figura 4.8- Seleção do dente correspondente a cada grupo no programa CTAn

Fonte: a autora.

Posteriormente, para cada espécime a secção que mostrava o início do material obturador/forrador foi escolhida como “top”, e a última imagem do

material/forramento era selecionado como “bottom”. Estas mesmas referências foram usadas em todas as amostras (Figura 4.9).

Uma nova região de interesse (ROI) foi então criada em todas as secções longitudinais, selecionando o material, dentina, polpa, e salva para utilização nas análises posteriores. A integração das regiões de interesse em todos os cortes selecionados definiu o volume de interesse (VOI) de cada espécime, o qual foi salvo como um novo conjunto de imagens (Figura 4.10).

Figura 4.9- Seleção da região de interesse (ROI) contemplando material, dentina, polpa

Fonte: a autora.

Figura 4.10- Volume de interesse (VOI) contemplando material, dentina, polpa

Fonte: a autora.

O novo volume de interesse foi carregado novamente no programa CTAn, e o intervalo na escala de cinza necessário para reconhecer cada objeto a ser avaliado foi determinado em histograma de densidade, processo este denominado binarização ou segmentação. O resultado final foi uma imagem binária composta por pixel preto que representa os espaços vazios (ar), ou brancos, que representam o objeto de interesse (Figura 4.11).

Figura 4.11- A- Imagem original do ROI (material, dentina, polpa). B e C- Imagem binária correspondente ao material e material + dentina respectivamente; ao lado apresenta um histograma com intervalo de densidade necessária para binarizar o material obturador e dentina. D- Imagem do ROI para análise

Fonte: a autora.

A seguir a ferramenta *custom processing* foi utilizada para um processamento personalizado das imagens, onde funções diversas e operações matemáticas foram executadas através da criação de listas de tarefas (Figura 4.12).

Figura 4.12- Ferramenta *custom processing* com *plug-ins* para criação de lista de tarefas

Name	Description
Thresholding	Segment the foreground from background to binary images.
Save bitmaps	Save images to new folder.
2D analysis	Calculate 2D parameters of binary images.
3D analysis	Calculate 3D parameters of binary images.
Filtering	Smoothing, noise reduction and unsharpening of images. The result is a grayscale image.
Morphological operations	Morphology-based operations.
Despeckle	Remove speckles from images.
3D model	Create 3D surface from binary images.
ROI shrink-wrap	Shrink a ROI to the boundary of a binarised object.
Reload	Reload images or ROI.
Histogram	Image histogram.
Individual object analysis	Calculate individual parameters of objects.
Bitwise operations	Operations based on binary arithmetic.
Arithmetical operations	Operations based on ordinary arithmetic.
Geometrical transformations	Flipping, translating, rotating images.
Comment	Add text comment to output file

Fonte: a autora.

O resultado final foi a análise volumétrica e o modelo 3D de um determinado objeto apenas. Logo após foram criadas listas padrões distintas para segmentar o material, dentina e polpa.

Para o cálculo da dentina, primeiramente foi realizado a operação XOR do *plug-in Bitwise Operations*, removendo o material da amostra (Figuras 4.13 e 4.14). Posteriormente, foi realizado novamente XOR do *plug-in Bitwise Operations* removendo a polpa do ROI, obtendo somente a dentina que foi a região de interesse (Figuras 4.15 e 4.16).

Figura 4.13- Primeira lista de tarefas (*Task list*)

Name	Description
💡 Reload	Reload images or ROI.
💡 Thresholding	Segment the foreground from backgro...
💡 Bitwise operations	Operations based on binary arithmetic.
💡 3D analysis	Calculate 3D parameters of binary ima...
💡 3D model	Create 3D surface from binary images.
💡 Despeckle	Remove speckles from images.
💡 Bitwise operations	Operations based on binary arithmetic.
💡 3D model	Create 3D surface from binary images.
💡 3D analysis	Calculate 3D parameters of binary ima...
💡 Save bitmaps	Save images to new folder.

Fonte: a autora.

Figura 4.14- A- Imagem original do ROI. B- Imagem demonstrando ROI XOR material+ dentina, ou seja, ROI menos material+dentina

Fonte: a autora.

Figura 4.15- Segunda lista de tarefas (*Task list*)

Name	Description
💡 Thresholding	Segment the foreground from backgro...
💡 Bitwise operations	Operations based on binary arithmetic.
💡 3D model	Create 3D surface from binary images.
💡 3D analysis	Calculate 3D parameters of binary ima...

Fonte: a autora.

Figura 4.16- Segunda análise. A- Azul representa a polpa. B- Imagem da dentina e polpa. C- Imagem demonstrando ROI XOR polpa, ou seja, ROI menos a polpa. Imagem da dentina

Fonte: a autora.

4.8 Análise Estatística

Os dados foram tabulados e submetidos aos testes de normalidade. Os dados foram estatisticamente analisados utilizando o teste ANOVA para duas variáveis e o teste de Tuckey, determinando a superfície e volume da dentina reparadora formada entre os grupos experimentais. Nas análises histológicas também foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney (Mass-Whitney Rank Sum Test). Para cada critério realizou-se a comparação entre os três intervalos de tempo fixando-se o material (7, 14 e 28 dias) e comparação entre materiais fixando o tempo (COP, Ca(OH)_2 , Ca(OH)_2 +COP, MTA, MTA+COP, Biodentina, Biodentina+COP). A significância estatística foi predeterminada com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise morfológicas descritivas

5.1.1 Análise morfológicas descritivas – 7 dias

5.1.1.1 SEM MATERIAL – Controle

Neste grupo foi observado processo inflamatório agudo intenso, presença de exsudato purulento, necrose parcial do tipo liquefativa, vasos maduros com pequena quantidade, presença de tecido fibrótico, e sugestão de presença de bactéria em contato com o tecido pulpar (Figura 5.1A).

5.1.1.2 COP

Morfolologicamente, na área da abertura da cavidade, o tecido pulpar dos animais deste grupo apresentou necrose do tipo liquefativa no terço coronário. Enquanto que, no terço médio observou-se aumento no número de fibroblastos (células fusiformes com citoplasma amplo e nucléolo evidente). Outros eventos morfológicos observados foram: fibrose, aumento no número de vasos sanguíneos e hiperemia vascular. O terço apical demonstrou tecido pulpar vital com aspectos de normalidade, celularidade uniforme e vasos hiperêmicos.

A camada de odontoblastos apresentou irregular, com ausência de odontoblastos, ou com odontoblastos em necrose em algumas amostras. Foi observado uma pequena camada de deposição de tecido duro nas paredes da cavidade de exposição da polpa; não apresentando formação de ponte dentinária regular (Figura 5.2A).

5.1.1.3 Ca(OH)_2

A maioria dos casos deste grupo apresentou uma polpa coronária com intenso infiltrado inflamatório composto predominantemente por polimorfonucleares. Em alguns casos, o tecido pulpar demonstrou presença de edema e exsudato purulento. No terço médio e apical, observou-se tecido pulpar com discreto processo inflamatório.

A camada de odontoblastos apresentava-se irregular, com desorganização de sua estrutura normal e ausência de células em algumas áreas. Na maioria dos casos foi possível observar uma deposição irregular e incompleta de tecido mineralizado próximo ao local da exposição pulpar (Figura 5.3A).

5.1.1.4 $\text{Ca(OH)}_2 + \text{COP}$

No terço coronário da maioria dos espécimes analisados, foram encontradas pequenas áreas de deposição de tecido pouco mineralizado. No terço médio e apical a polpa remanescente demonstrou-se ricamente vascularizada com neoformação vascular, e discreta proliferação fibroblástica, apresentando fibroblastos jovens em todos os terços. O Infiltrado inflamatório era composto predominantemente por linfócitos, plasmócitos e poucos eosinófilos.

A camada de odontoblastos apresentou-se irregular, com necrose local em algumas áreas, e em apenas uma amostra analisada apresentou deposição de tecido mineralizado amorfo (Figura 5.4A).

5.1.1.5 *MTA*

Na área de contato do material com a polpa houve deposição de tecido mineralizado. O tecido pulpar adjacente demonstrou moderada proliferação fibroblástica, intensa angiogênese, discreta quantidade de células inflamatórias

mononucleares. No terço médio apresentou características de normalidade, no entanto, em alguns casos foi observado necrose parcial com inflamação leve e presença de neutrófilos. Discreta proliferação fibroblástica, ausência da camada de odontoblastos, vasos de médio calibre hiperêmicos. No terço apical observou-se grandes quantidades de vasos linfáticos com plasma.

Em poucas amostras foi encontrado necrose parcial do tipo coagulativa, entretanto apresentava deposição de dentina reacional e camada de odontoblastos irregulares (Figura 5.5A).

5.1.1.6 *MTA+COP*

A polpa coronária da maioria dos espécimes analisados, apresentou discreto infiltrado inflamatório crônico, composto predominantemente por linfócitos e plasmócitos, e ocasionais leucócitos polimorfonucleares. No tecido pulpar adjacente observou-se numerosos vasos de pequenos calibres. Outro achado morfológico foi a deposição aumentada de pré-dentina. Pequenos focos de necrose liquefativa também foi observado. A polpa adjacente à área de exposição pulpar demonstrou tecido de granulação com proliferação de fibroblastos e vasos sanguíneos imaturos, neoformados, e células endoteliais dispersas (Figura 5.6A).

5.1.1.7 *BIODENTINA*

Na área de exposição pulpar, foi possível observar, discreta reação inflamatória aguda com quantidade moderada de leucócitos polimorfonucleares, com presença de formação da ponte de dentina (somente uma amostra apresentou ausência de ponte de dentina formada na exposição pulpar). O tecido pulpar adjacente demonstrou moderada proliferação fibroblástica com deposição de matriz pouco mineralizada (hialina), quantidade moderada de vasos sanguíneos neoformados. A camada de odontoblastos apresentou-se hiperplásica e hipertrófica com deposição de dentina reacional, com presença de infiltrado inflamatório crônico discreto. O tecido pulpar no

terço médio apresentou proliferação fibroblástica e atividade angiogênica discreta; e infiltrado inflamatório crônico discreto. No terço apical, a polpa apresentava características normais, vasos hiperêmicos, discreta proliferação fibroblástica (Figura 5.7A).

5.1.1.8 *BIODENTINA+COP*

A polpa coronária apresentou tecido conjuntivo, com quantidade moderada de matriz extracelular com fibroblastos, poucos vasos, deposição de dentina reacional e infiltrado inflamatório discreto. A camada de odontoblastos apresentou-se irregular, na maioria dos casos com deposição de dentina reacional. Os terços médio e apical apresentaram características de normalidade, e neste último, vasos linfáticos de grande calibre congestos foram observados (Figura 5.8A).

5.1.2 Análise morfológicas descritivas – 14 dias

5.1.2.1 *SEM MATERIAL – Controle*

Neste grupo foi observado presença processos inflamatórios, necrose total, sugestão de presença de bactéria em contato com o tecido pulpar. Ademais, não foi constatado tecido de granulação e formação de ponte dentinária (Figura 5.1B).

5.1.2.2 *COP*

Na maior parte dos espécimes observou-se moderado infiltrado inflamatório na câmara pulpar, entretanto em algumas amostras apresentaram fraca e moderada presença de células com predominância dos polimorfonucleares, eosinófilos,

linfócitos. Em outros espécimes, a inflamação distribuía-se em áreas focais, tanto na polpa coronária quanto radicular. Foi observado bactérias em contato com a polpa o que pode ter favorecido a inflamação aguda e crônica (Figura 5.2B).

Edema, hiperemia moderadas foram observadas na polpa coronária, acompanhado de infiltração inflamatória aguda moderada e inflamatória crônica discreta. Na região de contato com o material capeador, observou-se um arcabouço de tecido dentinóide ainda não mineralizado. A proliferação fibroblástica foi discreta, com macrófagos e vasos sanguíneos neoformados. Observou-se ainda vasos maduros hiperêmicos. Eosinófilos dispersos também estavam presentes (Figura 5.2B).

No terço coronário demonstrou áreas de necrose parcial do tipo liquefativa com formação de microabscesso; deposição de dentina esclerótica associada a inflamação discreta, camada de odontoblastos irregular (Figura 5.2B).

No terço médio, o tecido pulpar apresentava um aspecto de normalidade, plasmócitos dispersos e eosinófilos, poucos vasos neoformados. No terço apical, o tecido pulpar também apresentava aspecto de normalidade. Inflamação crônica discreta com predomínio de linfócitos, áreas de hemorragia e deposição de hemosiderina foram observados.

No corno pulpar adjacente ao capeamento pulpar demonstrou sinais de reparo com deposição de tecido mineralizado irregular formando uma pseudoponte, em algumas amostras.

5.1.2.3 Ca(OH)_2

Infiltrado inflamatório foi observado na câmara pulpar, apresentando pequena a moderada quantidade de polimorfonucleares, mastócitos, macrófagos, linfócitos; e ausência de células gigantes. A inflamação distribuía-se em áreas focais, tanto na polpa coronária quanto radicular. Foi observado bactérias em contato com a polpa.

Edema, hiperemia, áreas hemorrágicas foram encontradas moderadamente na polpa coronária. Neste grupo, foi observado também discreta inflamação crônica; e discreta a moderada inflamação aguda (Figura 5.3B).

A proliferação fibroblástica apresentava moderada, com macrófagos e vasos sanguíneos neoformados. Ausência de calcificação distrófica, e discreta a moderada presença de tecido de granulação, pré-dentina espessada e angiogênese evidente foram observadas na câmara pulpar (Figura 5.3B).

No terço coronário, metade das amostras apresentou áreas de necrose parcial do tipo liquefativa, a outra metade apresentava necrose total do tipo liquefativa e coagulativa. Foi observado também deposição de dentina associada ao processo inflamação, moderada quantidade de vasos sanguíneos, camada de odontoblastos irregular. A formação de dentina terciária reacional de pequena espessura foi observada nas paredes laterais (Figura 5.3B).

Terço médio e apical apresentaram intensa hibridização e áreas de necrose. No terço médio, foi observado grande quantidade de PMN, necrose do tipo coagulativa, desorganização da camada de odontoblastos. No terço radicular apresentava tecido de granulação com pequenos vasos neoformados, grande quantidade de mastócitos e plasmáticos, fibroblastos ativos.

5.1.2.4 $\text{Ca(OH)}_2 + \text{COP}$

Na maioria dos espécimes observou-se fraco infiltrado inflamatório na câmara pulpar com pequena quantidade de polimorfonucleares, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos; e ausência de células gigantes. Foi observado discreta quantidade de bactérias em contato com a polpa.

Edema, hiperemia, áreas hemorrágicas foram encontradas moderadamente na polpa coronária; porém, em alguns casos estas características apresentavam ausentes. Foi observado ausência a discreta inflamação crônica e inflamação aguda; ausência de calcificação distrófica e proliferação fibroblástica (Figura 5.4B).

No terço coronário, metade da amostra apresentava uma necrose parcial tanto coagulativa quanto liquefativa. O corno pulpar adjacente demonstrou a presença de uma camada de odontoblastos irregular com deposição de tecido duro (Figura 5.4B).

No terço médio e apical, observou-se alguns vasos com plasma sanguíneo e polpa com ápice com aspecto de normalidade. No terço médio, abaixo da área de necrose pulpar, há deposição intensa de material calcificado semelhante a dentina

distrófica com células aprisionadas e vasos sanguíneos dispersos. O terço apical apresentou polpa normal, vasos de grande calibre hiperêmicos, com hemácias e plasma, e áreas de pigmentação (hemosiderina); porém em um dos casos foi observado abscesso no ápice e em outro caso apresentava necrose total sem a presença de vasos.

5.1.2.5 MTA

O infiltrado inflamatória apresentou-se escasso com predomínio de células polimorfonucleares e linfócitos. Foi observada ausência de hiperemia, áreas hemorrágicas e edema; inflamação aguda e crônica. Porém, em alguns casos apresentaram uma discreta inflamação crônica. Somente uma amostra foi observado a presença de bactérias. Discreta calcificação distrófica e proliferação fibroblástica, pré-dentina espessada estavam presentes. Vasos jovens e maduros espessados, em quantidade moderada foi observado em todo tecido pulpar.

No terço coronário, necrose parcial do tipo coagulativa foi predominante; sendo que em uma amostra apresentou tecido pulpar normal (Figura 5.5B). A deposição de tecido duro irregular foi verificada em mais da metade das amostras. Entretanto, essa deposição foi observada em maior quantidade nas paredes da cavidade. No local da exposição a ponte dentinária apresentava com pequenas áreas de comunicação do material capeador com a polpa (Figura 5.5B).

5.1.2.6 MTA+COP

Na maioria dos espécimes observou-se presença de infiltrado inflamatório com predominância dos polimorfonucleares, linfócitos. Não foi observado bactérias em contato com a polpa (Figura 5.6B).

Edema, áreas hemorrágicas discretas foram encontradas na polpa coronária, acompanhado de infiltração inflamatória aguda e inflamatória crônica discreta a moderada. Foi observado discreta proliferação fibroblástica e tecido de granulação;

ausência de calcificação distrófica e moderada quantidade de material eosinófilo. Os vasos sanguíneos apresentaram espessados, com discreta quantidade.

O terço coronário demonstrava presença de necrose parcial do tipo liquefativa e coagulativa com discreta deposição de tecido mineralizado. Tecido pulpar adjacente ao material capeador apresentava discreta proliferação fibroblástica associadas a extensas áreas de hialinização. A formação de uma dentina reparativa foi verificada em mais da metade das amostras (Figura 5.6B).

No terço médio e apical apresentaram matriz extracelular muito hialinizada, vasos maduros, hiperêmicos, grande quantidade de depósitos de hemosiderina. Atividade angiogênica estava ausente.

5.1.2.7 *BIODENTINA*

Na área de contato da polpa com o material capeador; observou-se intensa deposição de material calcificado tipo dentinóide. O aspecto morfológico sugeriu uma dentina distrófica. O tecido pulpar adjacente a exposição pulpar apresentou intensa proliferação fibroblástica, pequenos vasos neoformados, hiperplasia, hipertrofia dos odontoblastos (Figura 5.7B).

Neste caso foi observado uma grande deposição de material mineralizado; provavelmente o material apresenta uma intensa capacidade de induzir o processo de calcificação (Figura 5.7B).

Macrófagos e outras células inflamatórias são vistas discretamente no infiltrado inflamatório. Ausência de inflamação aguda e discreta inflamação crônica foram observados na câmara pulpar. Edema, hiperemia e áreas hemorrágicas não foram encontradas na maioria das amostras. Pequenos vasos neoformados e angiogênese moderada também foram observados. Bactérias em contato com a polpa não estavam presentes.

A formação da dentina reparativa foi verificada em todas as amostras. Três das amostras apresentaram ponte dentinária completa; as outras duas demonstraram uma deposição de tecido com pequena área de comunicação do material capeador com a polpa. Além disso, três espécimes apresentaram dentina reparativa sem invadir o

espaço da polpa coronária; entretanto duas amostras desenvolveram uma ponte dentinária espessa invadindo o lado oposto da parede dentinária.

5.1.2.8 *BIODENTINA+COP*

Na maioria dos espécimes observou-se discreto a moderado infiltrado inflamatório com moderada quantidade de polimorfonucleares, mastócitos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos; e ausência de células gigantes. Não foi observado bactérias em contato com a polpa, na maioria das amostras (Figura 5.8B).

Edema, áreas hemorrágicas foram encontradas discretamente na polpa coronária. Discreta inflamação aguda e moderada inflamação crônica foram observadas. A proliferação fibroblástica apresentava moderada com vasos sanguíneos neoformados. Discreta calcificação distrófica, moderada presença de tecido de granulação, pré-dentina espessada e angiogênese estavam evidentes (Figura 5.8B).

O terço coronário apresentava necrose parcial do tipo liquefativa e coagulativa. Ponte de dentina reparativa mostrava com pequenas áreas de comunicação do material capeador com a polpa coronária. Em alguns casos, a ponte dentinária invadiu o espaço da polpa ao lado oposto da parede dentinária (Figura 5.8B).

5.1.3 Análise morfológica descritivas – 28 dias

5.1.3.1 *SEM MATERIAL – Controle*

Neste grupo foi observado ausência de células inflamatórias, ausência de vasos sanguíneos e tecido de granulação, necrose total da polpa. Foi sugerido presença de bactéria em contato com o tecido pulpar (Figura 5.1C).

5.1.3.2 COP

Na maioria dos espécimes observou-se a ausência de infiltrado inflamatório, sendo que algumas amostras apresentaram presença de células com predominância dos eosinófilos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos. Não foi observada presença de células gigantes e mastócitos. Foi sugerido presença de bactérias em contato com a polpa, na maior parte da amostra, não foram encontradas. Edema, hiperemia, áreas hemorrágicas também estavam ausentes (Figura 5.2C).

No terço coronário da polpa observou-se necrose parcial coagulativa e escassas áreas de deposição do tecido mineralizado. No tecido adjacente, observou tecido pulpar com moderada proliferação fibroblástica e ausência de tecido de granulação. Observou-se também vasos jovens e neoformados.

Na região de contato com o material capeador apresentou um arcabouço de tecido dentinóide ainda não mineralizado. Não foi observada formação de uma dentina reparativa (Figura 5.2C).

Na região apical foi observado uma reação do tipo inflamatória mista, apresentando grande quantidade de plasmócitos, neutrófilos, linfócitos, numerosos vasos sanguíneos neoformados, moderada proliferação fibroblástica e fibrose focal (compatível com lesão crônica gengival), numerosos osteoclastos na superfície do osso alveolar. Na região periodontal lateral apresentava uma reação inflamatória predominantemente aguda com numerosos neutrófilos, formação de micro abscessos com áreas de exsudato purulento e diversas áreas de reabsorção cementária.

5.1.3.3 Ca(OH)_2

Infiltrado inflamatório moderado com pequena quantidade eosinófilo, macrófagos, linfócitos, plasmócitos foi observado. Discreta quantidade de bactérias em contato com a polpa foi encontrada na câmara pulpar. Ausência de edema, hiperemia, áreas hemorrágicas. Observou-se também discreta inflamação crônica e ausência de inflamação aguda (Figura 5.3C).

A proliferação fibroblástica apresentava moderada e presença de vasos sanguíneos neoformados estavam presentes. Foi observado ausência de calcificação distrófica, discreta presença de tecido de granulação, pré-dentina espessada, e presença de angiogênese (Figura 5.3C).

No terço coronário não apresentava necrose, entretanto em algumas amostras foi observado presença de uma necrose parcial do tipo liquefativa. Não foi possível visualizar uma camada de odontoblastos regular. A deposição de tecido mineralizado demonstrava irregular e estava depositada tanto nas paredes teciduais da dentina quanto na região de contato com o material capeador (Figura 5.3C).

A formação de dentina reparativa foi verificada em todas as amostras. Três das amostras apresentaram ponte dentinária completa; enquanto duas delas formaram dentina com pequenas áreas de comunicação com material capeador (Figura 5.3C).

No terço médio foi observado a presença de polpa edemaciada e inflamação crônica. Os fibroblastos eram jovens com núcleo amplo e citoplasma evidente. A camada de odontoblastos estava irregular como no terço coronário. O terço apical apresentou vitalidade pulpar com inflamação discreta e deposição de dentina.

5.1.3.4 $\text{Ca(OH)}_2 + \text{COP}$

Na maioria dos espécimes observou-se fraco infiltrado inflamatório com moderada quantidade de polimorfonucleares, eosinófilos, macrófagos, linfócitos; e ausência de células gigantes. Presença de vasos espessados e maduros. Foi observado discreta quantidade de bactérias em contato com a polpa (Figura 5.4C).

Edema, hiperemia, áreas hemorrágicas estavam ausentes na polpa coronária. Foi observada discreta inflamação aguda e ausência de inflamação crônica. Na câmara pulpar não foi verificada a presença de calcificação distrófica. A proliferação fibroblástica apresentava discreta e a pré-dentina se encontrava espessada (Figura 5.4C).

No terço coronário, a camada de odontoblastos apresentava irregular, com ausência de odontoblastos em algumas áreas. Foi observada deposição irregular de tecido duro na parede lateral da câmara pulpar (Figura 5.4C).

Três das amostras não apresentaram necrose, entretanto duas delas demonstraram necrose parcial do tipo coagulativa e liquefativa. No terço médio e apical foram observadas características de processos degenerativos gradual.

5.1.3.5 MTA

Infiltrado inflamatória apresentava escasso e constituído por células polimorfonucleares e linfócitos. Foi observada ausência de hiperemia, áreas hemorrágicas e edema. Inflamação aguda e crônica não estavam presentes. Bactérias não foram encontradas no tecido pulpar. Não foi observada calcificação distrófica e proliferação fibroblástica. Pequena quantidade de vasos jovens foi observada em todo tecido pulpar (Figura 5.5C).

Todas as amostras apresentaram tecido pulpar normal. Observou-se discreta angiogênese e camadas de odontoblastos hiperplasiadas. A ponte dentinária demonstrou completa sem exposição pulpar, ocluindo na área de exposição pulpar sem invadir o espaço da polpa.

O terço médio e apical apresentou tecido pulpar vital com discreta proliferação de fibroblastos e ausência de infiltrado inflamatório.

Eventos reparadores foram maiores do que os eventos degenerativos.

5.1.3.6 MTA+COP

Infiltrado inflamatório apresentava discreto com predominância dos polimorfonucleares, linfócitos. Não foi observado bactérias em contato com a polpa. Edema, hiperemia, áreas hemorrágicas moderadas foram encontradas na polpa coronária. Foi observada moderada presença de inflamação aguda e crônica. Discreta proliferação fibroblástica e tecido de granulação foi observado. Moderada quantidade de material eosinófilo estavam presentes no terço coronário (Figura 5.6C). Na maioria dos espécimes, terço médio e apical apresentaram um padrão de normalidade.

No terço coronário observou-se deposição irregular de tecido duro na parede da cavidade, apresentando áreas de comunicação com o material capeador. Entretanto, uma amostra apresentou ponte dentinária completa (Figura 5.6C).

5.1.3.7 *BIODENTINA*

Intensa deposição de material calcificado tipo dentinóide foi observado. Infiltrado inflamatório, inflamação aguda e crônica não estavam presentes. Pequenos vasos neoformados e a intensa angiogênese também foram observados. Edema ausência, hiperemia e áreas hemorrágicas discretas foram encontradas na polpa coronária. A proliferação fibroblástica variou de ausente a moderada. Não foi observada a presença de tecido de granulação, calcificação distrófica e material eosinófilo amorfo (Figura 5.7C).

Camada de odontoblastos apresentava irregular, com ausência de odontoblastos em algumas áreas. Neste grupo foi observado ponte dentinária completa, ocluindo na área de exposição sem invadir o espaço da polpa (Figura 5.7C). No terço médio e apical, a polpa apresentava com aspecto de normalidade.

5.1.3.8 *BIODENTINA+COP*

Na maioria dos espécimes observou-se moderado infiltrado inflamatório com a presença de polimorfonucleares, eosinófilos, mastócitos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos. Bactérias não foram observadas em contato com a polpa. Edema, hiperemia, áreas hemorrágicas foram encontradas moderadamente na polpa coronária. Inflamação aguda e crônica, e proliferação fibroblástica apresentaram de maneira discreta a moderada. Calcificação distrófica ausente, discreta presença de tecido de granulação, pré-dentina espessada também foram observadas (Figura 5.8C).

O terço coronário apresentava necrose parcial do tipo liquefativa e coagulativa. A ponte de dentina reparativa apresentava com pequenas áreas de comunicação do

material capeador com a polpa coronária. Foi observado também deposição irregular de tecido duro nas paredes da cavidade da exposição, e em alguns casos a ponte dentinária invadiu o espaço da polpa ao lado da parede dentina oposta (Figura 5.8C).

Figura 5.1- Fotomicrografias dos espécimes do grupo SEM MATERIAL. A: período de 7 dias, necrose parcial no tecido pulpar. B: período de 14 dias, necrose total no tecido pulpar da câmara pulpar. C: período de 28 dias, necrose total

Fonte: a autora

Figura 5.2- Fotomicrografias dos espécimes do grupo óleo-resina de copaíba (COP). A: No 7º dia, foi demonstrado necrose parcial com ausência de formação de ponte dentinária. B: período de 14 dias, necrose parcial, moderado processo inflamatório e deposição dentina na parede lateral da câmara pulpar. C: período de 28 dias, vitalidade pulpar em alguns cornos, com pequena deposição dentina abaixo da exposição pulpar; porém na maioria dos casos apresentou necrose parcial

Fonte: a autora

Figura 5.3- Fotomicrografias dos espécimes do grupo hidróxido de cálcio isolado $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$. A: No 7º dia, foi demonstrado pequenas áreas de deposição de tecido mineralizado abaixo da exposição pulpar B: período de 14 dias, necrose e formação de tecido dentinário incompleto na área de exposição pulpar. C: período de 28 dias, necrose parcial e formação de tecido dentinário na área de exposição pulpar

Fonte: a autora

Figura 5.4- Fotomicrografias dos espécimes do grupo hidróxido de cálcio associado ao óleo-resina de copaíba [$\text{Ca}(\text{OH})_2$ +COP]. A: período de 7 dias foi possível observar uma necrose parcial do tecido pulpar sem formação da ponte dentinária. B: período de 14 dias, necrose parcial e presença de fibrose. C: período de 28 dias, necrose parcial

Fonte: a autora

Figura 5.5- Fotomicrografias dos espécimes do grupo agregado de trióxido mineral (MTA). A: período de 7 dias observa necrose parcial e formação irregular de tecido dentinário no local da exposição pulpar. B: período de 14 dias, necrose parcial e deposição irregular de dentina terciária. C: período de 28 dias, o espécime apresentou vitalidade pulpar; deposição lateral de dentina terciária e ponte dentinária completa

Fonte: a autora

Figura 5.6- Fotomicrografias dos espécimes do grupo agregado de trióxido mineral associado ao óleo-resina de copaíba (MTA+COP). A: período de 7 dias foi demonstrado necrose parcial e deposição irregular de tecido duro. B: período de 14 dias apresentou necrose parcial com processos inflamatórios moderado, deposição de tecido duro de maneira irregular no interior da câmara pulpar. C: período de 28 dias, demonstrou necrose parcial com deposição de tecido duro irregular

Fonte: a autora

Figura 5.7- Fotomicrografias dos espécimes do grupo BIODENTINA. A: período de 7 dias foi demonstrado vitalidade pulpar e uma ponte dentinária com pequena área de comunicação do material capeador com a polpa. B: período de 14 dias, vitalidade pulpar e uma ponte dentinária aparentemente completa no local da exposição pulpar. C: período de 28 dias, vitalidade pulpar e uma ponte dentinária completa e espessa

Fonte: a autora

Figura 5.8- Fotomicrografias dos espécimes do grupo BIODENTINA associado ao óleo-resina de copaíba (BIODENTINA+COP). A: período de 7 dias apresentou moderado processo inflamatório com uma pequena formação irregular de tecido duro abaixo da exposição pulpar. B: período de 14 dias, observou uma necrose parcial do tipo coagulativa e uma formação irregular de tecido duro. C: período de 28 dias, deposição de tecido duro no local da exposição pulpar

Fonte: a autora

5.2 Análise estatística da microscopia

5.2.1 7 dias

Neste tempo foi observado necrose parcial em todos os grupos, exceto no grupo de BIODENTINA+COP que apresentou ausência de necrose em todas as amostras analisadas (Gráfico 5.1).

De acordo com os escores estabelecidos e as análises estatísticas realizadas, foi observado um aumento da inflamação crônica no grupo Ca(OH)_2 +COP em relação aos grupos Ca(OH)_2 ($p=0,0373$) e BIODENTINA+COP ($p=0,0304$) (Gráfico 5.2).

A BIODENTINA apresentou uma maior quantidade de edema em relação ao MTA ($p=0,0400$) (Gráfico 5.3). Em relação ao edema (Gráfico 5.3) e o exsudato purulento (Gráfico 5.4), o grupo COP demonstrou uma redução quando comparado ao grupo SEM MATERIAL ($p=0,0476$ e $p=0,0277$, respectivamente).

O grupo BIODENTINA+COP apresentou uma quantidade maior de fibrose do que o grupo de BIODENTINA ($p=0,0376$) (Gráfico 5.5); o mesmo foi observado quanto a presença de material eosinófilo amorfo ($p=0,0457$) (Gráfico 5.6). Entretanto, o grupo Ca(OH)_2 +COP demonstrou uma menor quantidade de material eosinófilo amorfo em relação ao grupo BIODENTINA+COP ($p=0,0162$) (Gráfico 5.6).

O grupo COP e o grupo de BIODENTINA apresentaram um aumento da proliferação fibroblástica em relação aos grupos SEM MATERIAL ($p=0,0366$) e BIODENTINA+COP ($p=0,0262$), respectivamente (Gráfico 5.7).

Foi observado diferença significativa quanto a localização (local da exposição pulpar ou paredes laterais da câmara pulpar) da ponte dentinária entre os grupos MTA+COP e BIODENTINA+COP ($p=0,0436$), sendo que a maioria das amostras do primeiro grupo não demonstrou ponte dentinária formada (Gráfico 5.8).

As outras características analisadas (inflamação aguda; calcificação distrófica; presença de bactéria; uniformidade da camada de odontoblástica; vasos – quantidade, distribuição, maturação; ponte de dentina – continuidade, morfologia, espessura) foram insignificantes em todos os grupos de biomateriais.

Gráfico 5.1- Gráficos referentes ao índice de necrose dos grupos em 7 dias

Fonte: a autora.

Gráfico 5.2- Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Inflamação Crônica) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

Gráfico 5.3- Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Edema) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

Gráfico 5.4- Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Exsudato Purulento) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

Gráfico 5.5- Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Fibrose) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

Gráfico 5.6- Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Material Eosinófilo) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

Gráfico 5.7- Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Proliferação Fibroblástica) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

Gráfico 5.8- Gráficos referentes aos grupos de 7 dias (Ponte de dentina - localização) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

5.2.2 14 dias

Em relação a inflamação aguda, foi observado um aumento significativo entre os grupos MTA e MTA+COP ($p=0,0141$), BIODENTINA e BIODENTINA+COP ($p=0,0209$), demonstrando um aumento no processo inflamatório nos grupos associados a COP. No entanto, nos grupos de Ca(OH)_2 e MTA ($p=0,0086$), Ca(OH)_2 e BIODENTINA ($p=0,0082$) apresentaram uma redução da inflamação aguda (Gráfico 5.9). Assim, o hidróxido de cálcio promoveu um processo inflamatório maior do que os outros grupos analisados.

Foi observado um aumento significativo na inflamação crônica entre os grupos de hidróxido de cálcio e hidróxido de cálcio associado ao óleo de copaíba ($p=0,0323$). Houve também um aumento significativo entre os grupos: MTA e MTA+COP ($p=0,0251$), BIODENTINA e BIODENTINA+COP ($p=0,0185$), Ca(OH)_2 +COP e MTA+COP ($p=0,0089$), Ca(OH)_2 +COP e BIODENTINA+COP ($p=0,0059$); sendo que os primeiros grupos apresentaram uma redução no processo inflamação crônico em relação aos segundos grupos (Gráfico 5.10).

Foi constatado uma redução na presença do edema nos grupos de Ca(OH)_2 e Ca(OH)_2 +COP ($p=0,0271$), Ca(OH)_2 e MTA ($p=0,0153$), Ca(OH)_2 e BIODENTINA ($p=0,0163$) (Gráfico 5.11).

O grupo do MTA apresentou uma camada de odontoblastos mais regular e com odontoblastos normais em comparação com o grupo MTA+COP ($p=0,0075$). Já o Ca(OH)_2 apresentou uma camada mais irregular e ausência de odontoblastos em comparação com o grupo do MTA ($p=0,0015$) e BIODENTINA ($p=0,0040$) (Gráfico 5.12).

Não foi encontrado diferença significativa entre os grupos em relação a formação da ponte dentinária. As outras características analisadas (exsudato purulento; material eosinófilo; proliferação fibroblástica; fibrose; calcificação distrófica; presença de bactéria; tecido de granulação, vasos – quantidade, distribuição, maturação) também foram insignificantes em todos os grupos de biomateriais.

Gráfico 5.9- Gráficos referentes aos grupos de 14 dias (Inflamação Aguda) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

Gráfico 5.10- Gráficos referentes aos grupos de 14 dias (Inflamação Crônica) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

Gráfico 5.11- Gráficos referentes aos grupos de 14 dias (Edema) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

Gráfico 5.12- Gráficos referentes aos grupos de 14 dias (Uniformidade da Camada de Odontoblastos) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

5.2.3 28 dias

Não foi encontrado significância em relação ao processo inflamação entre os grupos de 28 dias. Contudo, foi observado um aumento da intensidade do edema no grupo de MTA+COP em comparação com o MTA isolado ($p=0,0267$) (Gráfico 5.13).

O grupo de Ca(OH)_2 sugeriu apresentar uma quantidade significativa de bactérias (microrganismos) em relação ao MTA ($p=0,0169$) e BIODENTINA ($p=0,0169$). Também foi sugerido um aumento bacteriano no grupo Ca(OH)_2 +COP em comparação com os grupos de MTA+COP ($p=0,0442$) e BIODENTINA+COP ($p=0,0259$) (Gráfico 5.14).

O grupo de Ca(OH)_2 continuou apresentando irregularidade na camada odontoblástica comparado com os grupos MTA ($p=0,009$) e BIODENTINA ($p=0,0116$). A presença do COP mostrou camada de odontoblastos mais irregular e em algumas áreas não havia presença de odontoblastos. Desta forma, foi encontrado significância entre os grupos: SEM MATERIAL e o COP ($p=0,0228$), BIODENTINA e BIODENTINA+COP ($p=0,0259$) (Gráfico 5.15).

Em relação a formação da dentina reparadora, foi observado morfologia parecida a dentina significativamente maior no grupo de BIODENTINA do que no grupo Ca(OH)_2 ($p=0,0164$) que apresentou um aumento de deposição de tecido duro (dentina osteóide) (Gráfico 5.16).

O grupo de BIODENTINA e BIODENTINA+COP apresentaram dentina reparadora mais continua, sem contato do material capeador com a polpa coronária, do que o grupo de Ca(OH)_2 ($p=0,0149$) e Ca(OH)_2 +COP ($p=0,0097$), respectivamente (Gráfico 5.17).

Foi observado que o óleo-resina de copaíba reduziu a espessura da ponte dentinária ao comparar o grupo Ca(OH)_2 e Ca(OH)_2 +COP ($p=0,0257$). Além disso, houve uma diminuição na espessura da ponte de dentina no grupo Ca(OH)_2 +COP quando comparado com os grupos MTA+COP ($p=0,0267$) e BIODENTINA+COP ($p=0,0129$) (Gráfico 5.18).

A BIODENTINA mostrou ponte dentinária, sem invadir a polpa coronária, significativamente melhor que o grupo de BIODENTINA+COP ($p=0,0449$). O mesmo resultado foi observada nos grupos MTA+COP ($p=0,0267$) e BIODENTINA+COP

($p=0,0129$) em comparação ao grupo $\text{Ca(OH)}_2+\text{COP}$ (Gráfico 5.19) que apresentou deposição irregular de tecido no local da exposição pulpar.

As outras características analisadas (inflamação aguda; inflamação crônica; exsudato purulento; material eosinófilo; proliferação fibroblástica; fibrose; calcificação distrófica; tecido de granulação, vasos – quantidade, distribuição, maturação) foram insignificantes em todos os grupos de biomateriais.

Gráfico 5.13- Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Edema) com nível de significância de $p<0,05$

Fonte: a autora.

Gráfico 5.14- Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Bactéria) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

Gráfico 5.15- Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Uniformidade da Camada de Odontoblastos) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora

Gráfico 5.16- Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Ponte de dentina - morfologia) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora

Gráfico 5.17- Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Ponte de dentina - continuidade) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora

Gráfico 5.18- Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Ponte de dentina - espessura) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora

Gráfico 5.19- Gráficos referentes aos grupos de 28 dias (Ponte de dentina - localização) com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora

5.2.4 Relação dos 14 e 28 dias

Ao comparar os dois tempos, não foi observado significância entre os grupos em relação a inflamação aguda. Porém, a inflamação crônica aumentou aos 28 dias no grupo de Ca(OH)_2 associado ao COP ($p=0,0263$). Foi observado também redução da intensidade do edema no terço coronário no grupo de hidróxido de cálcio ($p=0,0175$) aos 28 dias. No grupo COP ($p=0,0185$) foi observado diminuição da hiperemia aos 28 dias. O número de áreas hemorrágicas reduziu no grupo de Ca(OH)_2 ($p=0,0296$), entretanto, no grupo de BIODENTINA+COP ($p=0,0420$) houve aumento dessas áreas no 28º dia. A quantidade dos vasos no terço coronário diminuiu significativamente nos grupos de COP ($p=0,0470$) e BIODENTINA ($p=0,0209$) aos 28 dias (Gráfico 5.20). Ademais, foi observado uma redução da necrose no grupo BIODENTINA e MTA ao 28º dia (Gráfico 5.21).

Em relação a formação do tecido de granulação, o grupo Ca(OH)_2 apresentou uma diminuição significativa aos 28 dias ($p=0,0353$). Foi observado também um aumento da quantidade bacteriana no grupo Ca(OH)_2 +COP ($p=0,0019$) aos 28 dias (Gráfico 5.20).

A camada de odontoblastos tornou-se mais irregular, apresentando aumento de regiões que não apresentavam essas células, no grupo SEM MATERIAL ($p=0,0259$) e no grupo Ca(OH)_2 +COP ($p=0,0086$). Foi identificado uma descontinuidade maior da ponte dentinária nos grupos de COP ($p=0,0470$) e Ca(OH)_2 +COP ($p=0,0430$). Entretanto, não foi demonstrado alteração na morfologia da dentina recém-formada. Em relação a espessura, foi observado aumento dessa aos 28 dias nos grupos: MTA ($p=0,0285$), Ca(OH)_2 ($p=0,0066$), MTA+COP ($p=0,0307$), BIODENTINA+COP ($p=0,0129$). O MTA mostrou ponte dentinária, fechando o local da exposição pulpar, significativamente melhor aos 28 dias do que aos 14 dias ($p=0,0285$). Os outros grupos não demonstraram diferenças significantes em relação a localização (Gráfico 5.22).

Gráfico 5.20- Gráficos referentes ao processo inflamatório, comparando 14 e 28 dias, com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

Gráfico 5.21- Gráficos referentes a presença e ausência de necrose nos grupos dos materiais, comparando os grupos de 14 e 28 dias.

Fonte: a autora.

Gráfico 5.22- Gráficos referentes a formação de ponte dentinária, comparando 14 e 28 dias, com nível de significância de $p < 0,05$

Fonte: a autora.

5.3 Microtomografia computadorizada de alta resolução

5.3.1 Superfície da dentina

As médias, desvio padrão para a superfície de dentina analisada aos 28 dias, mm², estão expressos na tabela 5.1. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) quanto a quantidade de dentina formada de acordo com os testes ANOVA para duas variáveis e o teste de Tuckey. O grupo de $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{COP}$ apresentou um aumento de dentina em comparação com o grupo $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ($p = 0,0357$) (Gráfico 5.1). Estes resultados demonstram que o COP induziu o hidróxido de cálcio a produzir uma maior quantidade de dentina na câmara pulpar, demonstrado na figura 5.23 (Figura 5.9).

Tabela 5.1- Superfície da dentina (mm²) avaliada após 28 dias de exposição pulpar e inserção dos materiais avaliados (médias e desvios-padrão)

Dados Estatísticos	HCA	HCA+COP	MTA	MTA+COP	BIO	BIO+COP
Número de Amostra	10	10	10	10	10	10
Média	0,804857	1,530826	0,816579	0,828092	0,794138	0,90283
Desvio Padrão	0,308322	0,996491	0,483881	0,547713	0,489408	0,539682

Fonte: a autora.

Gráfico 5.23- Análise da superfície (mm²) de dentina formada pelos materiais analisados, com nível de significância de $p < 0,05$.

Fonte: a autora.

5.3.2 Volume da dentina

As médias, desvio padrão do volume de dentina analisada aos 28 dias, mm^3 , estão expressos na tabela 5.2. Na comparação entre os grupos empregando-se os testes ANOVA para duas variáveis e o teste de Tuckey, houve diferença estatisticamente ($p < 0,05$) relevante entre os grupos $\text{Ca(OH)}_2 + \text{COP}$ e Ca(OH)_2 ($p = 0,0498$), o que confirma os resultados anteriores (Gráfico 5.24) (Figura 5.9).

Tabela 5.2- Volume da dentina (mm^3) avaliada após 28 dias de exposição pulpar e inserção dos materiais avaliados (médias e desvios-padrão)

Dados Estatísticos	HCA	HCA+COP	MTA	MTA+COP	BIO	BIO+COP
Número de Amostra	10	10	10	10	10	10
Média	0,016077	0,036242	0,017718	0,017819	0,016748	0,021527
Desvio Padrão	0,007964	0,031072	0,011948	0,018692	0,010591	0,01653

Fonte: a autora.

Gráfico 5.24- Análise do volume (mm^3) de dentina formada pelos materiais analisados, com nível de significância de $p < 0,05$.

Fonte: a autora.

Figura 5.9- A- Grupo SEM MATERIAL. B- Grupo COP. C- Grupo Ca(OH)_2 . D- Grupo Ca(OH)_2 +COP. E- Grupo MTA. F- Grupo MTA+COP. G- Grupo BIODENTINA. H- Grupo BIODENTINA+COP

Fonte: a autora.

6 DISCUSSÃO

Capeamento pulpar direto é um tratamento para polpa vital exposta que envolve a inserção de um material dentário sobre a superfície da polpa para facilitar tanto a formação de uma barreira de proteção (Couve, 1986; Pashley, 1996) quanto a manutenção da vitalidade pulpar (Bergenholtz, 2005).

O capeamento tem sido utilizado como uma alternativa para a manutenção da vitalidade pulpar, evitando até 22 milhões de tratamentos endodônticos por ano nos Estados Unidos da América (ADA, 2005-2006). Destes casos, milhares falham devido a recorrência de sintomas ou pela necrose pulpar e a ocorrência de periodontite apical (Figdor, 2002). Stanley (1998) e Bender (2000) hipotetizaram que muitos extrações dentárias e tratamentos endodôntico poderiam ser evitados através da abordagem conservadora do capeamento pulpar direto. Assim sendo, a proposição deste estudo foi verificar se o óleo de copaíba, substância anti-inflamatória e cicatrizante, poderia potencializar a ação dos materiais utilizados atualmente para capeamento pulpar [$\text{Ca}(\text{OH})_2$, MTA, BIODENTINA] formando ponte de dentina mais homogênea e, conseqüentemente, mantendo a vitalidade pulpar por mais tempo.

Portanto, para se obter o sucesso do capeamento pulpar, os materiais utilizados devem modular o processo inflamatório, ser antibacteriano, estimular a formação de dentina. Além disso, os materiais deveriam aderir a dentina remanescente e ao material restaurador, evitando a microinfiltração e, conseqüentemente, mantendo a vitalidade do tecido pulpar (Cohen; Combe, 1994; Tjaderhane, 2002; Ferracane et al., 2010; Qureshi et al., 2014).

Durante muitos anos, a inflamação da polpa dentária foi considerada mais como um fator negativo levando a destruição do tecido por necrose e apoptose. Entretanto, alguns resultados sobre as reações às lesões cariosas e/ou implantação de biomoléculas sugerem que a reação inflamatória seria um pré-requisito para a migração de células progenitoras durante o reparo pulpar (Goldberg; Smith, 2004). Desta forma, eventos inflamatórios, caracterizados por alterações vasculares, contribuem para a fase inicial do reparo pulpar, especialmente se existe uma ligação direta entre a liberação de citocinas e o comprometimento de algumas células pulpares para o fenótipo progenitor de odontoblastos e osteoblastos (Jontell et al., 1998; Goldberg; Smith, 2004; Staquet et al., 2008).

Diante disso, neste estudo observou-se uma menor inflamação aguda e crônica de todos os grupos não associados ao COP, entre 7 e 28 dias. Entre esses grupos foi observado aumento da inflamação aguda no Ca(OH)_2 quando comparado aos grupos de MTA ($p=0,0086$) e BIODENTINA ($p=0,0082$). Esse aumento do processo inflamatório no grupo de hidróxido de cálcio e resposta inflamatória mínima no MTA e na Biodentina foram observados por outros trabalhos (Mente et al., 2010; Tran et al., 2012; Nowicka et al., 2015). Em adição, o estudo demonstrou que o MTA e a Biodentina produziram resposta inflamatória similar. Este resultado concorda com estudos anteriores reportando que a Biodentina e o MTA não promovem inflamação severa e destruição celular ou tecidual (Nowicka et al., 2013; Chang et al., 2014; Nunez et al., 2014).

Inúmeros materiais encontrados na natureza como o Óleo de Copaíba têm sido utilizados como anti-inflamatórios e antimicrobianos na medicina popular (Teixeira et al., 2013; Yasojima et al., 2013). Assim, trabalhos tem mostrado que os principais componentes do COP responsáveis por essas propriedades são diterpenos e sesquiterpenos, como bisabolol e beta betacariofileno (Veiga Junior; Maciel, 2005). Acredita-se que o fator determinante dessa substância ocorre devido a modulação da resposta inflamatória e subsequente prejuízo causado por radicais livres e citocinas pró-inflamatórias (Teixeira et al., 2013; Yasojima et al., 2013). Desta forma, o COP pode promover uma inibição do edema (Basile et al., 1988; Viriato et al., 2009; Martins; Silva, 2010) e do exsudato purulento (Martins; Silva, 2010), redução da formação de granuloma (Basile et al., 1988), diminuição da permeabilidade vascular devido a liberação intradérmica de histamina (Basile et al., 1988).

No presente estudo também foi observada redução do processo inflamatório com o tempo nos grupos associados a COP. Entretanto, o grupo Ca(OH)_2 +COP ($p=0,0263$) apresentou aumento do processo inflamatório após 28 dias. Quando os grupos foram analisados separadamente, foi observado resposta inflamatória crônica maior no grupo Ca(OH)_2 +COP em relação ao grupo Ca(OH)_2 ($p=0,0373$). Adicionalmente a esses resultados, a resposta inflamatória aguda apresentou-se maior no grupo MTA+COP e BIODENTINA+COP comparados com os grupos sem copaíba [MTA ($p=0,0141$) e BIODENTINA ($p=0,0209$)] no 14º dia após a inserção do material em contato com a polpa. Estes resultados contrapõem aos inúmeros trabalhos que relatam a eficiência do COP na redução do processo inflamatório. Isto pode estar associado ao fato da COP interferir na presa do MTA e da BIODENTINA,

o que poderia prejudicar o selamento da cavidade favorecendo microinfiltrações marginais e posterior contaminação. Além disso, a resposta inflamatória pulpar reduzida no MTA (Koubi et al., 2013) e na Biodentina (Aqrabawi, 2000) pode ser atribuída a sua baixa solubilidade e pela excelente capacidade de selamento desses materiais.

Por conseguinte, foi encontrado redução do edema do grupo $\text{Ca(OH)}_2 + \text{COP}$ comparado com o Ca(OH)_2 ($p=0,0271$), resultado semelhante a estudos anteriores (Basile et al., 1988; Viriato et al., 2009; Martins; Silva, 2010). Entretanto, o MTA+COP apresentou aumento do edema em relação ao MTA (0,0267) ao 28º dia. Além do mais, este estudo demonstrou que no décimo-quarto dia o grupo de Ca(OH)_2 apresentou aumento do edema em relação ao MTA ($p=0,0153$) e a BIODENTINA ($p=0,0163$).

Como esperado, o grupo controle (SEM MATERIAL) apresentou aumento do edema, exsudato purulento, e redução da proliferação fibroblástica em relação ao grupo COP; demonstrando que neste grupo não houve processo de reparação e regeneração tecidual.

O reparo tecidual é um estado dinâmico que compreende diferentes fases como inflamação, proliferação celular e síntese de elementos que constituem a matriz extracelular (colágeno, elastina e fibras reticulares) (Thomas et al., 1995). Além disso, a reparação constitui o processo responsável pela reconstrução dos tecidos conjuntivos, por meio da formação do tecido de granulação. Sendo que quase sempre restabelece a anatomia e a fisiologia da região envolvida. Tanto as células quanto os mediadores apresentam papel importante no processo de recuperação da área perdida com a formação do tecido de granulação e sua substituição a tecido conjuntivo maduro. Em situações clínicas específicas, o profissional pode utilizar recursos terapêuticos para prevenir a ocorrência de alterações durante a formação do tecido de granulação (Consolaro, 2015).

Diante disso, normalmente o reparo do tecido se inicia com estágio de granulação e posteriormente se observa predominância de macrófagos e crescimento do número de fibroblastos produzindo uma nova matriz extracelular, promovendo remodelação desses tecidos com a redução do tecido de granulação (Consolaro, 2015). Assim, durante a formação da matriz, os fibroblastos podem produzir grandes quantidade de MEC. A formação do colágeno inicia no 21º dia após a lesão, e o retorno do tecido aos aspectos de normalidade, no 26º dia (Scharffetter et al., 1989). Com o fechamento da ferida e estando envolvida pelo tecido de granulação, ocorre

diminuição de macrófagos e fibroblastos, consequentemente, processo de cicatrização (Zitelli, 1989). Adicionalmente, a barreira de dentina pode se formar após o tecido mumificado ter sido substituído por tecido de granulação, o qual diferencia em novos odontoblastos (Stanley; Lung, 1972).

Diante do exposto, este trabalho observou aumento significativo de fibrose no grupo de BIODENTINA+COP em comparação com o grupo BIODENTINA ($p=0,0376$) somente ao 7º dia; sendo que o primeiro grupo apresentou fibrose moderada no terço coronário e o segundo grupo não mostrou presença de fibrose. A partir do 14º dia ambos não apresentavam fibrose em 100% dos casos analisados. Isto sugere a ocorrência de processo de reparo, já que a fibrose se caracteriza por ser um tecido conjuntivo em formação.

Ademais, foi demonstrado que ao 14º dia o grupo de Ca(OH)_2 apresentou um aumento do tecido de granulação comparado ao 28º dia ($p= 0,0353$). Ao 14º dia, 37,5% das amostras de Ca(OH)_2 apresentaram tecido de granulação na fase inicial com grande quantidade de vasos e fibroblastos e 37,5% dessas apresentavam tecido na fase reparativa com poucos vasos e maior proliferação fibroblástica. Entretanto, no 28º dia 83,33% dos casos de Ca(OH)_2 já não apresentavam tecido de granulação, demonstrando a evolução do reparo tecidual ou a falta deste, já que somente 66,66% dos casos apresentaram formação de tecido.

Outro processo importante para a reparação tecidual é a proliferação fibroblástica. Neste estudo, foi observado diferença significativa entre os grupos de BIODENTINA e BIODENTINA+COP ($p=0,0262$) no 7º dia. O primeiro grupo apresentou moderada quantidade de fibroblastos, entre 25 e 50 células, em 80% das amostras analisadas. No entanto, o segundo grupo apresentou fraca presença de fibroblastos, até 25 células, em 100% das amostras. No 14º dia, o grupo BIODENTINA+COP apresentava a mesma quantidade de fibroblastos que o grupo BIODENTINA, isto é, em 80% dos espécimes. Já ao 28º dia, 60% das amostras de BIODENTINA não apresentavam fibroblastos e 60% de BIODENTINA+COP continuavam apresentando fraca quantidade destas células. Isto demonstrou que o processo de reparo foi melhor e mais eficiente no grupo da BIODENTINA, claramente observado com a formação de dentina terciária de melhor qualidade.

Desta maneira, nosso estudo demonstrou que a inflamação da polpa após o capeamento pulpar foi compatível com o processo de reparo tecidual e a formação de tecido dentinário. Durante o processo de capeamento pulpar direto, a síntese de

colágeno pelos fibroblastos durante o processo inflamatório é um evento chave para o reparo da polpa humana (Shimabukuro et al., 2009). Assim, uma inflamação reversível tem um efeito benéfico no processo de reparo do tecido pulpar (Goldberg et al., 2008). Sendo esta diagnosticada clinicamente pelos testes de sensibilidade e sua resposta sendo pulpita reversível.

A presença de inflamação leve a moderada pode aparecer após o capeamento pulpar fazendo parte do processo inicial do reparo pulpar. A partir dessa inflamação que se inicia o processo de remoção do tecido necrótico, proporcionando condições ideais para a reparação total do tecido pulpar (Fitzgerald, 1979; Schroder, 1985).

A necrose da superfície também causa uma ligeira irritação e forma uma ponte de dentina reparadora através da diferenciação celular, secreção da matriz extracelular e subsequente mineralização, com o objetivo de defesa e reparo (Schroder, 1985). Entretanto, se a expressão dos mediadores inflamatórios persistir, a inflamação torna-se insustentada pela polpa, criando um turbilhão de efeitos citotóxicos e ruptura do tecido que, em última instância, conduz a necrose tecidual permanente (Schmalz; Galler, 2011; Cooper et al., 2010; Cooper; Smith, 2013).

Desta forma, foi encontrado no sétimo dia necrose total em algumas amostras: 20% do controle (SEM MATERIAL); 16,67% do COP; 16,6% do Ca(OH)_2 +COP. No 14º dia, foi demonstrado necrose total em 80% das amostras de SEM MATERIAL; 50% do Ca(OH)_2 ; 50% do grupo de Ca(OH)_2 +COP; 16,67% do MTA. Ao 28º dia, 100% dos espécimes do controle (SEM MATERIAL), 57,15% do COP, 16,67% do Ca(OH)_2 e 20% do BIODENTINA+COP apresentavam necrose total. A ausência de necrose no 28º dia demonstrou a eficiência de cada material na produção do tecido dentinário: 14,28% do COP, 66,66% do Ca(OH)_2 , 60% do Ca(OH)_2 +COP, 100% do MTA, 25% do MTA+COP, 100% do BIODENTINA, 20% do BIODENTINA+COP. Adicionalmente, a maioria das amostras apresentaram necrose parcial no 14º dia se recuperando no 28º dia, sugerindo que a necrose por coagulação promovida pelos materiais protetores pode ser recuperada, promovendo o reparo do tecido.

Além disso, quando o Ca(OH)_2 está em contato com o tecido pulpar, ocorre uma cauterização superficial formando uma zona de necrose por coagulação (Holland, 1971), já com o MTA e BIODENTINA praticamente não ocorre formação da zona de necrose superficial. Entretanto, quando ela estiver presente é mais delgada do que o Ca(OH)_2 , sugerindo pouca penetração dos íons hidroxila (Holland et al., 2001; Bernabé; Holland, 2003).

Neste estudo foi utilizado hidróxido de cálcio, que apresenta pH 12,5 a 12,8 (Schroder, 1985; Mohammadi; Dummer, 2011), somente algum tempo depois da sua manipulação, apresentando uma agressão maior ao tecido pulpar comparado ao MTA e Biodentina, que apresenta também pH ao redor de 12,5 até a reparação tecidual (Naik et al., 2014; Malkondu et al., 2014). Desta forma, o hidróxido de cálcio poderia levar a uma resposta inflamatória mais intensa da polpa, indicando uma maior liberação de íons hidroxila e, conseqüente, apresenta uma maior camada de necrose superficial (Bernabé; Holland, 2003). Além do pH, outros fatores podem estar associados com o grau de inflamação pulpar como trauma mecânico da exposição, material colocado sob a polpa sangrante, contaminação bacteriana (Tziafas, 1994).

No 28º dia, foi sugerida presença de bactérias no tecido da polpa coronária: 42,85% dos espécimes no grupo de COP, 100% das amostras de Ca(OH)_2 e do grupo de Ca(OH)_2 +COP; pela técnica de coloração empregada HE. Nos outros grupos não foi observado presença de bactéria no interior da câmara pulpar. A presença de bactéria no tecido pulpar pode alterar o grau de inflamação e a reparação tecidual. Entretanto, as técnicas de fixação e descalcificação histológicas podem reduzir o número de bactérias presentes (Wijnbergen; Van Mullem, 1991; Hebling et al., 1999), ou ainda elas podem aderir-se à restauração que é removida durante o processo.

Apesar que neste trabalho o MTA não sugeriu a presença de bactérias no 28º dia pelo HE, a atividade antibacteriano do MTA é eficiente somente sobre algumas bactérias facultativas (Torabinejad et al., 1995). O MTA demonstrou, em alguns casos, ser inferior a atividade antimicrobiana em relação ao hidróxido de cálcio ou óxido de zinco / pasta de eugenol (Miyagak et al., 2006; Tanomaru-Filho et al., 2007; Asgary; Kamrani, 2008; Okiji; Yoshida, 2009).

Em muitos casos clínicos, a exposição pulpar ocorre devido a processos cariosos e traumáticos em que o grau da inflamação é muito alto. Entretanto, embora o uso de dentes vitais e saudáveis para este tipo de estudo tenha limitações, ele ainda tem o benefício da padronização e pode ser considerado aceitável em relação à seleção e manuseio de materiais.

O COP associado a todos materiais testados (Ca(OH)_2 , MTA, BIODENTINA) parece atrasar o reparo e induzir maior formação de dentina na parede dentinária em vez de formá-la no local da exposição. Adicionalmente, a falta de resultados positivos em relação a formação da ponte de dentina reparadora após a inserção dos materiais experimentais na polpa *in vivo* poderia ser devido ao modelo escolhido.

Estudos preliminares demonstraram que o COP potencializou a atividade de Ca(OH)_2 em relação a formação de tecido mineralizado e a atividade antimicrobiana (Bandeira et al., 1999; Pinheiro, 1993; Vasconcelos et al., 2008). Neste estudo foi demonstrado que o COP não diminuiu a atividade bacteriana do Ca(OH)_2 e aumentou a formação de dentina nas paredes ao redor da câmara pulpar em 80% das amostras, sugerindo que neste grupo apresentou uma maior quantidade de dentina produzida observada na micro-CT. Sendo que 66,66% das espécimes do Ca(OH)_2 apresentaram apenas uma deposição irregular de tecido duro no local da lesão com pequenas áreas de comunicação do material capeador com a polpa.

Entretanto, de acordo com estudos, o sucesso do hidróxido de cálcio decresce com o tempo. As taxas são mais de 90% depois de 1 a 2 anos e caem de 82% para 37% depois de 2 a 5 anos (Mente et al., 2014), ou 80%, 68%, 59% depois de 1, 5 e 9 anos, respectivamente (Willershausen et al., 2011). Embora o hidróxido de cálcio tenha sido bem aceito clinicamente, apresenta algumas desvantagens, incluindo a reabsorção gradual após a sua inserção. Outra desvantagem é a porosidade na dentina recém-formada, conhecida como defeitos do túnel, resultando em microinfiltração e levando à perda de vitalidade dentária e calcificação (Aguilar; Linsuwanont, 2011). Esta formação em túnel também foi observada nesta pesquisa. Esses defeitos de túnel não apenas deixam de proporcionar uma ponte dentinária permanente, mas também não fornece um selamento biológico, à longo prazo, contra infecção bacteriana. Outra desvantagem do hidróxido de cálcio é a dissolução (Cox; Suzuki, 1994). Isso pode levar à formação de um espaço morto (Taira et al., 2011) e a microinfiltração (Cox; Suzuki, 1994). Para observar todas essas características em relação ao COP associado ao Ca(OH)_2 , estudos clínicos devem ser realizados e acompanhados durante um tempo determinado.

A presença de ponte de dentina observada nos grupos de MTA / BIODENTINA foi em média de 80% e 100% dos casos respectivamente, sendo consistente com achados na literatura (Han; Okiji, 2013; De Rossi et al., 2014; Mente et al., 2014; Elumalai et al., 2015; Louwakul; Lertchirakarn, 2015). BIODENTINA foi capaz de induzir a formação de uma ponte mais grossa e homogênea quando comparado com o MTA, resultado semelhante ao trabalho de De Rossi et al. (2014). Desta forma, estudos sobre a cobertura direta da polpa com a Biodentina sugerem que este material apresenta um melhor efeito dentinogênico reparador, resultando em uma formação de ponte dentinária reparadora mais rápida e presença de dentina tubular normal (Tran

et al., 2012; Malkondou et al., 2014). Em outros estudos, a BIODENTINA demonstrou ter eficácia semelhante à do MTA no capeamento pulpar direto em polpas de molares expostas mecanicamente: formação completa da ponte de dentina, ausência de inflamação no tecido pulpar, camada de odontoblastos bem-dispostos e presença de células semelhantes ao odontoblastos (Laurent et al., 2012; Nowicka et al., 2013).

No entanto, quando foi acrescentado COP ao MTA e a BIODENTINA, a ponte dentinária apresentou irregular e com áreas de comunicação do material capeador com a polpa. Estes resultados foram opostos a alguns trabalhos que demonstraram que o COP apresentou propriedades reparadoras (Stupp et al., 2008) e induziu a formação de tecido mineralizado (Bandeira et al., 1999). Adicionalmente, foi encontrado 75% das amostras do grupo MTA+COP apresentaram dentina irregular e incompleta; somente 20% dos espécimes do BIODENTINA+COP continham dentina completa e homogênea. As vantagens dos materiais à base de silicato tricálcio na polpa de cobertura direta podem incluir o pH fisiológico, a ausência de tecido necrótico na polpa dentária adjacente e a ponte dentinária mais densa (Malkondou et al., 2014; Bidar et al., 2014).

Embora a avaliação histológica da ponte de dentina seja comumente aceita como padrão-ouro, a micro-CT representa uma técnica inovadora e não invasiva que oferece a possibilidade de estudar o tecido dental sem a necessidade de destruí-lo. Além disso, a presença de três dimensões elimina a sobreposição das estruturas, permitindo realizar uma imagem de microestruturas no interior da amostra com alta resolução espacial (Nielsen et al., 1995; Verma; Love, 2011).

Sobre a micro-CT, tecido duro formado no interior da câmara pulpar no grupo de Ca(OH)_2 associado ao COP foi mais espessa do que a vista nos outros grupos. No entanto, esse tecido não se apresentava homogêneo e não se encontrava restritamente no local da exposição pulpar. Quando comparado com o grupo MTA e BIODENTINA, o grupo do hidróxido de cálcio mostrou uma irregularidade com a formação de túnel. Adicionalmente, o grupo da BIODENTINA apresentou um tecido recém-formado mais espesso e mais homogêneo do que o grupo do MTA. Esses resultados foram relatados em outro estudo *in vivo* (Al-Hezaimi et al., 2011). Os grupos do MTA+COP e BIODENTINA+COP apresentaram tecido duro irregular e com pequenas áreas de comunicação em relação com os grupos sem COP (MTA, BIODENTINA). Estes resultados confirmaram os exames histológico; entretanto, no

grupo Ca(OH)_2 +COP não se consegue observar essa grande quantidade de dentina produzida como na micro-CT.

Diante de todos os resultados, tanto MTA quanto a BIODENTINA causaram inflamação aguda leve a moderada, e fraca inflamação crônica no tecido pulpar com infiltrado predominantemente polimorfonucleares. Quando foi acrescentado a copaíba nestes produtos, a inflamação aguda se tornou mais intensa com predominância de linfócitos. Os grupos do MTA e da BIODENTINA apresentaram ausência de necrose, sendo que nenhum espécime demonstrou necrose total no 28º dia. Desta forma, a BIODENTINA apresentou um desempenho significativamente melhor do que os outros grupos analisados. O MTA demonstrou uma eficiência na formação da ponte dentinária, porém possuía uma espessura de dentina menor, além de apresentar uma maior quantidade de amostra com ausência de dentina reparativa, em torno de 20%, comparado com a BIODENTINA. O desempenho inferior do MTA+COP, BIODENTINA+COP pode estar relacionado à interferência na presa do material, sua consistência, bem como a deficiência de selamento marginal e, conseqüentemente, microinfiltração. Estes materiais não fornecem uma superfície sólida, perdendo a sua capacidade de vedação.

Desta forma, outros estudos clínicos devem ser realizados para verificar a eficácia desse material quanto a sua adesividade à dentina e o seu processo de reparação do tecido pulpar.

7 CONCLUSÃO

O acréscimo do óleo-resina de copaíba aos materiais utilizados como capeador pulpar - Ca(OH)_2 , MTA e BIODENTINA – não influenciou na formação de uma dentina reparadora completa e homogênea no local da exposição pulpar, sendo que na maioria dos casos esteve associado com eventos degenerativos.

REFERÊNCIAS¹

Abd-Elmeguid A, Yu DC, Kline LW, Moqbel R, Vliagoftis H. Dentin matrix protein-1 activates dental pulp fibroblasts. *J Endod*. 2012 Jan;38(1):75-80. doi: 10.1016/j.joen.2011.10.005.

Abd-Elmeguid A, Abdeldayem M, Kline LW, Moqbel R, Vliagoftis H, Yu DC. Osteocalcin expression in pulp inflammation. *J Endod*. 2013 Jul;39(7):865-72. doi: 10.1016/j.joen.2012.12.035.

Accorinte M de L, Holland R, Reis A, Bortoluzzi MC, Murata SS, Dezan E Jr, Souza V, Alessandro LD. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. *J Endod*. 2008 Jan;34(1):1-6.

ADA – American Dental Association 2005-2006. Survey of dental services rendered and distribution of dentists in the United States by region and state. Chicago: Survey Center; 2005-2006.

Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J*. 2003 Mar;36(3):225-31.

Aguilar P, Linsuwanont P. Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *J Endod*. 2011 May;37(5):581-7. doi: 10.1016/j.joen.2010.12.004.

Al Anezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 May;109(3):e122–5. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.11.028.

Al-Hezaimi K, Al-Tayar BA, Bajuaifer YS, Salameh Z, Al-Fouzan K, Tay FR. A hybrid approach to direct pulp capping by using emdogain with a capping material. *J Endod*. 2011 May;37(5):667-72. doi: 10.1016/j.joen.2011.02.003.

Al-Hiyasat AS, Barrieshi-Nusair KM, Al-Omari MA. The radiographic outcomes of direct pulp-capping procedures performed by dental students: a retrospective study. *J Am Dent Assoc*. 2006 Dec;137(12):1699-705.

^{1 1} De acordo com o estilo Vancouver.

Almeida MR, Darin JD, Hernandez LC, de Souza Ramos MF, Antunes LM, de Freitas O. Genotoxicity assessment of Copaiba oil and its fractions in Swiss mice. *Genet Mol Biol.* 2012 Jul;35(3):664–72. doi: 10.1590/S1415-47572012005000052.

Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, Tuan RS, Huang GT. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med.* 2010 Jul;5(4):617-31. doi: 10.2217/rme.10.30.

AlShwaimi E, Majeed A, Ali AA. Pulpal responses to direct capping with betamethasone/gentamicin cream and mineral trioxide aggregate: histologic and micro-computed tomography assessments. *J Endod.* 2016 Jan;42(1):30-5. doi: 10.1016/j.joen.2015.09.016.

Aqrabawi J. Sealing ability of amalgam super-EBA cement, and MTA when used as retrograde filling materials. *Br Dent J.* 2000 Mar;188(5):266-8.

Armstrong WP, Hoffman S. Pulp cap study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Dec;15(12):1505–9.

Asgary S, Kamrani FA. Antibacterial effects of five different root canal sealing materials. *J Oral Sci.* 2008 Dec;50(4):469-74.

Asgary S, Parirokh M, Eghbal MJ, Brink F. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. *J Endod.* 2005 Feb;31(2):101-3.

Auschill TM, Arweiler NB, Hellwig E, Zamani-Alaei A, Sculean A. Success rate of direct pulp capping with calcium hydroxide. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2003;113(9):946-52.

Baek SH, Plenk H Jr, Kim S. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, Super eba, and mta as root-end filling materials. *J Endod.* 2005 Jun;31(6):444-9.

Bakland LK, Andreasen JO. Will mineral trioxide aggregate replace calcium hydroxide in treating pulpal and periodontal healing complications subsequent to dental trauma? A review. *Dent Traumatol.* 2012 Feb;28(1):25-32. doi: 10.1111/j.1600-9657.2011.01049.x.

Bal C, Alacam A, Tuzuner T, Tirali RE, Baris E. Effects of antiseptics on pulpal healing under calcium hydroxide pulp capping: a pilot study. *Eur J Dent*. 2011 Jul;5(3):265-72.

Bandeira MF, Lima GR, Lopes PP, Toda C, Venâncio GN, Lima GA, de Vasconcellos MC, Martins LM, Sampaio FC, Conde NC. Dentin cleaning ability of an amazon bioactive: evaluation by scanning electron microscopy. *Open Dent J*. 2016 May; 11;10:182-7. doi: 10.2174/1874210601610010182.

Bandeira MFCL, Oliveira MRB, Pizzolitto AC, Benatti Neto C. Preliminary study of the activity antibacterial of the essencial oil and of the resin of the *Copaífera multijuaga* (copaiba oil), associated to the zinc oxide and to calcium hydroxide. *JBC: J Bras Clin. Estet Odontol*. 1999 Set;3(17):46-51.

Barkhordar R, Ghani Q, Russell T, Hussain M. Interleukin-1beta activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. *J Endod*. 2002 Mar;28(3):157-9.

Barthel CR, Rosenkranz B, Leuenberg A, Roule JF. Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. *J Endod*. 2000 Sept;26(9):525-8.

Basile AC, Sertié JAA, Freitas PCD, Zanini AC. Anti-inflammatory activity of oleoresin from Brazilian *copaifera*. *J. Ethnopharmacol*. 1988 Jan;22(1):101-9.

Beetke E, Wenzel B, Lau B, Bienengraber V. Direct capping of the artificial exposed pulp in teeth with deep caries. *Stomatol DDR*. 1990 Jun;40(6):246-9.

Bender IB. Reversible and irreversible painful pulpitis: diagnosis and treatment. *Aust Endod J*. 2000 Apr;26(1):10-4.

Bergenholtz G. Advances since the paper by Zander and Glass (1949) on the pursuit of healing methods for pulpal exposures: historical perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Aug;100 (Suppl):S102-8

Bergenholtz G, Axelsson S, Davidson T, Frisk F, Hakeberg M, Kvist T, Norlund A, Petersson A, Portenier I, Sandberg H, Tranæus S, Mejare I. Treatment of pulps in teeth affected by deep caries - A systematic review of the literature. *Singapore Dent J*. 2013 Dec;34(1):1-12. doi: 10.1016/j.sdj.2013.11.001.

Bernabé PF, Holland R. MTA e cimento Portland: considerações sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas. In: Cardoso RJA, Machado MEL, Odontologia arte e conhecimento. São Paulo: Artes Médicas; 2003. p. 225-64.

Bertassoni LE, Stankoska K, Swain MV. Insights into the structure and composition of the peritubular dentin organic matrix and the lamina limitans. *Micron*. 2012 Feb;43(2-3):229-36. doi: 10.1016/j.micron.2011.08.003.

Bidar M, Zarrabi MH, Tavakol Afshari J, Aghasizadeh N, Naghavi N, Forghanirad M, Attaran N. Osteoblastic cytokine response to gray and white mineral trioxide aggregate. *Iran Endod J*. 2011 Summer;6(3):111-5.

Bidar M, Naghavi N, Mohtasham N, Sheik-Nezami M, Fallahrastegar A, Afkhami F, Attaran Mashhadi N, Nargesi I. Mineral trioxide aggregate and portland cement for direct pulp capping in dog: a histopathological evaluation. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2014 Summer;8(3):134-40. doi: 10.5681/joddd.2014.025.

Bortoluzzi EA, Broon NJ, Bramante CM, Consolaro A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernadineli N. Mineral Trioxide Aggregate with or without calcium chloride in pulpotomy. *J Endod*. 2008 Feb;34(2):172-5. doi: 10.1016/j.joen.2007.09.015.

Boskey AL, Maresca M, Doty S, Sabsay B, Veis A. Concentration-dependent effects of dentin phosphophoryn in the regulation of in vitro hydroxyapatite formation and growth. *Bone Miner*. 1990 Oct;11(1):55-65.

Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*. 1995 Feb;39(1):169-79.

Briso ALF, Rahal V, Mestreneur SR, Dezan E Jr. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Braz Oral Res*. 2006 Jul-Sep;20(3):219-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-83242006000300007>.

Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater*. 2013 May;29(5):580-93. doi: 10.1016/j.dental.2013.03.007.

Camilleri J, Montesin FE, Papaioannou S, McDonald F, Pitt Ford TR. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J*. 2004 Oct;37(10):699-704.

Cascon V. Copaíba - *Copaifera spp.* In: Carvalho JCT. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd; 2004. 480p.

Cate T. Histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Chailertvanitkul P, Paphangkorakit J, Sooksantisakoonchai N, Pumas N, Pairojamornyoot W, Leela-Apiradee N, Abbott PV. Randomized control trial comparing calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate for partial pulpotomies in cariously exposed pulps of permanent molars. Int Endod J. 2014 Sep;47(9):835-42. doi: 10.1111/iej.12225.

Chan C, Lan W, Chang M, Chen Y, Lan W, Chang H. Effects of TGF-beta s on the growth, collagen synthesis and collagen lattice contraction of human dental pulp fibroblasts in vitro. Arch Oral Biol. 2005 May;50(5):469-79. doi: 10.1016/j.archoralbio.2004.10.005

Chang SW, Lee SY, Ann HJ, Kum KY, Kim EC. Effects of calcium silicate endodontic cements on biocompatibility and mineralization-inducing potentials in human dental pulp cells. J Endod. 2014 Aug;40(8):1194-200. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.001.

Choi Y, Park J, Lee S, Hwang C, Yu M. Biological effects and washout resistance of a newly developed fast-setting pozzolan cement. J Endod. 2013 Apr;39(4):467-72. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.023.

Cohen BD, Combe EC. Development of new adhesive pulp capping materials. Dent Update. 1994 Mar;21(2):57-62.

Cohenca N, Paranjpe A, Berg J. Vital pulp therapy. Dent Clin North Am. 2013 Jan;57(1):59-73.

Coil J, Tam E, Waterfield J. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan. J Endod. 2004 Feb;30(2):88-91.

Consolaro A. Inflamação e reparo: um silabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. In: Reparação: Um processo dependente do tecido de granulação. 2ª ed. Maringa: DentalPress; 2015.509 p.

Cooper PR, Smith AJ. Molecular mediators of pulp inflammation and regeneration. *Endod Topics*. 2013;28(1):90–105.

Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent*. 2010 Sep;38(9):687-97. doi: 10.1016/j.jdent.2010.05.016.

Costa CAS, Hebling J, Rabello F, Villalba H. Estudo preliminar de compatibilidade biológica dos cimentos de óxido de zinco e copaíba e óxido de zinco e eugenol: avaliação histológica de implantes subcutâneos em ratos. *Rev Odontol UNESP*. 1996;25(1):19-26.

Couto RSD. Análise in vitro da proliferação, migração de células-tronco de polpa dentária humana em resposta a materiais com potencial para serem empregados como capeadores pulpares diretos (óleo-resina de copaíba isolada ou associada ao hidróxido de cálcio ou ao agregado de trióxido mineral) [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013.

Couve E. Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol*. 1986;31(10):643-51.

Cox CF, Suzuki S. Re-evaluating pulp protection: calcium hydroxide liners vs. cohesive hybridization. *J Am Dent Assoc*. 1994 Jul;125(7):823-831.

Cox CF, Sübay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent*. 1996 Jan-Feb;21(1):4-11.

Cuadros-Fernández C, Lorente Rodríguez AI, Sáez-Martínez S, García-Binimelis J, About I, Mercadé M. Short-term treatment outcome of pulpotomies in primary molars using mineral trioxide aggregate and Biodentine: a randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2016 Sep;20(7):1639-45. doi: 10.1007/s00784-015-1656-4.

Daltoé MO, Paula-Silva FW, Faccioli LH, Gatón-Hernández PM, De Rossi A, Bezerra Silva LA. Expression of mineralization markers during pulp response to biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2016 Apr;42(4):596-603. doi: 10.1016/j.joen.2015.12.018.

Delfino CS, Ribeiro C, Vieira GF, Bressian AHA, Turbino ML. Uso de novos materiais para o capeamento pulpar (hidroxiapatita - HAp e fosfato tricálcico - β -TCP). *Cerâmica*. 2010;56(34):381-8.

Demarco FF, Tarquinio SB, Jaeger MM, de Araújo VC, Matson E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence Int.* 2001 Mar;32(3):211-20.

De Rossi A, Silva LA, Gatón-Hernández P, Sousa-Neto MD, Nelson-Filho P, Silva RA, de Queiroz AM. Comparison of pulpal responses to pulpotomy and pulp capping with biodentine and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod.* 2014 Sep;40(9):1362-9. doi: 10.1016/j.joen.2014.02.006.

Dias-da-Silva MA, Pereira AC, Marin MCC, Salgado MAC. The influence of topic and systemic administration of copaiba oil on the alveolar wound healing after tooth extraction in rats. *J Clin Exp Dent.* 2013 Oct;5(4):e169-73. doi: 10.4317/jced.51104.

Dominguez MS, Witherspoon DE, Gutmann JL, Opperman, LA. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. *J Endod.* 2003 May;29(5):324-333.

Durand SH, Flacher V, Roméas A, Carrouel F, Colomb E, Vincent C, Magloire H, Couble ML, Bleicher F, Staquet MJ, Lebecque S, Farges JC. Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol.* 2006 Mar;176(5):2880-7. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.2880>

Elumalai D, Kapoor B, Tewrai RK, Mishra SK. Comparison of mineral trioxide aggregate and biodentine for management of open apices. *J Interdiscipl Dent.* 2015;5(3):131-5.

Eskandarizadeh A, Shahpasandzadeh MH, Shahpasandzadeh M, Torabi M, Parirokh M. A comparative study on dental pulp response to calcium hydroxide, white and grey mineral trioxide aggregate as pulp capping agents. *J Conserv Dent.* 2011 Oct;14(4):351-5. doi: 10.4103/0972-0707.87196.

Faraco Junior IM, Holland R. Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J.* 2004;15(2):104-8. doi: /S0103-64402004000200004.

Faraco IM Jr, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol.* 2001 Aug;17(4):163-6.

Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology*. 2010 Feb;98(1):2-14. doi: 10.1007/s10266-009-0116-5.

Figdor D. Apical periodontitis: a very prevalent problem. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Dec;94(6):651-652. doi: 10.1067/moe.2002.130322.

Fisher LB, Maibach HI. The effect of corticosteroids on human epidermal mitotic activity. *Arch Dermatol*. 1971 Jan;103(1):39-44.

Fitzgerald M. Cellular mechanics of dentinal bridge repair using H-Thymidine. *J Dent Res*. 1979 Nov;58(Spec Issue D):2198-206. doi: 10.1177/002203457905800411011

Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc*. 1996 Oct;127(10):1491-4.

Franz FE, Holz J, Baume LJ. Ultrastructure (SEM) of dentine bridging in the human dental pulp. *J Biol Buccale*. 1984 Sep;12(3):239-46.

Garcia L, Cristiane S, Wilson M, Soraya M, Lopes RA, Mônica R, Freitas O. Biocompatibility assessment of pastes containing Copaiba oil resin, propolis, and calcium hydroxide in the subcutaneous tissue of rats. *J Conserv Dent*. 2011 Apr;14(2):108–12. doi: 10.4103/0972-0707.82601

Garrido AD, De Cara SP, Marques MM, Sponchiado EC Jr, Garcia LF, De Souza-Neto, MD. Cytotoxicity evaluation of a copaiba oil-based root canal sealer compared to three commonly used sealers in endodontics. *Dent Res J (Isfahan)*. 2015 Mar-Apr;12(2):121-6.

George A, Sabsay B, Simonian P A L, Veis A. Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein implications for induction of biomineralization. *J Biol Chem*. 1993 June;268(17):12624-30.

Goldberg M, editor. *The dental pulp: biology, pathology, and regenerative therapies*. 2nd ed. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2014.

Goldberg M, Smith A. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp. A biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Jan;15(1):13–27.

Goldberg M, Njeh A, Uzunoglu E. Is pulp inflammation a prerequisite for pulp healing and regeneration? *Mediators Inflamm.* 2015;2015:347649. doi: 10.1155/2015/347649.

Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed.)*. 2011 Jan;1(3):711-35.

Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, Septier D, Carrouel F, Durand S, Chaussain-Miller C, Denbesten P, Veis A, Poliard A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res.* 2008 Aug;58(2):137–47. doi: 10.1016/j.phrs.2008.05.013.

Gonzalez-Mejia ME, Doseff AI. Regulation of monocytes and macrophages cell fate. *Front Biosci (Landmark Ed.)*. 2009 Jan;14(7):2413–31.

Gu K, Chang S, Ritchie HH, Clarkson BH, Rutherford RB. Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene. *Eur J Oral Sci.* 2000 Feb;108(1):35-42.

Gutierrez-Venegas G, Maldonado-Frias S, Ontiveros-Granados A, Kawasaki-Cardenas P. Role of p38 in nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression, and nitric oxide and PGE2 synthesis in human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Life Sci.* 2005;77(1):60-73. doi: 10.1016/j.lfs.2004.12.015.

Han L, Okiji T. Bioactivity evaluation of three-calcium silicate based endodontic materials. *Int Endod J.* 2013;46(9):804-14. doi: 10.1111/iej.12062.

Harada M, Kenmotsu S, Nakasone N, Nakakura-Ohshima K, Ohshima H. Cell dynamics in the pulpal healing process following cavity preparation in rat molars. *Histochem Cell Biol.* 2008 Oct;130(4):773-83. doi: 10.1007/s00418-008-0438-3.

Hargreaves KM, Goodis HE. *Polpa dentária de Setzer e Bender*. 1ª ed. São Paulo, Quintessence; 2009.

Hebling J, Giro EMA, Costa CAS. Biocompatibility of na Adhesive System Applied to Exposed Human Dental Pulp. *J End.* 1999 Oct;25(10):676-82.

Hebling J, Ribeiro APD, Costa CAS. Relação entre materiais dentários e o complexo dentino-pulpar. *Robrac.* 2010;18(48):1-9.

Hilton TJ, Ferracane JL, Mancl L; Northwest Practice-based Research Collaborative in Evidence-based Dentistry (NWP). Comparison of CaOH with MTA for direct pulp capping: a PBRN randomized clinical trial. *J Dent Res*. 2013 Jul;92(7 Suppl):16S-22S. doi: 10.1177/0022034513484336.

Hirata A, Dimitrova-Nakov S, Djole SX, Ardila H, Baudry A, Kellermann O, Simon S, Goldberg M. Plithotaxis, a collective cell migration, regulates the sliding of proliferating pulp cells located in the apical niche. *Connect Tissue Res*. 2014 Aug;55 Suppl 1:68-72. doi: 10.3109/03008207.2014.923855.

Hirschman WR, Wheeler MA, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *J Endod*. 2012 Mar;38(3):385-8. doi: 10.1016/j.joen.2011.11.012.

Holland R. Histochemical response of amputated pulps to calcium hydroxide. *Rev Bras Pesq Méd Biol*. 1971;4(1-2):83-95.

Holland R, de Souza V, de Mello W, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA. Permeability of the hard tissue bridge formed after pulpotomy with calcium hydroxide: a histologic study. *J Am Dent Assoc*. 1979 Sep;99(3):472-5.

Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PF, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod*. 1999 Mar;25(3):161-6.

Holland R, Souza Vd, Nery MJ, Faraco Júnior IM, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, Dezan Júnior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J*. 2002;13(1):23-6.

Holland R, de Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PF, Otoboni Filho JA, Dezan Júnior E. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J*. 2001;12(2):109-13.

Horsted P, Sandergaard B, Thylstrup A, El Attar K, Fejerskov O. A retrospective study of direct pulp capping with calcium hydroxide compounds. *Endod Dent Traumatol*. 1985 Feb;1(1):29-34.

Huang GT. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011 Jan;1(3):788-800.

Iwamoto CE, Adachi E, Pameijer CH, Barnes D, Romberg EE, Jefferies S. Clinical and histological evaluation of white ProRoot MTA in direct pulp capping. *Am J Dent*. 2006 Apr;19(2):85-90.

Jang JH, Kang M, Ahn S, Kim S, Kim W, Kim Y, Kim E. Tooth discoloration after the use of new pozzolan cement (Endocem) and mineral trioxide aggregate and the effects of internal bleaching. *J Endod*. 2013 Dec;39(12):1598-602. doi: 10.1016/j.joen.2013.08.035.

Jang Y, Song M, Yoo IS, Song Y, Roh BD, Kim E. A randomized controlled study of the use of proroot mineral trioxide aggregate and endocem as direct pulp capping materials: 3-month versus 1-year outcomes. *J Endod*. 2015 Aug;41(8):1201-6. doi: 10.1016/j.joen.2015.03.015.

Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(2):179–200.

Junqueira LC; Carneiro J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 2013. 556p.

Kaup M, Dammann CH, Schäfer E, Dammaschke T. Shear bond strength of Biodentine, ProRoot MTA, glass ionomer cement and composite resin on human dentine ex vivo. *Head Face Med*. 2015 Apr 19;11:14. 10.1186/s13005-015-0071-z.

Kettering JD, Torabinejad M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod*. 1995 Nov;21(11):537-42. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80980-5.

Kirk D, Mittwoch U. Effects of topically potent glucocorticoids on human diploid fibroblasts in vitro. *Br J Dermatol*. 1977 Jul;97(1):69-75.

Kitasako Y, Ikeda M, Tagami J. Pulpal responses to bacterial contamination following dentin bridging beneath hard-setting calcium hydroxide and self-etching adhesive resin system. *Dent Traumatol*. 2008 Apr;24(2):201-6. doi: 10.1111/j.1600-9657.2007.00517

Kobayashi C, Fontanive TO, Enzweiler BG, de Bona LR, Massoni T, Apel MA, Henriques AT, Richter MF, Ardenghi P, Suyenaga ES. Pharmacological evaluation of Copaifera multijuga oil in rats. *Pharm Biol*. 2011 Mar;49(3):306-13. doi: 10.3109/13880209.2010.515595.

Koike T, Polan MA, Izumikawa M, Saito T. Induction of reparative dentin formation on exposed dental pulp by dentin phosphophoryn/collagen composite. *Biomed Res Int*. 2014;2014:745139. doi: 10.1155/2014/745139.

Koubi G, Colon P, Franquin JC, Hartmann A, Richard G, Faure MO, Lambert G. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. *Clin Oral Investig*. 2013 Jan;17(1):243-9. doi: 10.1007/s00784-012-0701-9.

Kuratate M, Yoshida K, Shigetani Y, Yoshida N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):970-4. doi: 10.1016/j.joen.2008.03.021.

Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J*. 2012 May;45(5):439-48. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01995.x.

Laurent P, Camps J, De Mo M, Djou J, About I. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. *Dent Mater*. 2008 Nov;24(11):1486-94. doi: 10.1016/j.dental.2008.02.020.

Leandro LM, Vargas F De S, Barbasa PC, Neves JK, Da Silva J, Da Veiga-Junior VF. Chemistry and biological activities of terpenoids from copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. *Molecules*. 2012 Mar;17(4):3866-89. doi: 10.3390/molecules17043866

Le Clerc J, Prard M, Pellen-Mussi P, Novella A, Tricot-Doleux S, Jeanne S, Prez F. Characterization of a programmed necrosis process in 3-dimensional cultures of dental pulp fibroblasts. *Int Endod J*. 2013 Apr;46(4):308-16. doi: 10.1111/j.1365-2591.2012.02114.x.

Lee BN, Lee KN, Koh JT, Min KS, Chang HS, Hwang IN, Hwang YC, Oh WM. Effects of 3 endodontic bioactive cements on osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *J Endod*. 2014 Aug;40(8):1217-22. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.036.

Letzelter C, Croute F, Pianezzi B, Roques C, Soleilhavoup J. Supernatant cytotoxicity and proteolytic activity of selected oral bacteria against human gingival fibroblasts in vitro. *Arch Oral Biol*. 1998;43(1):15- 23.

Li Z, Cao L, Fan M, Xu Q. Direct pulp capping with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate: a meta-analysis. *J Endod*. 2015 Sep;41(9):1412-7. doi: 10.1016/j.joen.2015.04.012.

Lima RV, Esmeraldo MR, de Carvalho MG, de Oliveira PT, de Carvalho RA, da Silva FL Jr, de Brito Costa EM. Pulp repair after pulpotomy using different pulp capping agents: a comparative histologic analysis. *Pediatr Dent*. 2011 Jan-Feb;33(1):14-8.

Liu S, Wang S, Dong Y. Evaluation of a Bioceramic as a Pulp Capping Agent *In Vitro* and *In Vivo* *Journal of Endodontics*. 2015 May;41(5):652-657. doi: 10.1016/j.joen.2014.12.009.

Louwakul P, Lertchirakarn V. Response of inflamed pulps of rat molars after capping with pulp-capping material containing fluocinolone acetonide. *J Endod*. 2015 Apr;41(4):508-12. doi: 10.1016/j.joen.2014.12.004.

Lovato KF, Sedgley CM. Antibacterial activity of endosequence root repair material and proroot MTA against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2011 Nov;37(11):1542-6. doi: 10.1016/j.joen.2011.06.022.

Lozada F, Silverman S. Topically applied fluocinonide in an adhesive base in the treatment oral vesiculoerosive diseases. *Arch Dermatol*. 1980 Aug;116(8):898–901.

Luo Z, Li D, Kohli MR, Yu Q, Kim S, He WX. Effect of Biodentine on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. *J Dent*. 2014 Apr;42(4):490-7. doi: 10.1016/j.jdent.2013.12.011.

Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. *J Endod*. 2011 Jun;37(6):793–8. doi: 10.1016/j.joen.2011.02.029.

Maeda H, Nakano T, Tomokiyo A, Fujii S, Wada N, Monnouchi S, Hori K, Akamine A. Mineral trioxide aggregate induces bone morphogenetic protein-2 expression and calcification in human periodontal ligament cells. *J Endod*. 2010 Apr;36(4):647-52. doi: 10.1016/j.joen.2009.12.024.

Malkondu Ö, Karapinar Kazandağ M, Kazazoğlu E. A review on biodentine, a contemporary dentine replacement and repair material. *Biomed Res Int*. 2014;2014:160951. doi: 10.1155/2014/160951.

Marshall GW, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*. 1997 Nov;25(6):441–58.

Martins IFB, Silva A. Influência do óleo de copaíba (*copaifera* sp.) no tratamento de ferida cutânea infeccionada. *Rev Pesquisa: cuidado é Fundamental-online* [Internet]. 2010. [citado 20 dez. 2017];2(Ed. Supl.):526-9. Disponível em: <http://www.redalyc.org>

Massa LF, Ramachandran A, George A, Arana-Chavez VE. Developmental appearance of dentin matrix protein 1 during the early dentinogenesis in rat molars as identified by high-resolution immunocytochemistry. *Histochem Cell Biol*. 2005 Sep;124(3-4):197-205. doi: 10.1007/s00418-005-0009-9

Masuda-Murakami Y, Kobayashi M, Wang X, Yamada Y, Kimura Y, Hossain M, Matsumoto K. Effects of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells. *Acta Histochem*. 2010 Sep;112(5):452-8. doi: 10.1016/j.acthis.2009.05.001.

Matthews B, Vongsavan N. Interactions between neural and hydrodynamic mechanisms in dentine and pulp. *Arch Oral Biol*. 1994;39 Suppl:87S-95S.

Mazzoni A, Carrilho M, Papa V, Tjäderhane L, Gobbi P, Nucci C, Di Lenarda R, Mazzotti G, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: biochemical and immunohistochemical analysis. *J Dent*. 2011 Jul;39(7):470-7. doi: 10.1016/j.jdent.2011.04.004.

Mente J, Hufnagel S, Leo M, Michel A, Gehrig H, Panagidis D, Saure D, Pfefferle T. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: long-term results. *J Endod*. 2014 May;40(11):1746-1751. doi: 10.1016/j.joen.2010.02.024. doi: 10.1016/j.joen.2014.07.019

Mente J, Geletneky B, Ohle M, Koch MJ, Friedrich Ding PG, Wolff D, Dreyhaupt J, Martin N, Staehle HJ, Pfefferle T. Mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: an analysis of the clinical treatment outcome. *J Endod*. 2010 May;36(5):806-13. doi: 10.1016/j.joen.2010.02.024.

Mjör IA, Sveen OB, Heyeraas KJ. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int*. 2001 Jun;32(6):427-46.

Min KS , Park HJ, Lee SK, Park SH, Hong CU, Kim HK, Lee HH, Kim EC. Effect of mineral trioxide aggregate on dentin bridge formation and expression of dentin sialoprotein and heme oxygenase-1 in human dental pulp. J Endod. 2008 Jun;34(6):666-70. doi: 10.1016/j.joen.2008.03.009.

Miyagak DC, de Carvalho EM, Robazza CR, Chavasco JK, Levorato GL. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of endodontic sealers. Braz Oral Res 2006 Out-Dec;20(4): 303-6.

Moghaddame-Jafari S, Mantellini MG, Botero TM, McDonald NJ, Nör JE. Effect of ProRoot MTA on pulp cell apoptosis and proliferation in vitro. J Endod. 2005 May;31(5):387-91.

Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. Int Endod J. 2011 Aug;44(8):697-730. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01886.x.

Montes LV, Broseghini LP, Andreatta FS, Santana MES, Neves VM, Silva AG. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. Natureza online. [Internet]. 2012. [citado 29 dez. 2017];7(2):61-7. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br>.

Muincharern W, Louwakul P, Pavasant P, Lertchirakarn V. Effect of fluocinolone acetonide on human dental pulp cells: cytotoxicity, proliferation, and extracellular matrix formation. J Endod. 2011 Feb;37(2):181-4. doi: 10.1016/j.joen.2010.10.013.

Mumaw ED, Cooper P. Simplified method of pulp capping adult teeth with calcium hydroxide. U S Armed Forces Med J. 1957 Jul;8(7):979-84.

Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Preserving the vital pulp in operative dentistry: 3. Thickness of remaining cavity dentine as a key mediator of pulpal injury and repair responses. Dent Update. 2002 May;29(4):172-8.

Nagaoka S, Tokuda M, Sakuta T, Taketoshi Y, Tamura M, Takada H. Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with Prevotella intermedia lipopolysaccharide. J Endod. 1996 Jan;22(1):9-12. doi: 10.1016/S0099-2399(96)80228-7

Naik RM, Pudakalkatti PS, Hattarki SA. Can MTA be: miracle trioxide aggregate? J Indian Soci Periodont. 2014 Jan;18(1):5-8. doi: 10.4103/0972-124X.128190.

Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int Endod J*. 2008 Feb;41(2):128-50. doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01329.x.

Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with Mineral Trioxide Aggregate: a randomized controlled trial. 2008. *Int Endod J*. 2009 May;42(5):422-44. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01558.x.

Nakayama A, Ogiso B, Tanabe N, Takeichi O, Matsuzaka K, Inoue T. Behaviour of bone marrow osteoblast-like cells on mineral trioxide aggregate: morphology and expression of type I collagen and bone-related protein mRNAs. *Int Endod J*. 2005 Apr;38(4):203-10. doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00917.x

Narayanan K, Srinivas R, Ramachandran A, Hao J, Quinn B, George A. Differentiation of embryonic mesenchymal cells to odontoblast-like cells by overexpression of dentin matrix protein 1. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98:4516–21. doi: 10.1073/pnas.081075198

Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol*. 2013 Jun;228(6):1149-53. doi: 10.1002/jcp.24278.

Nielsen RB, Alyassin AM, Peters DD, Carnes DL, Lancaster J. Microcomputed tomography: an advanced system for detailed endodontic research. *J Endod*. 1995 Nov;21(11):561-8. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80986-6

Niranjani K, Prasad MG, Vasa AA, Divya G, Thakur MS, Saujanya K. Clinical evaluation of success of primary teeth pulpotomy using mineral trioxide aggregate(®), laser and biodentine(tm)- an in vivo study. *J Clin Diagn Res: JCDR*. 2015 Apr;9(4):ZC35±7. doi: 10.7860/JCDR/2015/13153.5823.

Nogueira EO, Novaes ASM, Sanchez CMS, Andrade CM, Silva MFA. Avaliação do efeito do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* sp.) na proliferação celular in vitro. *Braz. J Vet Res Anim Sci*. 2012;49(4):293-300.

Nowicka A, Wilk G, Lipski M, KołECKI J, Buczkowska-Radlińska J. Tomographic evaluation of reparative dentin formation after direct pulp capping with Ca(OH)₂, MTA, Biodentine, and dentin bonding system in human teeth. *J Endod*. 2015 Aug; 41(8):1234-40. doi: 10.1016/j.joen.2015.03.017.

Nowicka A, Lipski M, Parafiniuk M, Sporniak-Tutak K, Lichota D, Kosierkiewicz A, Kaczmarek W, Buczkowska-Radlińska J. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. *J Endod*. 2013 Jun;39(6):743-7. doi: 10.1016/j.joen.2013.01.005.

Nunez CMC, Bosomworth MHJ, Field C, Whitworth JM, Valentine RA. Biodentine and mineral trioxide aggregate induce similar cellular responses in a fibroblast cell line. *J Endod*. 2014;40(3):406-11. doi: 10.1016/j.joen.2013.11.006.

Ogura N, Tobe M, Sakamaki H, Nagura H, Abiko Y, Kondoh T. Tumor necrosis factor- α increases chemokine gene expression and production in synovial fibroblasts from human temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med*. 2005 Jul;34(6):357-63. doi: 10.1111/j.1600-0714.2005.00302.x.

Okiji T, Yoshida K. Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. *Int J Dent* 2009; 2009:464280. doi: 10.1155/2009/464280.

Pääkkönen V, Vuoristo J, Salo T, Tjäderhane L. Effects of TGF- β 1 on interleukin profile of human dental pulp and odontoblasts. *Cytokine*. 2007 Oct;40(1):44-51. doi: 10.1016/j.cyto.2007.08.003

Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod*. 2010 Mar;36(3):400-13. . doi: 10.1016/j.joen.2009.09.009.

Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ, Kakoei S, Samiee M. A comparative study of using a combination of calcium chloride and mineral trioxide aggregate as the pulp-capping agent on dogs' teeth. *J Endod*. 2011 Jun;37(6):786-8. doi: 10.1016/j.joen.2011.03.010.

Parisay I, Ghoddusi J, Forghani M. A review on vital pulp therapy in primary teeth. *Iran Endod J*. 2015 Winter;10(1):6-15.

Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7: 104-33.

Pedreira EN. Avaliação do efeito inibidor tumoral do óleo resina de copaíba in natura (Copaífera reticulada) e manipulado artesanalmente no modelo de carcinogênese bucal experimental DMBA induzida [tese]. Bauru: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru; 2007.

Perard M, Le Clerc J, Meary F, Perez F, Tricot-Doleux S, Pellen-Mussi P. Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. *J Mater Sci Mater Med*. 2013 Jun;24(6):1527-34. doi: 10.1007/s10856-013-4908-3

Pieri FA, Mussi MCM, Fiorini JE, Schneedorf JM. Clinical and microbiological effects of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) on dental plaque forming bacteria in dogs. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010 Jun;62(3):578-85.

Pieri FA, Mussi MC, Fiorini JE, Moreira MAS, Schneedorf JM. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J*. 2012;23(1):36-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-64402012000100006>.

Pinheiro JT. Avaliação comparativa das infiltrações apicais através do INA nas obturações de canais radiculares com cimento à base de óleo-resina de copaíba [tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Faculdade de Odontologia; 1993.

Priyalakshmi S, Ranjan M. Review on Biodentine - a bioactive dentin substitute *J Dent Med Sci*. 2014 Jan;13(1):13-7.

Prosser HJ, Groffman DM, Wilson AD. The effect of composition on the erosion properties of calcium hydroxide cements. *J Dent Res*. 1982 Dec;61(12):1431-5. doi: 10.1177/00220345820610121101.

Qudeimat MA, Barrieshi-Nusair KM, Owais AI. Calcium hydroxide vs mineral trioxide aggregates for partial pulpotomy of permanent molars with deep caries. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2007 Jun;8(2):99-104.

Qureshi A ES, Nandakumar, Pratapkumar, Sambashivarao. Recent advances in pulp capping materials: an overview. *J Clin Diagn Res*. 2014 Jan;8(1):316-21. doi: 10.7860/JCDR/2014/7719.3980.

Ramos MFS. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2006.

Raskin A, Eschrich G, Dejou J, About I. In vitro microleakage of Biodentine as a dentin substitute compared to Fuji II LC in cervical lining restorations. *J Adhes Dent*. 2012 Dec;14(6):535-42. doi: 10.3290/j.jad.a25690.

Ribeiro A. Avaliação do potencial irritativo do óleo resina de copaíba (substituto do eugenol) na fase exsudativa do processo inflamatório [tese]. Bauru: Universidade de São Paulo: Universidade de São Paulo de Bauru, Faculdade de Odontologia de Bauru; 1989.

Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spångberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Apr;95(4):483-9. doi: 10.1067/moe.2003.20

Saito T, Toyooka H, Ito S, Crenshaw MA. In vitro Study of Remineralization of Dentin: Effects of Ions on Mineral Induction by Decalcified Dentin Matrix. *Caries Res* 2003;37:445–49. doi: 10.1159/000073398

Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Junior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaíba oils obtained from, different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008 maio;103(3):277-81.

Scharffetter K, Kulozik M, Stolz W, Lankat-Buttgereit B, Hatamochi A, Söhnchen R, Krieg T. Localization of collagen alpha 1(I) gene expression during wound healing by in situ hybridization. *J Invest Dermatol.* 1989 Sep;93(3):405-12.

Schmalz G, Galler KM. Tissue injury and pulp regeneration. *J Dent Res.* 2011 Jul;90(7):828–29. doi: 10.1177/0022034511405331.

Schroder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res.* 1985 Apr;64(Spec No):541-548. doi: 10.1177/002203458506400407.

Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, Kato Y. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol.* 1998 Feb;174(2):194-205. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199802)174:2<194::AID-JCP7>3.0.CO;2-J.

Shimabukuro Y, Ueda M, Ozasa M, Anzai J, Takedachi M, Yanagita M, Ito M, Hashikawa T, Yamada S, Murakami S. Fibroblast growth factor-2 regulates the cell function of human dental pulp cells. *J Endod.* 2009 Nov;35(11):1529-1535. doi: 10.1016/j.joen.2009.08.010.

Silva PF, Brito MV, Pontes FS, Ramos SR, Mendes LC, Oliveira LC. Copaiba oil effect on experimental jaw defect in Wistar rats. *Acta Cir Bras*. 2015 Feb;30(2):120-6.

Simões CACG, de Oliveira Conde NC, Venâncio GN, Milério PSLL, Bandeira MFCL, da Veiga Júnior VF. Antibacterial activity of copaiba oil gel on dental biofilm. *Open Dent J*. 2016;10:188-195. doi: 10.2174/1874210601610010188.

Smith AJ, Smith JG, Shelton RM, Cooper PR. Harnessing the natural regenerative potential of the dental pulp. *Dent Clin North Am*. 2012 Jul;56(3):589-601. doi: 10.1016/j.cden.2012.05.011.

Stanley HR. Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping studies. *Am J Dent* 1998;11 Spec No:S17-S34.

Stanley HR, Lundy T. Dycal therapy for pulp exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1972 Nov;34(5):818-27.

Staquet MJ, Durand SH, Colomb E, Roméas A, Vincent C, Bleicher F, Lebecque S, Farges JC. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. *J Dent Res*. 2008 Mar;87(3):256-61. doi: 10.1177/154405910808700304.

Stupp T, de Freitas RA, Sierakowski MR, Deschamps FC, Wisniewski A, Jr, Biavatti MW. Characterization and potential uses of *Copaifera langsdorfii* seeds and seed oil. *Bioresour Technol*. 2008 May;99(7):2659–63. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.04.051.

Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol*. 2012 Sep;57(9):1165-75. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.03.005.

Tabarsi B, Parirokh M, Eghbal MJ, Haghdoost AA, Torabzadeh H, Asgary S. A comparative study of dental pulp response to several pulpotomy agents. *Int Endod J*. 2010 Jul;43(7):565-71. doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01711.x.

Taira Y, Shinkai K, Suzuki M, Kato C, Katoh Y. Direct pulp capping effect with experimentally developed adhesive resin systems containing reparative dentin-promoting agents on rat pulp: mixed amounts of additives and their effect on wound healing. *Odontology*. 2011 Jul;99(2):135-47. doi: 10.1007/s10266-011-0006-5.

Tani-Ishii N, Hamada N, Watanabe K, Tujimoto Y, Teranaka T, Umemoto T. Expression of bone extracellular matrix proteins on osteoblast cells in the presence of mineral trioxide. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):836-9. doi: 10.1016/j.joen.2007.02.003.

Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci* 2007 Mar;49(1):41-5.

Teixeira RKC, Yamaki VN, Yasojima EY, Brito, MVH. Effect of copaiba oil in hepatic damage induced by acetaminophen in rats. *Acta Cir Bras*. 2013 Jul;28(7):526-30.

Thomas DW, Oneill ID, Harding KG. Cutaneous wound healing: a current perspective. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995 Apr;53(4):442-7.

Tjaderhane L. The mechanism of pulpal wound healing. *Aust Endod J*. 2002 Aug;28(2):68-74. doi: 10.1111/j.1747-4477.2002.tb00386.x

Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review – part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod*. 2010 Feb;36(2):190-202. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.010

Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root-end filling materials. *J Endod*. 1995 Aug;21(8):403-6.

Tran XV, Gorin C, Willing C, Baroukh B, Pellat B, Decup F, Opsahl Vital S, Chaussain C, Boukpepsi T. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res*. 2012 Dec;91(12):1166-71. doi: 10.1177/0022034512460833.

Tuna D, Olmez A. Clinical long-term evaluation of MTA as a direct pulp capping material in primary teeth. *Int Endod J*. 2008 Apr;41(4):273-8. doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01339.x.

Tziafas D. Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. *Int Endod J*. 1994 Mar;27(2):61-74.

Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endod*. 2010 May;36(5):781-9. doi: 10.1016/j.joen.2010.02.006.

Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent*. 2000 Feb;28(2):77-92. doi:10.1016/S0300-5712(99)00047-0.

Vasconcelos KRF, da Veiga Junior VF, Rocha WC, Bandeira MFCL. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. *Rev Bras Farmacogn*. 2008 dez;18:733-738.

Veiga junior VF, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? *Quim Nova*. 2005 jun;28(3):519-28.

Veiga Junior VF, Pinto AC. The *Copaifera* L. Genus. This review details the history, chemistry and pharmacology of the *Copaifera* L. genus (Leguminosae-Caesalpinoideae), including copaiba oils. *Quim Nova*. 2002;25(2):273-86.

Veiga Junior VF, Rosas EC, Carvalho MV, Henrique MG, Pinto AC. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulada* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne—a comparative study. *J Ethnopharmacol*. 2007 Jun;112(2):248-54.

Verma P, Love RM. A Micro CT study of the mesiobuccal root canal morphology of the maxillary first molar tooth. *Int Endod J*. 2011 Mar;44(3):210-7. doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01800.x.

Villat C, Tran XV, Pradelle-Plasse N, Ponthiaux P, Wenger F, Grosogeat B, Colon P. Impedance methodology: A new way to characterize the setting reaction of dental cements. *Dent Mater*. 2010 Dec;26(12):1127-32. doi: 10.1016/j.dental.2010.07.013.

Viriato EP, Bianchetti ES, dos Santos KC, Vaz AF, Campos RMV, Pereira AP, Bezerra RM, Perazzo FF, Carvalho JCT. Study of high dilutions of copaiba oil on inflammatory process. *Int J High Dilution Res*. 2009;8(26):9-14.

Wagner VP, Webber LP, Ortiz L, Rados PV, Meurer L, Lameira OA, Lima RR, Martins MD. Effects of copaiba oil topical administration on oral wound healing. *Phytother Res*. 2017 Aug;31(8):1283-88. doi: 10.1002/ptr.5845.

Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endod*. 2007 June;33(6):703-8. doi: 10.1016/j.joen.2007.02.009.

Wijnbergen M, Van Mullen PJ. The cumulative effective of disinfection, storage, histological fixation and demineralization on number and staining ability of Gram-positive bacteria. *Int Endod J*. 1991 Sep;24(5):243-8.

Willershausen B, Willershausen I, Ross A, Velikonja S, Kasaj A, Blettner M. Retrospective study on direct pulp capping with calcium hydroxide. *Quintessence Int*. 2011 Feb;42(2):165-71.

Yasojima EY, Teixeira RKC, Houat AP, Costa FLS, Silveira EL, Brito MVH, Lopes Filho GJ. Effect of copaiba oil on correction of abdominal wall defect treated with the use of polypropylene/ polyglecaprone mesh. *Acta Cir Bras*. 2013 Feb;28(2):131-5.

Yoo JS, Chang SW, Oh SR, Perinpanayagam H, Lim SM, Yoo YJ, Oh YR, Woo SB, Han SH, Zhu Q, Kum KY. Bacterial entombment by intratubular mineralization following orthograde mineral trioxide aggregate obturation: a scanning electron microscopy study. *Int J Oral Sci*. 2014 Dec;6(4):227-32. doi: 10.1038/ijos.2014.30.

Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *J Dent Res*. 1996 Aug;75(8):1590-7. doi: 10.1177/00220345960750081101.

Zanini M, Saitier JM, Bernal A, Simon S. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. *J Endod* 2012 Sep;38(9):1220-6. doi: 10.1016/j.joen.2012.04.018.

Zarrabi MH, Javidi M, Jafarian AH, Joushan B. Histologic assessment of human pulp response to capping with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. *J Endod*. 2010 Nov;36(11):1778-81. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.024.

Zarrabi MH, Javidi M, Jafarian AH, Joushan B. Immunohistochemical expression of fibronectin and tenascin in human tooth pulp capped with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. *J Endod*. 2011 Dec;37(12):1613-8. doi: 10.1016/j.joen.2011.08.021.

Zhai S, Wang Y, Jiang W, Jia Q, Li J, Wang W, Wang H, Ding Y, Wang P, Liu J, Ni L. Nemotoc human dental pulp fibroblasts promote human dental pulp stem cells migration. *Exp Cell Res*. 2013 Jun 10;319(10):1544-52. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.03.018.

Zhang M, Kokabu S, Nakatomi C, Sugiyama G, Matsuo K, Jimi E. The distinct distributions of immunocompetent cells in rat dentin pulp after pulpotomy. *Anat Rec (Hoboken)*. 2015 Apr;298(4):741-9. doi: 10.1002/ar.23087.

Zhang W, Li Z, Peng B. Effects of iRoot SP on mineralization-related genes expression in MG63 cells. *J Endod*. 2010 Dec;36(12):1978-82. doi: 10.1016/j.joen.2010.08.038.

Zhang S, Yang X, Fan M. BioAggregate and iRoot BP Plus optimize the proliferation and mineralization ability of human dental pulp cells. *Int Endod J*. 2013 Oct;46(10):923-9. doi: 10.1111/iej.12082.

Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M, Imabayashi K, Into T, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M. Matrix metalloproteinase-3 accelerates wound healing following dental pulp injury. *Am J Pathol*. 2009 Nov;175(5):1905-14. doi: 10.2353/ajpath.2009.080705.

Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Häkkinen L, Haapasalo M. In vitro cytotoxicity evaluation of a novel root repair material. *J Endod*. 2013 Apr;39(4):478-83. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.026.

Zitelli J. Wound healing for the clinician. *Adv Dermatol*. 1989;2:243-67.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Potiguar

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 Av. Salgado Filho, nº 1610
 Lagoa Nova, Natal-RN, CEP 59056-000
 Tel.: (0xx84) 3215-1219 e-mail: ceua@unp.br

PARECER

ELEMENTO	DESCRIÇÃO
Número do Protocolo	002/2015
Título da Pesquisa	Investigação da capacidade indutora de barreira dentinária de capeadores pulparem diretos (óleo-resina de copaíba isolado ou associado ao hidróxido de cálcio ou ao agregado de trióxido mineral) <i>in vivo</i> .
Pesquisador responsável	Márcia Martins Marques
Curso	Odontologia
Instituição	Universidade de São Paulo
Avaliação da CEUA	A CEUA reunida em 18/05/2015 procedeu a análise do protocolo supracitado, e tendo em vista que as informações nela contidas atendem aos requisitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que trata das pesquisas envolvendo animais de experimentação, manifestou-se por sua aprovação.
Parecer da CEUA	Aprovado
Solicitação da CEUA	Solicita-se ao Coordenador (a) da pesquisa o envio a esta CEUA o Relatório Parcial e o Relatório Final quando do término da pesquisa.

Natal, 18 de maio de 2015.

Prof. Dr.ª Maria das Dores Melo

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UnP

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da capacidade indutora de barreira dentinária de capeadores pulparem diretos (óleo-resina de copaiba isolada ou associada ao hidróxido de cálcio ou ao agregado de trióxido mineral) *in vivo*.", registrada com o nº 005/2017, sob a responsabilidade de Giulio Gavini, Paula Loures Valle Lima, Rejane Andrade de Carvalho, Marcia Martins Marques que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 17/04/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	17/04/2017 A 17/04/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato Isogênico, Wistar
Nº de animais	160
Peso/idade	250g a 350g / 8 semanas
Sexo	Feminino
Origem	Biotério

São Paulo, 19 de abril de 2017.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador do CEUA-FOUSP

Bachion
Eduarda
24/04/17