

FERNANDA FURUSE VENTURA DOS SANTOS

**Efeito do ácido poli(aspártico) associado ao agregado trióxido mineral (MTA)
na regeneração dentinária em molares de rato**

São Paulo

2022

FERNANDA FURUSE VENTURA DOS SANTOS

**Efeito do ácido poli(aspártico) associado ao agregado trióxido mineral (MTA)
na regeneração dentinária em molares de rato**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biomateriais), para obter o título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga

São Paulo

2022

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

Santos, Fernanda Furuse Ventura dos.

Efeito do ácido poli (aspártico) associado ao agregado trióxido mineral (MTA) na regeneração dentinária em molares de rato / Fernanda Furuse Ventura dos Santos; orientador Roberto Ruggiero Braga. -- São Paulo, 2022.

63 p. : fig., 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Biomateriais). -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão Corrigida.

1. Capeamento pulpar dentário. 2. Remineralização dentária. 3. Silicato de cálcio. I. Santos, Fernanda Furuse Venture dos. II. Título.

Fábio Jastwebski – Bibliotecário - CRB8/5280

Santos FFV. Efeito do ácido poli(aspártico) associado ao agregado trióxido mineral (MTA) na regeneração dentinária em molares de rato. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: 08/02/2023

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Marcelo dos Santos

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP)

Julgamento: APROVADA

Prof(a). Dr(a). Fábio Dupart Nascimento

Instituição: Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) Julgamento: APROVADA

Prof(a). Dr(a). Leticia Cristina Cidreira Boaro

Instituição: Universidade Santo Amaro (UNISA) Julgamento: APROVADA

À Deus,

Só posso agradecer e pedir para que eu continue vivendo os Seus sonhos para mim.

À minha família.

À minha mãe Flávia que não mede esforços para me ver feliz, ao meu pai Régis que me guiou nos caminhos do Senhor, aos meus avós Edson e Aparecida que me criaram como filha, tios Adilson, Gi, Mariana, Vinícius e Valdir por todos os conselhos, primos Alice e Dani, ao amor da minha vida Rebeca, minha irmã/filha e em especial a você Cristine, minha mãe, amiga e protetora. Que nunca hesitou em me apoiar no que quer que seja, que não mede esforços para me ver feliz e que sonha comigo desde o princípio. Se hoje estou aqui, digo sem dúvida alguma, que é por você e para você.

Ao meu amor Pedro,

Sentir que alguém faz questão de você é uma das melhores sensações desse mundo e em meio a um tempo de tantas incertezas, você me traz a certeza de nós todos os dias. Obrigada por tanto, tanto carinho, tanta cumplicidade, tanto amor e tanto cuidado.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, e em especial à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, nas pessoas do senhor diretor **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara** e do senhor vice-diretor **Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**, minha casa e berço acadêmico.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FO USP**, nas pessoas do senhor diretor **Prof. Dr. Giulio Gavini** e do senhor vice-diretor **Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito**, pelo oportunidade e acolhimento.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga** pela confiança depositada em mim. Obrigada por me guiar nesses primeiros passos acadêmicos, por toda paciência, dedicação, inspiração e respeito. Agradeço também a todas as oportunidades e conhecimento compartilhado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da bolsa de Mestrado (Processo 2020/10208-1). A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela concessão da bolsa de Mestrado. (nº 88887.475443/2020-00).

Agradeço aos professores do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, em especial ao **Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez** por toda orientação e ensino.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Oral **Elisangela Chinen** e **Douglas Nasedal** por toda paciência e disponibilidade em me ajudar no que fosse preciso para o desenvolvimento desse projeto.

Ao **Prof. Dr. Stefan Habelitz** da Universidade da Califórnia, São Francisco, EUA (UCSF) e **Prof. Dr. Fábio Dupart Nascimento** da UNIFESP/Escola Paulista de Medicina por todas as contribuições com esse trabalho.

A todos os **funcionários** que estiveram presentes nesta etapa da minha vida! Aos que me ajudaram de alguma maneira durando o Mestrado. E em especial a **Glauci** pelo auxílio e carinho nessa fase final.

As amigadas que fiz durante esse período de pós-graduação e que contribuíram para que muitos momentos se tornassem mais leves, **Bruna, Marina, Handy, Bia, Amanda, Rodrigo, Rafael, Juliana e Letícia.**

Aos meus amigos da vida **Leonardo, Júlio, Flávia, Cecília, Juliana e Manuella,** obrigada por todos os conselhos e momentos compartilhados

E enfim, aos **animais** desta pesquisa, por servirem à ciência com suas próprias vidas.

"Como sou pouco e sei pouco, faço o pouco que me cabe me doando por inteiro".

Ariano Suassuna

RESUMO

Santos FFV. Efeito do ácido poli(aspártico) associado ao agregado trióxido mineral (MTA) na regeneração dentinária em molares de rato [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

Recentemente, demonstrou-se que um análogo de proteína não-colágena é capaz de guiar a mineralização de um arcabouço colágeno e induzir a diferenciação de células-tronco em osteoblastos, levando à formação de um tecido semelhante ao osso nativo (Thrivikraman *et al.*, Nat Commun 2019). Apesar dos bons resultados alcançados com os cimentos de silicato de cálcio (agregado trióxido mineral, MTA) e Ca(OH)_2 em casos de exposição pulpar, é possível que análogos biomiméticos estimulem a regeneração dentinária através de uma maior diferenciação de células-tronco pulparem em odontoblastos e da mineralização guiada da matriz dentinária, resultando na formação de uma dentina reparativa com características histológicas superiores à encontrada com o uso do MTA e em menor tempo. O objetivo deste estudo foi verificar se o uso de um análogo biomimético (ácido poliaspártico, pAsp) associado ao MTA proporcionaria resultados superiores ao capeamento pulpar com MTA apenas. Ratos Wistar (N=56) foram divididos em dois grupos, de acordo com o período pós-operatório (7 e 21 dias) e tratamento. Sob anestesia geral, foi realizada a exposição pulpar mecânica da superfície oclusal dos primeiros molares superiores seguido de um dos tratamentos (definido por sorteio, n=7): Grupo C (controle negativo) – apenas selamento da cavidade com um compósito “flowable”; Grupo MTA (controle positivo) - capeamento pulpar com MTA e selamento da cavidade com compósito; Grupo pAsp - aplicação de 20 μL de solução contendo pAsp e selamento da cavidade com compósito; Grupo MTA/pAsp – aplicação de MTA misturado a solução de pAsp na razão de 5:1 (em massa) e selamento da cavidade com compósito. Após a eutanásia e o processamento das hemi-maxilas, os cortes foram submetidos a análises histopatológica (coloração HE e coloração de Brown e Brenn modificada por Taylor) e imunohistoquímica para detecção da sialoproteína dentinária (DSP), dentina, osteopontina (OPN) e proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1). Aos 7 dias, foi observada a presença de infiltrado inflamatório agudo e formação de tecido mineralizado desorganizado em todos os grupos. A qualidade e

espessura da dentina reparativa formada aos 21 dias nos grupos tratados foi superior a encontrada no grupo controle. Houve contaminação bacteriana apenas em alguns espécimes isolados no grupo MTA-pAsp aos 21 dias. A imunomarcacão tanto para DMP-1 quanto para OPN foi maior nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle em ambos os períodos, sendo que o grupo pAsp mostrou uma capacidade de expressar OPN superior aos demais grupos. As reações imunistoquímicas para a detecção de DSP e nestina não apresentaram imunomarcacão positiva. O uso do ácido poli(aspático) na regeneração dentinária em ratos se mostrou uma alternativa tão efetiva quanto o uso isolado do MTA no capeamento pulpar direto.

Palavras-chave: Capeamento pulpar dentário; Remineralização dentária; Silicato de cálcio.

ABSTRACT

Santos FFV. Effect of poly(aspartic acid) associated with mineral trioxide aggregate (MTA) on dentin regeneration in rat molars [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

Recently, it was demonstrated that a non-collagenous protein analog was able to guide the mineralization of a collagen scaffold and induce stem cell differentiation in osteoblasts, leading to the formation of a tissue similar to native bone (Thrivikraman *et al.*, Nat Commun 2019). Thus, despite the good results achieved with calcium silicate (mineral trioxide aggregate, MTA) and Ca(OH)₂ cements in pulp exposure cases, it is possible that biomimetic analogs stimulate dentin regeneration through greater differentiation of pulp stem cells into odontoblasts and guided mineralization of the dentin matrix, resulting in the formation of a reparative dentin with superior histological characteristics to that found with the use of Ca(OH)₂ and MTA and in less time. The aim of this study was to verify whether the use of a biomimetic analog (polyaspartic acid, pAsp) associated with MTA would provide superior results to pulp capping with MTA only. Wistar rats (N=56) were divided into two groups, according to the postoperative period (7 and 21 days) and treatment. Under general anesthesia, mechanical pulp exposure of the occlusal surface of the first maxillary molars were performed followed by one of the treatments (randomly defined, n=7): C Group (negative control) - only sealing the cavity with flowable resin composite; MTA Group (positive control) - pulp capping with MTA and cavity sealing with flowable resin composite; pAsp Group - application of 20 µL of pAsp solution and sealing the cavity with flowable resin composite; MTA / pAsp Group - application of MTA mixed with pAsp solution in the ratio of 5:1 (by mass) and sealing the cavity with flowable resin composite. After euthanasia and processing of the hemimaxillas, the sections were submitted to histopathological analysis (HE staining and Brown and Brenn staining modified by Taylor) and immunohistochemical analysis to detect Dentin Sialoprotein (DSP), Nestin, Osteopontin (OPN) and Dentin Matrix Protein 1 (DMP-1). At 7 days, the presence of acute inflammatory infiltrate and formation of disorganized mineralized tissue was observed in all groups. The quality and thickness of the reparative dentin formed at 21 days in the treated groups was superior to that found

in the control group. There was bacterial contamination only in some specimens isolated in the MTA-pAsp group at 21 days. Immunostaining for both DMP-1 and OPN was higher in the treated groups when compared to the control group in both periods, and the pAsp group showed a superior ability to express OPN than the other groups. Immunistochemical reactions for the detection of DSP and nestin did not show positive immunostaining. The use of poly(aspartic) acid in dentin regeneration in rats proved to be an alternative as effective as the isolated use of MTA in direct pulp capping.

Keywords: Dental pulp capping; Tooth remineralization; Calcium silicate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Aspecto clínico do primeiro molar superior do rato antes da exposição pulpar mecânica (A), após a exposição (B) e após o capeamento pulpar e selamento da cavidade (C)..... 39
- Figura 5.1 - Aspecto histológico da câmara pulpar aos 7 dias (A-D) e 21 dias (E-H) pós capeamento pulpar. (A, E) As setas mostram a formação de tecido mineralizado nos grupos controle (A, E), MTA (B, F), MTA-pAsp (C, G) e no grupo pAsp (D, H). Fotomicrografias em maior aumento da dentina reparativa formada nos grupos MTA-pAsp (I) e pAsp (J). Abreviações e símbolos: setas, dentina reparativa; *, área de necrose; Δ, infiltrado inflamatório; tp, tecido pulpar sadio. Coloração: *Hematoxilina e Eosina*. Aumento original 10x. Barras de escala: 100 μm..... 44
- Figura 5.2 - Fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados com a técnica de Brown & Brenn modificada por Taylor. (A) Ausência de penetração bacteriana na câmara pulpar aos 21 dias pós capeamento pulpar com MTA. (B) As setas mostram a presença de contaminação bacteriana próximo ao local de exposição pulpar no grupo MTA-pAsp aos 21 dias pós capeamento pulpar. Aumento original 10x. Barras de escala: 100 μm 45
- Figura 5.3 - Fotomicrografias mostrando os cortes submetidos à reação imunoistoquímica para detecção de DMP-1 aos 7 dias (A-D) e 21 dias (E-J) pós capeamento pulpar. (A, E) As setas mostram a região imunomarcada nos grupos controle (A, E), MTA (B, F), MTA-pAsp (C, G) e no grupo pAsp (D, H). I e J representam a ampliação de F e H, respectivamente. Aumento original 10x e 20x. Barras de escala: 100 μm e 50 μm 47
- Figura 5.4 - Fotomicrografias mostrando os cortes submetidos à reação imunoistoquímica para detecção de OPN aos 7 dias (A-D) e 21 dias (E-J) pós capeamento pulpar. (A, E) As setas mostram a região imunomarcada nos grupos controle (A, E), MTA (B, F), MTA-pAsp (C, G) e no grupo pAsp (D, H). I e J representam a ampliação de F e H, respectivamente. Aumento original 10x e 20x. Barras de escala: 100 μm e 50 μm 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP-2	proteína morfogenética óssea 2
C	controle negativo
CA	Califórnia
Ca ²⁺	íon cálcio
Ca(OH) ₂	cimento de hidróxido de cálcio
DAB	tetracloridrato de diamibenzidina
DMP-1	proteína da matriz dentinária 1
DSP	sialoproteína dentinária
E	módulo de elasticidade
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EUA	Estados Unidos da América
FGF-2	fator de crescimento fibroblástico
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
g	gramas
GPa	gigapascal
GSK-3	enzima glicogênio sintase cinase 3
H	nanodureza
HE	hematoxilina e eosina
HRP	peroxidase endógena
LN	long neck
Ltda	limitada
M	molar
Mg ²⁺	íon magnésio/cátion bivalente de magnésio
mg/mL	miligramas por mililitros
mg/Kg	miligramas por quilogramas
mL	mililitros
mm	milímetros
MO	Missouri
MTA	trióxido agregado mineral
Micro-CT	microtomografia computadorizada

MW	microwave
N	tamanho amostral total
n	tamanho amostral por grupo
NaCl	solução salina
n ^o	número
OCN	osteocalcina
OPN	osteopontina
pAsp	ácido poliaspártico
PBS	tampão fosfato salino
pH	potencial hidrogeniônico
PILP	precursor líquido induzido por polímero
PR	Paraná
PTFE	fita de Teflon
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
Si ⁴⁺	íon silício
SP	São Paulo
TGF- β 1	fator de crescimento transformador
TMD	matriz dentinária tratada
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial
μ g/mL	microgramas por mililitro
μ L	microlitro
μ m	micrômetro
Zn ²⁺	íon zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

=	igual
%	por cento
±	mais ou menos
°C	graus Celsius
®	marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	Materiais para capeamento pulpar direto	27
2.2	O uso de análogos biomiméticos na remineralização dentinária funcional	28
2.3	Desenvolvimentos recentes em regeneração dentinária.....	30
2.4	Modelos animais para a avaliação da reparação pulpar.....	32
3	PROPOSIÇÃO	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1	Delineamento experimental	37
4.2	Grupos experimentais – fator “tratamento”	37
4.3	Anestesia	38
4.4	Exposição pulpar mecânica.....	39
4.5	Eutanásia e obtenção das amostras	40
4.6	Processamento laboratorial das amostras	40
4.7	Análise histopatológica	41
4.8	Análise imunoistoquímica	41
4.9	Análise dos dados	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Condições gerais de saúde e exame intrabucal.....	43
5.2	Aspecto histopatológico.....	43
5.3	Aspecto imunoistoquímico.....	45
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXOS	63

1 INTRODUÇÃO

A reparação do tecido conjuntivo pulpar exposto e a formação de dentina terciária reparativa requerem a aplicação de materiais bioativos no local da exposição com o objetivo de estimular a proliferação e a diferenciação celular (1, 2). Estudos clínicos mostram que as taxas de sucesso de procedimentos de capeamento pulpar direto apresentam redução a longo prazo (3-5), o que é explicado, em parte, pelo fato dos biomateriais utilizados não apresentarem controle específico sobre os mecanismos de sinalização celular que possibilitariam restaurar as características estruturais e funcionais do tecido dentinário (6). Como consequência, barreiras mineralizadas muito finas (aumentando o risco de recontaminação do tecido adjacente) ou um excesso de tecido mineralizado com estrutura desorganizada são achados frequentes em avaliações histológicas (7, 8). Adicionalmente, embora a inflamação seja considerada “uma resposta adaptativa para restaurar a homeostase” (9), materiais usados no capeamento pulpar não são capazes de controlar processos inflamatórios intensos e persistentes, que podem se tornar irreversíveis, levando à necrose do tecido pulpar, ou resultar na formação de uma barreira mineralizada incompleta, com características de tecido osteoide (10). Para superar estas limitações e promover um melhor prognóstico a longo prazo, é necessário ampliar o foco das pesquisas em busca de técnicas regenerativas mais eficazes e confiáveis do que as terapias tradicionais.

Por décadas, o cimento de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) foi considerado o material “padrão ouro” a ser utilizado como capeador pulpar, porém recentemente os cimentos à base de silicato de cálcio, como o agregado trióxido mineral (MTA), inicialmente introduzido no mercado como um material selador de perfurações e retro-obturador em cirurgias parodontológicas, têm sido bastante utilizado como alternativa ao Ca(OH)_2 (11-13). A remineralização dentinária por meio de análogos biomiméticos (análogos de proteínas não-colágenas) tem como objetivo guiar a precipitação de apatita para dentro da malha colágena promovendo dessa forma a deposição de apatita intra e interfibrilar, recuperando não apenas o conteúdo mineral, mas também suas propriedades mecânicas (14).

Não obstante os bons resultados clínicos alcançados com cimentos à base de silicato de cálcio e Ca(OH)_2 no reparo pulpar, dados clínicos mostram que procedimentos de capeamento pulpar direto apresentam taxas de sucesso relativamente baixas em períodos de acompanhamento superiores a cinco anos (13). Considerando o recente sucesso nas pesquisas na área de remineralização dentinária e a possibilidade de se realizar modificações na composição do MTA por meio de acréscimos à sua formulação, o uso de análogos de proteínas não-colágenas representa uma alternativa com potencial de estimular a regeneração dentinária. Com base nos resultados apresentados por Thrivikraman *et al.* (2019) (15), espera-se que a presença do ácido poli(aspártico) no local da exposição pulpar aumente/acelere a mineralização da matriz dentinária depositada pelas células *odontoblast-like* e, a partir da mineralização da matriz de colágeno a diferenciação odontoblástica das células-tronco pulpares mediada por mecanotransdução seja estimulada, resultando em uma dentina reparativa com características histológicas superiores à encontrada com o uso apenas de materiais para capeamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Materiais para capeamento pulpar direto

Quando o tecido conjuntivo pulpar é exposto, fibroblastos próximos à área da lesão passam a secretar fatores de crescimento (por exemplo, fator de crescimento transformador, TGF- β 1, e fator de crescimento fibroblástico, FGF-2) que induzem a proliferação e migração de fibroblastos e células-tronco da polpa para o local da exposição. Os fibroblastos passam a secretar citocinas pró-inflamatórias (fator de crescimento vascular endotelial, VEGF, interleucina 6 e fragmentos do complemento C3a e C5a) que induzem alterações vasculares relacionadas ao recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão, enquanto células-tronco se diferenciam em células *odontoblast-like* e passam a secretar matriz dentinária (16, 17).

Cimentos de hidróxido de cálcio, Ca(OH)₂, e materiais à base de silicato de cálcio utilizados em capeamento pulpar direto apresentam mecanismos de ação semelhantes, resultantes de sua capacidade de liberação de íons hidroxila e cálcio. A hidroxila é responsável pela alcalinização da área lesionada, importante para inibir a atividade microbiana e promover a formação de uma camada necrótica na interface com o tecido pulpar, o que protege o tecido conjuntivo de novas agressões. O aumento do pH do meio também favorece a expressão da fosfatase alcalina e da proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2), promovendo formação de nódulos mineralizados (18, 19). Íons cálcio estão envolvidos nos processos de recrutamento, proliferação e diferenciação celular (2, 20) e na modulação dos níveis de osteopontina (OPN) e BMP-2 nas células pulpares, relacionadas à mineralização da matriz dentinária (21, 22).

Estudos clínicos com acompanhamento de até dois anos relatam taxas de sucesso próximas de 90% (4, 23). Porém, de modo geral o sucesso dos capeamentos pulpares diminui com o tempo de acompanhamento, sendo relatadas taxas ao redor de 80% nos primeiros cinco anos (4, 5, 13) e 76,3% após nove anos (5). Quando realizado por estudantes de odontologia, capeamentos com Ca(OH)₂

apresentaram taxa de sucesso de apenas 37% após cinco anos, caindo para 13% após 10 anos (3).

Muito embora não existam dados clínicos suficientes para afirmar a superioridade de um material sobre o outro (17, 24, 25), de modo geral os estudos *in vitro* apontam para um melhor desempenho dos materiais à base de silicato de cálcio em relação ao Ca(OH)_2 . Cimentos de silicato de cálcio mantêm a alcalinidade do meio por períodos mais longos do que o Ca(OH)_2 e com isso o efeito antimicrobiano é prolongado, contribuindo para a redução da inflamação pulpar (13, 26). Finalmente, enquanto o Ca(OH)_2 promove a formação de uma barreira mineralizada com incorporação de vasos sanguíneos e defeitos em forma de túnel, que comprometem o vedamento da polpa subjacente contra penetração bacteriana, a barreira mineralizada formada com cimentos à base de silicato de cálcio é mais homogênea e mineralizada com menos inclusões vasculares e defeitos, e com maior espessura (7, 27, 28).

2.2 O uso de análogos biomiméticos na remineralização dentinária funcional

Na última década, diversos grupos de pesquisa têm se dedicado ao estudo da remineralização dentinária como forma de recuperar a função da dentina afetada por cárie ou aumentar a longevidade de interfaces adesivas (14, 29-31). O reestabelecimento da funcionalidade da dentina afetada requer não apenas a precipitação de minerais entre as fibrilas colágenas da matriz dentinária (região extra-fibrilar), mas também nas zonas de *gap* do colágeno (região intra-fibrilar) (32). Nessa abordagem, análogos de proteínas não-colágenas são empregados para direcionar o início da deposição mineral para os espaços intra-fibrilares e assim permitir que cristais de apatita cresçam ao longo das fibrilas colágenas (remineralização biomimética ou *bottom-up*) (33). Estratégias de remineralização biomimética foram reportadas com o uso de diferentes análogos. Por exemplo, nanoprecusores de fosfato de cálcio amorfo metaestáveis foram formados em uma solução de água deionizada contendo ácido poliacrílico, uma fonte de fosfato e cimento Portland como fonte de íons cálcio. Na presença do ácido polivinilfosfônico, esses nanoprecusores foram atraídos para o colágeno da matriz dentinária

desmineralizada, passando a assumir organização de nanocristais de apatita no interior e na superfície das fibrilas (14, 34). A associação entre a ácido poliacrílico e o trimetafosfato de sódio (envolvido no processo de fosforilação das fibrilas de colágeno) também demonstrou favorecer a nucleação de apatita a partir de nanoprecursos amorfos (30).

Gower *et al.* observaram que a adição do ácido poli(aspártico) a uma solução supersaturada de íons cálcio e fosfato promoveu a formação de nanoprecursos amorfos de fosfato de cálcio ligados aos grupos ionizáveis da molécula (35, 36). Este polipeptídeo é capaz de penetrar nos espaços intra-fibrilares do colágeno por ação capilar (37) ou pelo efeito Gibbs-Donnan (que envolve aspectos relativos a equilíbrio osmótico e eletroneutralidade) (38), atuando como um agente direcionador do processo de mineralização. Esse processo foi denominado “precursor líquido induzido por polímero” (*polymer-induced liquid precursor, PILP*).

O processo PILP foi aplicado na remineralização funcional de blocos de dentina humana desmineralizada mantidos por duas semanas imersos em um tampão remineralizante de fosfato de cálcio contendo 100 µg/mL de poliaspartato. Foi observada uma recuperação significativa do conteúdo mineral, com 55% de aumento no módulo de elasticidade. No grupo controle (tampão fosfato sem poliaspartato) foi observada precipitação mineral apenas na superfície da dentina desmineralizada, sem recuperação mecânica significativa (39). Em um outro estudo, amostras de dentina com lesões de cárie artificiais com aproximadamente 140 µm de profundidade foram mantidas em contato com um cimento de ionômero de vidro modificado por resina contendo ácido poliaspártico (pAsp, 20 % ou 40 % em massa) ou receberam a aplicação de um *primer* contendo 25 mg/mL de pAsp previamente à restauração. Após duas semanas em fluido corporal simulado, observou-se o aumento nos níveis de cálcio e fósforo dos grupos em que o pAsp foi utilizado. A análise por nanoidentação mostrou melhora do módulo de elasticidade (E) e nanodureza (H) nos grupos em que a dentina foi mantida em contato com o cimento contendo pAsp 40% (E = de 0,12 GPa para 1,4 GPa; H = de 0,02 GPa para 0,13 GPa). Os grupos cuja dentina foi reidratada com pAsp antes da restauração apresentaram os maiores aumentos nas propriedades mecânicas, alcançando valores acima de 6 GPa (módulo de elasticidade) e 0,4 GPa (dureza) nas zonas mais externas da lesão e valores próximos aos da dentina hígida (E = 18,1 GPa; H =

0,84 GPa) em profundidades maiores do que 70 μm . Em contraste, a recuperação das propriedades mecânicas da dentina foi mínima na ausência do pAsp (40).

2.3 Desenvolvimentos recentes em regeneração dentinária

Recentemente, várias estratégias vêm sendo investigadas para promover a regeneração dentinária. Algumas delas se baseiam na modulação de vias de sinalização da dentinogênese, por exemplo, a Wnt / β -catenina, importante na mobilização de células-tronco para diferenciação em células *odontoblast-like* (41). A regulação positiva da via de sinalização de Wnt / β -catenina através da aplicação de drogas inibidoras da enzima glicogênio sintase cinase 3 (GSK-3) na área de exposição pulpar em molares de camundongos aumentou a diferenciação odontoblástica, resultando na formação de dentina reparativa com composição próxima à dentina nativa após quatro semanas (41). A Semaforina-3A é uma proteína envolvida na remodelação óssea, com efeito osteoprotetor ao inibir a reabsorção óssea osteoclástica e promover a formação óssea osteoblástica por meio da sinalização de Wnt/ β -catenina (42). Quando Semaforina-3A recombinante humana foi aplicada diretamente na área de exposição pulpar em molares de ratos por meio de uma esponja colágena, observou-se a formação de dentina reparativa com túbulos dentinários e camada de células *odontoblast-like* bem alinhada na região do tecido pulpar exposto após quatro semanas em ratos. *In vitro*, a presença da Semaforina-3A resultou em aumento da migração celular, quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células-tronco pulpares em odontoblastos (43).

Uma pasta contendo 1:1 em volume de pó e extrato aquoso de matriz dentinária tratada (*treated dentin matrix*, TMD) obtida por meio da imersão do tecido dentinário humano em EDTA promoveu maior proliferação de células-tronco pulpares e da expressão gênica da fosfatase alcalina, sialoproteína óssea e sialoproteína dentinária, em comparação com o cimento de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ *in vitro*. O capeamento pulpar em molares de porcos miniatura com a pasta de TMD suína apresentou a formação de barreira mineralizada contínua com presença de túbulos dentinários (similar à dentina primária) e mais espessa do que a formada com o $\text{Ca}(\text{OH})_2$ após seis e dez semanas (44).

A formação de dentina em cavidades preparadas em dentes humanos cujas paredes em dentina foram desmineralizadas com EDTA e preenchidas com *scaffolds* biocerâmicos e células-tronco pulpare humana foi observada *in vitro*. Segundo os autores, a liberação de íons Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} e Si^{4+} pelos *scaffolds* e a liberação de fatores de crescimento (TGF- β 1, proteína da matriz dentinária 1 - DMP-1 e BMP-2) pela matriz de dentinária promoveram a diferenciação celular (45).

Recentemente, foi demonstrado que um análogo de proteínas não-colágenas (osteopontina extraída do leite bovino) empregado para direcionar o início da mineralização nos espaços intra-fibrilares na remineralização biomimética também foi capaz de estimular o processo de diferenciação de células-tronco mesenquimais indiferenciadas (inseridas em um *scaffold* de colágeno) em osteócitos, resultando na formação de tecido ósseo com organização ultraestrutural e composição elementar comparável à do osso humano. O estímulo à diferenciação celular foi atribuído à mineralização biomimética do *scaffold*, que induz alterações morfológicas na células-tronco consistentes com a resposta de células ósseas em maturação à gradual calcificação. A rigidez da matriz mineralizada é um fator importante em mecanismos de diferenciação celular mediada por mecanotransdução, o que foi confirmado neste estudo pela expressão de marcadores osteogênicos nas amostras mineralizadas em níveis comparáveis aos encontrados nas amostras que receberam suplementos osteoindutivos (dexametasona, ácido ascórbico e fosfato de β -glicerol) considerados “padrão-ouro” (15).

Um peptídeo derivado da vitronectina (VnP-16) foi recentemente desenvolvido e demonstrou resultados semelhantes aos encontrados com uso do MTA na formação de dentina reparativa após 4 semanas em um modelo experimental de exposição pulpar em ratos (46). Um outro biomaterial proposto, também apresentou resultados favoráveis e até maior deposição de dentina reparativa quando comparado aos materiais atualmente utilizados foi o microgel fotopolimerizável impresso em 3D suplementado com moléculas bioativas da matriz dentinária (47).

2.4 Modelos animais para avaliação da reparação pulpar

Diversos modelos animais são utilizados em estudos sobre reparação pulpar, incluindo macacos, cães, porcos e ratos (48-52). Sob o ponto de vista histológico, a reparação pulpar em molares de rato após capeamento pulpar é comparável ao que ocorre em humanos em termos de reação inflamatória e formação de dentina reparativa por células *odontoblast-like* em períodos entre duas a quatro semanas (2, 49, 53).

Estudos sobre reparo pulpar *in vivo* utilizam análises histopatológicas para avaliar a resposta inflamatória e a formação de dentina reparativa, análise histomorfométrica para verificar a espessura da barreira mineralizada, e análises imunoistoquímicas de marcadores como a sialoproteína dentinária (DSP, proteína não-colágena que inicia e regula a mineralização da dentina), nestina (proteína de filamento intermediário característica de odontoblasto recentemente diferenciado e/ou secretório), osteocalcina (OCN, proteína não-colágena, marcador de atividade osteogênica), osteopontina (OPN, proteína não-colágena expressa em tecidos mineralizados como osso e dentina, regula a adesão, migração e diferenciação de células progenitoras odontoblásticas), DMP-1 (proteína não-colágena expressa em odontoblastos funcionais e pré-dentina não mineralizada) (54-58). Adicionalmente, a qualidade e quantidade de dentina recém-formada pode ser avaliada através de microtomografia computadorizada (micro-CT) (59, 60).

Protocolos experimentais em molares de ratos variam principalmente com relação ao local escolhido para a exposição pulpar, que pode ser produzida a partir da superfície oclusal (61) ou pela face mesial, devido ao espaço existente entre os incisivos e os primeiro molares (51, 53). As metodologias utilizadas para produzir a exposição pulpar, o tamanho amostral (entre cinco e oito dentes por grupo, dois molares por animal) e período de observação (duas a quatro semanas) variam ligeiramente entre os estudos. A exposição pulpar é produzida com brocas esféricas de aço ou carbide com diâmetro abaixo de 1,0 mm em alta ou baixa rotação, sob irrigação com solução salina estéril (60). Alternativamente, após o preparo da cavidade, a exposição pulpar pode ser produzida com o uso de um explorador (62). Posteriormente, a polpa exposta é capeada diretamente com o material em análise

ou por meio de esponja colágena embebida na droga experimental e a cavidade selada com cimento de ionômero de vidro após o capeamento (41, 43, 60, 62).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do ácido poli(aspártico) associado ou não ao MTA na regeneração dentinária em um modelo experimental animal, através de análises histológicas (coloração por HE e Brown & Brenn modificada por Taylor) e imunoistoquímicas (OPN, DMP-1, DSP e nestina). Foi testada a hipótese que o uso deste análogo biomimético de proteínas não-colágenas associado ou não ao MTA proporcionaria resultados superiores ao capeamento pulpar direto utilizando apenas o MTA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 56 ratos (três meses de idade) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso corporal entre 250 – 300g. O delineamento experimental foi definido com dois fatores principais: “tratamento” (quatro níveis) e “período de observação” (dois níveis). Foram utilizados sete animais por grupo experimental, sendo dois molares por animal. Esse tamanho amostral foi definido com base em estudos anteriores envolvendo regeneração dentinária, nos quais foram avaliados entre cinco e oito dentes por grupo (2, 57, 60, 62) e considerando a possibilidade de perda de um animal por grupo e perdas decorrentes de falha no processamento das amostras. Os animais foram obtidos e mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) sob as seguintes condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$, acondicionamento em rack ventilado com gaiolas plásticas (quatro animais por gaiola), onde tiveram livre acesso a alimento e água. Foram tomadas todas as medidas cabíveis para se minimizar o número de animais utilizados, assim como evitar o seu sofrimento. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FOUSP (Protocolo nº 007/2020) (Anexo A).

4.2 Grupos experimentais – fator “tratamento”

Os 56 animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos de acordo com o período pós-operatório (7 e 21 dias) e os quatro tratamentos foram aleatorizados entre os primeiros molares direitos e esquerdos superiores de cada um dos 28 animais selecionados para aquele período (n=14). Os tratamentos foram os seguintes:

1) Grupo C (controle negativo): após o procedimento de exposição pulpar mecânica, nenhum material capeador foi aplicado e um pedaço de politetrafluoretileno (PTFE; fita de Teflon) previamente esterilizado em calor úmido (autoclave) à temperatura de 121°C, durante 40 minutos, foi colocado no local da exposição, para evitar o contato direto entre o tecido pulpar e a restauração coronal com um compósito “flowable” (NT Premium, Vigodent-Coltene, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) associada a sistema adesivo de dois passos (Single Bond, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA).

2) Grupo MTA (controle positivo): capeamento pulpar com agregado de trióxido mineral (MTA-Angelus; Angelus, Londrina, PR, Brasil), manipulado com água destilada de acordo com as instruções do fabricante. O cimento foi levado em posição com o auxílio da ponta de um explorador endodôntico e acomodado sem pressão com a ponta mais fina de um cone de papel estéril, seguido do selamento com o compósito.

3) Grupo pAsp: aplicação de 20 µL de solução contendo 25 mg/mL de pAsp (27.000 Da, Alamanda Polymers Inc, Huntsville, AL, EUA) por 20 segundos (40) no local da exposição pulpar, seguida remoção do excesso da solução na cavidade por meio de bolinhas de algodão estéreis, colocação de um pedaço estéril de fita de Teflon e do selamento com o compósito.

4) Grupo MTA/pAsp: as partículas do MTA foram misturadas ao pAsp na razão de 5:1 (em massa) antes da manipulação do material com solução fisiológica estéril. O material foi aplicado sobre o local da exposição pulpar com o auxílio da ponta de um explorador endodôntico e acomodado sem pressão com a ponta mais fina de um cone de papel estéril. Em seguida, foi feito o selamento com o compósito.

Após o selamento das cavidades, foi realizado o alívio das pontas de cúspides dos dentes antagonistas para minimizar a ação de forças oclusais.

4.3 Anestesia

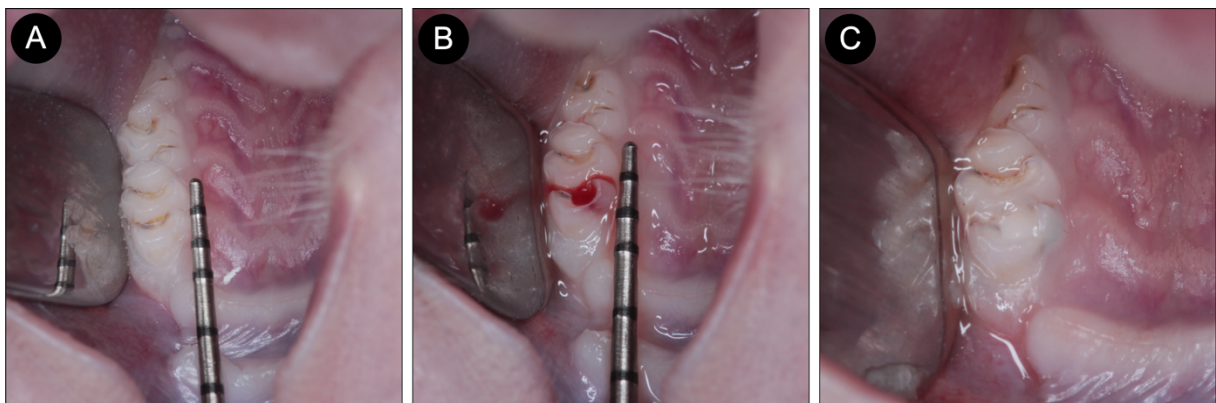
Para a execução dos procedimentos cirúrgicos e eutanásia os animais foram anestesiados, via injeção intramuscular, com cloridrato de cetamina (87 mg/Kg,

Francotar[®], Virbac, SP, Brasil) e cloridrato de xilazina (13 mg/Kg, Rompum[®], Bayer, RS, Brasil).

4.4 Exposição pulpar mecânica

Após anestesia, foi realizada a desinfecção do dente com algodão embebido em gluconato de clorexidina 2%, seguida do preparo de uma cavidade na superfície oclusal dos primeiros molares superiores com o uso de uma ponta de aço esférica estéril (1 mm; Broca LN Long Neck; Dentsply Industria e Comercia Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) acoplada a um motor de baixa rotação sob irrigação com solução salina estéril (0,9% NaCl), auxílio de uma lupa com aumento de 3,5x. A ponta foi trocada a cada duas cavidades preparadas. Foi realizada a penetração de aproximadamente metade do diâmetro da ponta ativa da broca na fóssula mesial da face oclusal e a exposição pulpar propriamente dita foi finalizada por meio da penetração de uma lima endodôntica #15, a fim de produzir uma exposição com 1 mm de diâmetro (Figura 4.1). As dimensões das cavidades foram aferidas por meio de fotografia. O controle do sangramento foi realizado por meio de pressão leve com bolinhas de algodão estéreis embebida em solução salina.

Figura 4.1 - Aspecto clínico do primeiro molar superior do rato antes da exposição pulpar mecânica (A), após a exposição (B) e após o capeamento pulpar e selamento da cavidade (C)



Fonte: A autora.

4.5 Eutanásia e obtenção das amostras

Os animais foram sacrificados após 7 ou 21 dias e as hemimaxilas, incluindo os dentes, foram cuidadosamente dissecadas. As amostras foram imersas em um recipiente contendo 100 ml da solução fixadora constituída por 4% de formaldeído (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) acrescido de 0,1% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 a temperatura ambiente, o qual que foi colocado em um recipiente de vidro maior preenchido com gelo. O conjunto foi imediatamente colocado em um forno de microondas de laboratório (Pelco 3400, Ted Pella; Redding, California, EUA), onde as amostras foram expostas a irradiação microwave (MW) com potência a 100% por três ciclos de cinco minutos sob temperatura controlada de 36 °C e então transferidas para nova solução fixadora e deixadas a 4 °C durante a noite (63).

4.6 Processamento laboratorial das amostras

As amostras foram submetidas à lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, e imersas em solução desmineralizadora (constituída por tampão fosfato salino - PBS acrescida de 4,13% de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA, pH 7,2, sob agitação, durante 45 dias, trocadas três vezes por semana). Após a desmineralização, as peças foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, desidratadas em soluções de etanol em concentrações crescentes, diafanizadas, impregnadas e incluídas em parafina (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) de modo que a face vestibular do dente molar ficasse paralela à superfície de corte do bloco. Foram realizados cortes seriados longitudinais com 5 µm de espessura na direção mesio-distal. Foram coletados um número mínimo de dez cortes por espécime correspondendo à região da exposição pulpar. As secções histológicas foram submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina para a análise histopatológica e coloração de Brown e Brenn modificada por Taylor para eliminar a possibilidade de contaminação bacteriana do tecido pulpar. Para a análise imunoistoquímica, foi empregada a técnica da imunoperoxidase indireta para

detecção da sialoproteína dentinária (DSP), nestina, osteopontina (OPN) e proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1).

4.7 Análise histopatológica

Foram utilizadas três secções histológicas de cada uma das amostras. As secções histológicas foram submetidas à coloração pela hematoxilina-eosina (HE) e Brown & Brenn modificada por Taylor (64). A análise histopatológica foi efetuada por meio de microscópio de luz (Olympus BX-60, Tóquio, Japão) acoplado ao sistema de captura de imagens Cell F (Olympus, Tóquio, Japão) avaliando-se os seguintes parâmetros: formação da barreira mineralizada, qualidade da barreira mineralizada formada, grau de inflamação pulpar e presença ou ausência de contaminação bacteriana.

4.8 Análise imunoistoquímica

Para as reações imunoistoquímicas foi empregada a técnica da imunoperoxidase indireta. As secções histológicas foram divididas em quatro lotes e incubadas nos seguintes anticorpos primários: anti-DSP monoclonal de rato (MABT37, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 1:100 por 18 horas, anti-nestina monoclonal de rato (sc – 58813, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) na concentração de 1:20 por 18 horas, anti-OPN monoclonal de rato (sc – 21742, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) na concentração de 1:1000 por 3 horas e anti-DMP1 monoclonal de rato (MABD19, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 1:20 por 18 horas. Em seguida, para amplificação do sinal foram incubadas em anticorpo secundário do sistema HRP (Dako EnVision + Dual Link System – HRP, Dako North America, CA, EUA) por 30 minutos em ambiente escuro e câmara úmida. Para revelação, foi realizado incubação com o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Dako, Carpinteria, CA, EUA) por 10 minutos, de acordo com as orientações do fabricante. Ao término das reações

imunoistoquímicas, os cortes receberam a contra-coloração pela hematoxilina de Mayer. O controle negativo das reações imunoistoquímicas foi executado utilizando-se o protocolo descrito anteriormente, sem a utilização dos anticorpos primários.

Os cortes histológicos foram analisados sob iluminação de campo claro em microscópio de luz (Olympus BX-60) por investigador cego aos grupos analisados. A imunomarcção foi definida como um precipitado de coloração acastanhada nas células e/ou matriz extracelular. A especificidade das imunomarcções foi verificada pela ausência de coloração nos controles negativos.

4.9 Análise dos dados

Foi realizada a análise qualitativa nos cortes corados pela HE e pela técnica de Brown e Brenn modificada por Taylor e das áreas imunomarcadas na região do defeito cirúrgico levando em consideração a localização, distribuição e intensidade da marcação. A análise dos dados foi apresentada de forma apenas descritiva.

5 RESULTADOS

5.1 Condições gerais de saúde e exame intrabucal

As condições gerais de saúde dos animais utilizados neste estudo se mantiveram estáveis durante todo o período experimental e todos toleraram bem os procedimentos experimentais. Não houve diferença intragrupo e intergrupos no peso corporal médio dos animais ao longo do experimento (dados não mostrados). Ao exame intrabucal, não foram observadas alterações em nenhum dos grupos experimentais.

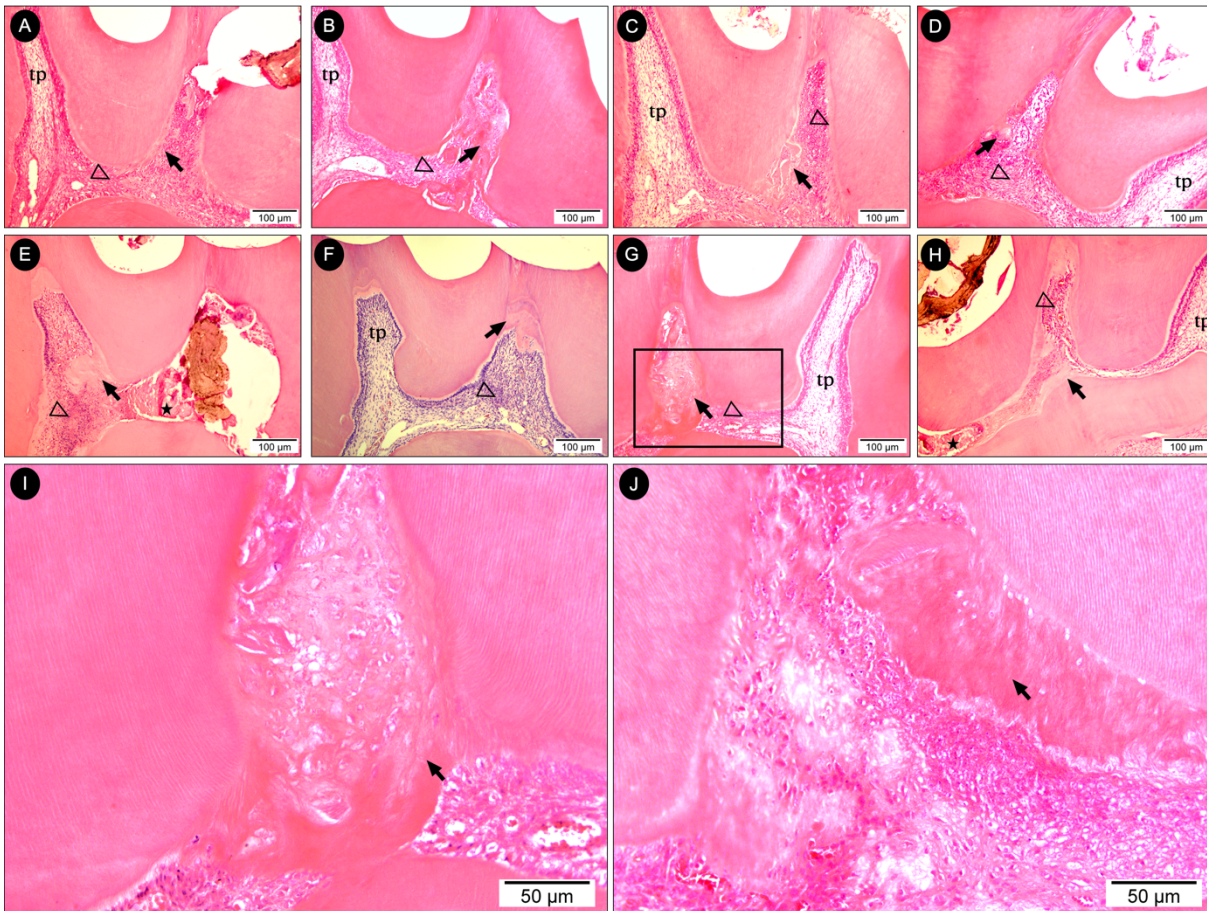
5.2 Aspecto histopatológico

Todos os grupos experimentais apresentaram hiperemia severa aos 7 dias, independentemente do tratamento aplicado. O grupo MTA-pAsp apresentou a maior extensão de infiltrado inflamatório agudo, seguido pelos grupos controle, MTA e pAsp, respectivamente. Restos necróticos e lascas de dentina estavam presentes em todos os espécimes analisados. Aos 7 dias, foi observada formação de um tecido mineralizado desorganizado próximo ao local de exposição, isolado na polpa ou em continuidade com a dentina em todos os grupos (Figura 5.1).

Aos 21 dias, houve redução do infiltrado inflamatório e a formação de dentina reparativa com estrutura tubular e com poucas áreas de inclusão celular em todos os grupos; porém, as características como espessura, ausência de defeitos, deposição regular e completa da barreira formada nos grupos MTA, MTA-pAsp e pAsp foi superior ao encontrado no grupo controle. Além disso, no grupo controle foi observado uma maior área necrótica remanescente na polpa assim como maior quantidade de infiltrado inflamatório.

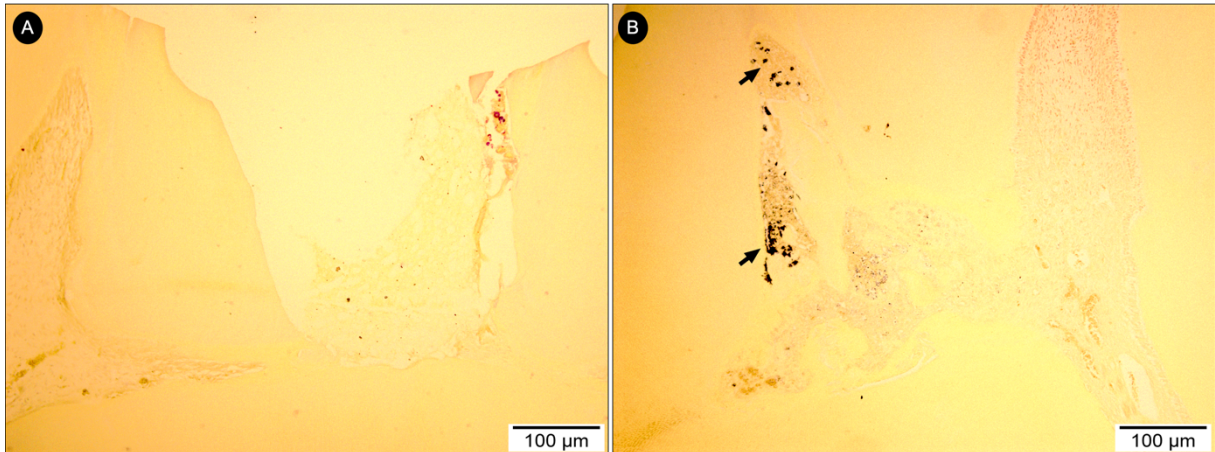
Em ambos os períodos não foi observada contaminação bacteriana, exceto em alguns espécimes isolados (2 dentes) no grupo MTA-pAsp aos 21 dias (Figura 5.2), os quais foram excluídos da análise.

Figura 5.1 – Aspecto histológico da câmara pulpar aos 7 dias (A-D) e 21 dias (E-H) pós capeamento pulpar. (A, E) As setas mostram a formação de tecido mineralizado nos grupos controle (A, E), MTA (B, F), MTA-pAsp (C, G) e no grupo pAsp (D, H). Fotomicrografias em maior aumento da dentina reparativa formada nos grupos MTA-pAsp (I) e pAsp (J). Abreviações e símbolos: setas, dentina reparativa; *, área de necrose; Δ , infiltrado inflamatório; tp, tecido pulpar sadio. Coloração: *Hematoxilina e Eosina*. Aumento original 10x. Barras de escala: 100 μ m.



Fonte: A autora.

Figura 5.2 – Fotomicrografias representativas de cortes histológicos corados com a técnica de Brown & Brenn modificada por Taylor. (A) Ausência de penetração bacteriana na câmara pulpar aos 21 dias pós capeamento pulpar com MTA. (B) As setas mostram a presença de contaminação bacteriana próximo ao local de exposição pulpar no grupo MTA-pAsp aos 21 dias pós capeamento pulpar. Aumento original 10x. Barras de escala: 100 μ m.



Fonte: A autora.

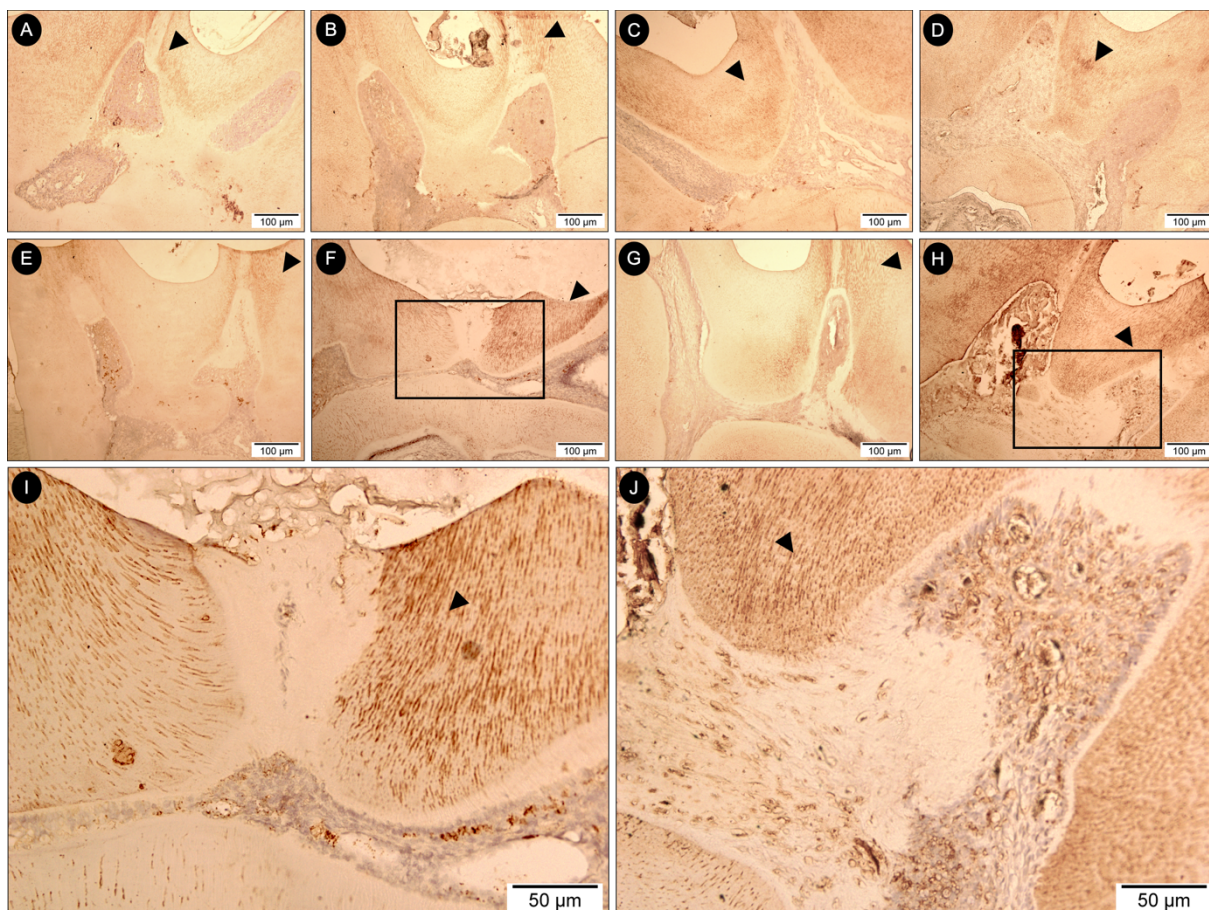
5.3 Aspecto imunoistoquímico

Reação positiva para o anticorpo anti-DMP-1 foi observada na dentina adjacente à exposição pulpar em todos os grupos aos 7 dias, sendo que nos grupos MTA-pAsp e pAsp é evidente o aumento da marcação em comparação ao controle. Aos 21 dias após o capeamento pulpar, os quatro grupos experimentais mostraram aumento na expressão de DMP-1 em comparação ao grupo 7 dias; no entanto, nos grupos experimentais MTA, MTA-pAsp e pAsp o aumento da expressão proteica é muito mais evidente em comparação ao grupo controle 21 dias (Figura 5.3).

Uma expressiva imunomarcagem para OPN foi observada na região do complexo dentino-pulpar aos 7 dias após o capeamento pulpar, principalmente nos grupos MTA, MTA-pAsp e pAsp. É interessante notar que após 21 dias o grupo pAsp mostrou uma capacidade de expressar OPN que superou os demais grupos, mobilizando células em camadas mais profundas do tecido pulpar e não apenas os odontoblastos da região de pré-dentina conforme observado nos demais grupos (Figura 5.4).

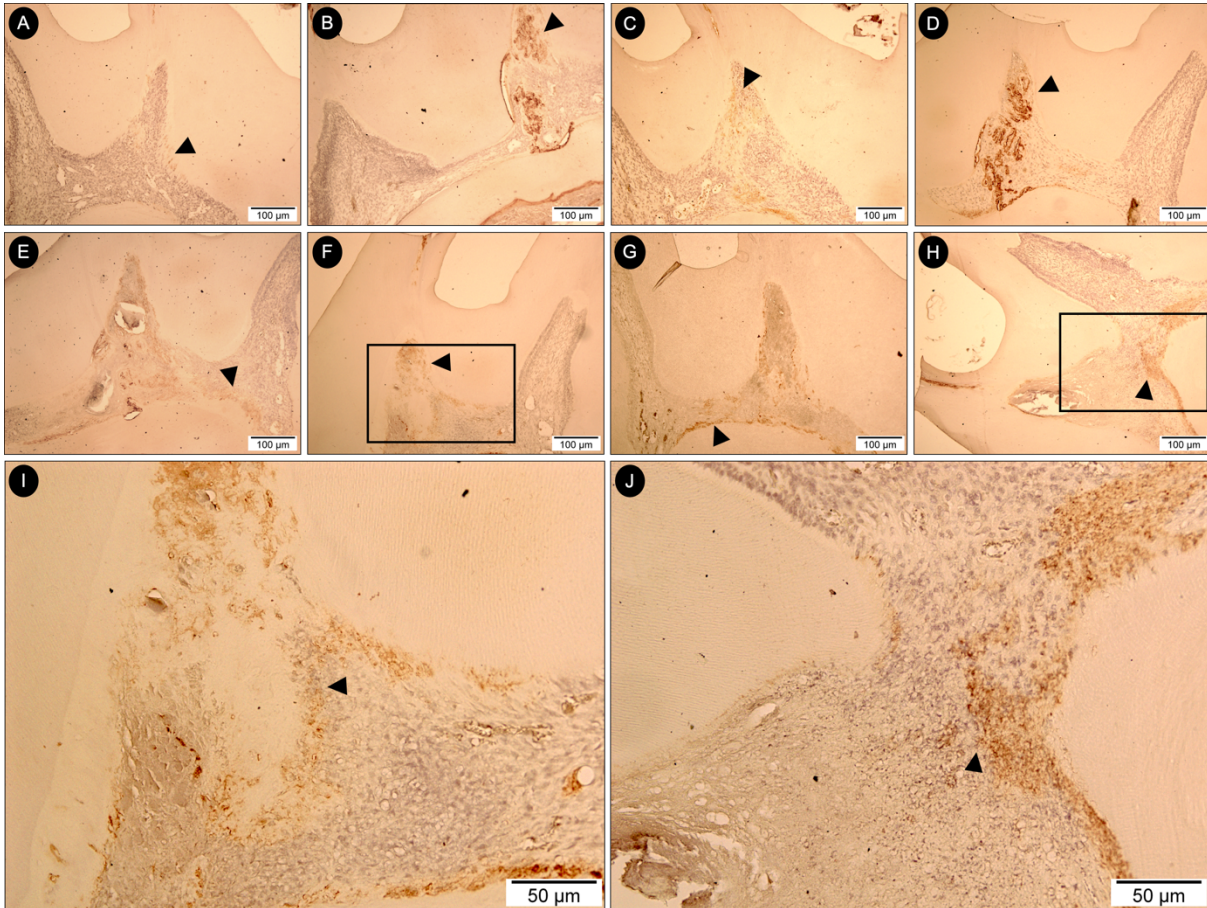
Os cortes submetidos às reações imunoistoquímicas para a detecção de DSP e nestina não apresentaram imunomarcagem positiva.

Figura 5.3 – Fotomicrografias mostrando os cortes submetidos à reação imunoistoquímica para detecção de DMP-1 aos 7 dias (A-D) e 21 dias (E-J) pós capeamento pulpar. (A, E) As setas mostram a região imunomarcada nos grupos controle (A, E), MTA (B, F), MTA-pAsp (C, G) e no grupo pAsp (D, H). I e J representam a ampliação de F e H, respectivamente. Aumento original 10x e 20x. Barras de escala: 100 μ m e 50 μ m.



Fonte: A autora.

Figura 5.4 – Fotomicrografias mostrando os cortes submetidos à reação imunoistoquímica para detecção de OPN aos 7 dias (A-D) e 21 dias (E-J) pós capeamento pulpar. (A, E) As setas mostram a região imunomarcada nos grupos controle (A, E), MTA (B, F), MTA-pAsp (C, G) e no grupo pAsp (D, H). I e J representam a ampliação de F e H, respectivamente. Aumento original 10x e 20x. Barras de escala: 100 μ m e 50 μ m.



Fonte: A autora.

6 DISCUSSÃO

A formação de uma barreira mineralizada é imprescindível para a manutenção da vitalidade da polpa exposta. Para que isso ocorra, deve haver um controle de infecção e o material utilizado para o selamento da exposição pulpar traumática ou acidental deve promover o recrutamento de células-tronco progenitoras para o local lesado e sua subsequente proliferação e diferenciação em células *odontoblast-like*, capazes de secretar uma matriz de dentina terciária para a formação da barreira mineralizada (65). Neste estudo, foi testada a hipótese que a associação do ácido poli(aspártico), um análogo de proteínas não-colágenas, com o MTA promoveria uma melhor reparação da dentina exposta em molares de ratos e em menor tempo. Os resultados das análises histológicas e imunoistoquímicas permitem rejeitar a hipótese do estudo, uma vez que não foram observadas diferenças no processo reparativo em dentes tratados apenas com MTA ou MTA associado ao pAsp. No entanto, os dentes tratados apenas com o análogo biomimético promoveram a formação de uma dentina reparativa de forma semelhante ao MTA, sugerindo que este peptídeo pode ser considerado alternativa para o tratamento de exposições pulpares.

A análise histopatológica demonstrou que as exposições pulpares tratadas com 20 µL da solução contendo 25 mg/mL de pAsp, seguido pelo selamento da cavidade com teflon e aplicação de sistema adesivo e compósito resinoso apresentou resposta inflamatória leve após 21 dias e promoveu a formação de dentina reparativa em níveis semelhantes aos alcançados com MTA e superiores quantitativamente e qualitativamente ao grupo sem tratamento. Nos três grupos tratados, a dentina reparativa apresentou característica homogênea, com poucos defeitos, estrutura tubular semelhante à dentina primária e poucas áreas de inclusão celular, de acordo com critérios avaliados em estudos anteriores (66, 67). Essa homogeneidade pode ter sido resultado de uma rápida formação de dentina, o que é evidenciado pela expressão de OPN nos grupos aos 7 dias após o capeamento. A natureza desse novo tecido formado ainda não é totalmente conhecida, mas sabe-se que geralmente durante a sua formação, células *odontoblast-like* ficam aprisionadas na matriz. Tais inclusões celulares, identificadas no presente estudo, caracteriza a chamada osteodentina (68).

O controle negativo apresentou as maiores áreas de degeneração tecidual quando comparados com os grupos tratados. Em algumas amostras, foram identificadas áreas de calcificação intrapulpar. A formação de dentina reparativa em resposta ao material ou tentando isolar a região da agressão/necrótica foi observada, assim como a presença de lascas de dentina, as quais podem ter desencadeado a formação da dentina reparativa.

A profiliação e diferenciação de células *odontoblast-like* é promovida pela inflamação que precede a formação da barreira mineralizada e pela liberação de íons cálcio do MTA. Estas células substituem os odontoblastos danificados e passam a secretar matriz dentinária. Íons cálcio presentes no fluido tissular e liberados pelo MTA se unem aos íons fosfato presentes no fluido tecidual para formar os cristais de hidroxiapatita ao redor da matriz colágena recém-secretada (67, 69). *Gower et al.* postularam que a formação de nanoprecursos líquidos sequestrados por polímeros polianiónicos pode ser um passo fundamental na biomineralização (70). A remineralização biomimética provou facilitar a mineralização intrafibrilar do colágeno tipo 1 e reintroduzir os cristalitos de apatita nas matrizes de colágeno de maneira semelhante ao processo natural (40). Uma variedade de análogos de proteínas não colágenas vem sendo utilizadas com essa finalidade, dentre eles o ácido poli(aspártico) que formam nanoprecursos de fosfato de cálcio fluídicos capazes de penetrar nos espaços intrafibrilares do colágeno e nuclear o crescimento de cristais de apatita usando as fibrilas como modelos de biomineralização (31). Baseado nisso, é possível que no grupo MTA-pAsp, o ácido poli(aspártico) tenha atuado como análogo biomimético de proteínas da matriz formando nanoaglomerados amorfos a partir de íons cálcio provenientes do MTA e fosfato do meio, estabilizando esses cristais e guiando a mineralização. A formação da barreira mineralizada no grupo pAsp, na ausência dessa fonte adicional de cálcio (MTA), sugere que esses íons foram provenientes do meio, e o ácido também foi capaz de estimular o processo de migração e diferenciação de células-tronco mesenquimais indiferenciadas em células *odontoblast-like*.

Durante a formação da dentina, os odontoblastos sintetizam e secretam várias proteínas não-colágenas na matriz extracelular. A OPN é expressa em tecidos mineralizados como o osso, cimento e pré-dentina, mas não é encontrada na dentina primária madura. Sugere-se que ela regule os eventos iniciais que levam à formação da dentina reparativa (71). A osteopontina tem uma alta capacidade de ligação ao cálcio, embora seja inibitória ao crescimento dos cristais, regula a

adesão, migração e diferenciação de células progenitoras odontoblásticas (55). No presente estudo, foram observadas expressões positivas de OPN em todos os grupos entre a camada necrótica e o tecido pulpar subjacente principalmente aos 7 dias com um sutil aumento dessa expressão aos 21 dias, o que é consistente com os achados em estudos anteriores (55, 72).

A DSP, é considerada um marcador bioquímico específico de odontoblastos funcionais, sendo essencial na formação da dentina, pois promove a diferenciação celular, migração, além de iniciar e regular a biomineralização (73). Outra proteína característica de odontoblastos funcionais é a nestina (72). Em estudos anteriores, a expressão da nestina foi inicialmente perdida em odontoblastos danificados após a exposição pulpar, mas detectada em células *odontoblast-like* recém-diferenciadas (55, 72). Embora em nosso estudo não tenha sido possível detectar DSP e nestina, provavelmente por algum erro técnico, observamos a expressão da DMP-1. A DMP-1, expressa em odontoblastos funcionais e na pré-dentina não mineralizada, está envolvida na biomineralização da dentina, metabolismo mineral e diferenciação odontoblástica. A sua disposição durante a dentinogênese reparativa ainda não foi completamente elucidada (72, 73). Neste estudo, a DMP-1 foi detectada na dentina adjacente à exposição pulpar, sugerindo seu envolvimento inicialmente na diferenciação celular junto com a osteopontina e, posteriormente, na biomineralização. A observação de que aos 7 dias a DMP-1 era menos abundante do que quando comparado ao período de 21 dias, indica que as células *odontoblast-like* recém diferenciadas ainda não eram funcionalmente maduras.

No grupo controle, foi observada a formação parcial de uma barreira mineralizada com estrutura tubular osteoide e inflamação crônica moderada persistente. Isso pode ser explicado devido a um mecanismo de defesa específico dos ratos, que lhes confere resiliência e maior capacidade de cicatrização do que muitos outros animais. Nos ratos, o tecido pulpar é mais reativo e por isso mesmo na ausência de um agente de capeamento pulpar ocorre a formação espontânea de uma barreira mineralizada (49). Para distinguir indutor do material de cobertura da reação de auto-reparo do animal, um material quimicamente inerte, fita de Teflon, foi utilizado para permitir a avaliação das próprias respostas pulpares dos ratos.

A reação inflamatória observada no grupo tratado com o MTA foi transitória e ocorreu de forma limitada em níveis que influenciaram positivamente o reparo pulpar e formação de uma barreira mineralizada espessa e com estrutura tubular, diferente

do que foi observado no grupo controle e semelhante ao encontrado em estudos anteriores (67, 69).

Por ser o primeiro estudo *in vivo* a avaliar o efeito do ácido poli(aspártico) associado ou não ao MTA na regeneração dentinária, várias limitações foram encontradas. O MTA tornou-se muito popular devido à sua biocompatibilidade e capacidade de tomar presa mesmo em ambiente úmido (20). No entanto, a mistura das partículas de MTA e pAsp alterou as características do cimento. Foi observado um aumento no tempo de presa e maior solubilidade. Tais alterações podem ter prejudicado o vedamento do local da exposição, o que pode explicar o maior infiltrado inflamatório observado nesse grupo em ambos os períodos experimentais e a contaminação bacteriana em alguns espécimes observadas aos 21 dias, pois a presa deficiente tornou o cimento incapaz impedir o contato entre o material restaurador e a polpa.

O uso da solução de pAsp sobre o tecido pulpar exposto como um *primer* seguido pela restauração da cavidade com compósito, apesar de diferir da aplicação em forma de pasta dos demais grupos, apresentou resultados semelhantes a eles o que reforça trabalho prévios (40, 74, 75) que utilizaram soluções altamente concentradas com análogos biomiméticos na remineralização dentinária. No presente estudo, após a secagem do excesso da solução de pAsp, a restauração coronária foi realizada selando um alto teor de pAsp na lesão. Apesar do ácido poli(aspártico) ter causado alterações inflamatórias e necróticas leves na polpa aos 7 dias (Figura 5.1), essas alterações foram menos severas do que no grupo controle e a polpa subjacente a área capeada foi capaz de se recuperar após os 21 dias. A maior expressão de DMP-1 nos grupos MTA-pAsp e pAsp aos 7 dias, sugere que a presença do pAsp aumentou a atividade da DMP-1.

7 CONCLUSÃO

O uso do ácido poli(aspártico) na regeneração dentinária em ratos se mostrou uma alternativa tão efetiva quanto o uso isolado do MTA no capeamento pulpar direto. Os dentes tratados com a solução de ácido poli(aspártico) apresentaram maior expressão da proteína DMP-1. Porém, os resultados na análise histopatológica foram semelhantes em relação à formação de dentina reparativa. Portanto, a hipótese do estudo não foi comprovada.

REFERÊNCIAS¹

1. Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. *J Endod.* 2010;36(6):1042-7.
2. Paula AB, Laranjo M, Marto CM, Paulo S, Abrantes AM, Fernandes B, et al. Evaluation of dentinogenesis inducer biomaterials: an in vivo study. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:e20190023.
3. Barthel CR, Rosenkranz B, Leuenberg A, Roulet JF. Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. *J Endod.* 2000;26(9):525-8.
4. Brizuela C, Ormeno A, Cabrera C, Cabezas R, Silva CI, Ramirez V, et al. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial. *J Endod.* 2017;43(11):1776-80.
5. Dammaschke T, Leidinger J, Schafer E. Long-term evaluation of direct pulp capping--treatment outcomes over an average period of 6.1 years. *Clin Oral Investig.* 2010;14(5):559-67.
6. Moussa DG, Aparicio C. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019;13(1):58-75.
7. Nowicka A, Wilk G, Lipski M, Kolecki J, Buczkowska-Radlinska 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;41(8):1234-40.
8. Sangwan P, Sangwan A, Duhan J, Rohilla A. Tertiary dentinogenesis with calcium hydroxide: a review of proposed mechanisms. *Int Endod J.* 2013;46(1):3-19.
9. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-35.

¹ De acordo com o estilo Vancouver

10. Kim DH, Jang JH, Lee BN, Chang HS, Hwang IN, Oh WM, et al. Anti-inflammatory and Mineralization Effects of ProRoot MTA and Endocem MTA in Studies of Human and Rat Dental Pulp In Vitro and In Vivo. *J Endod.* 2018;44(10):1534-41.
11. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod.* 1993;19(12):591-5.
12. Hilton TJ. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. *Oper Dent.* 2009;34(5):615-25.
13. Mente J, Hufnagel S, Leo M, Michel A, Gehrig H, Panagidis D, et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: long-term results. *J Endod.* 2014;40(11):1746-51.
14. Tay FR, Pashley DH. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomaterials.* 2008;29(8):1127-37.
15. Thirvikraman G, Athirasala A, Gordon R, Zhang L, Bergan R, Keene DR, et al. Rapid fabrication of vascularized and innervated cell-laden bone models with biomimetic intrafibrillar collagen mineralization. *Nat Commun.* 2019;10(1):3520.
16. Giraud T, Jeanneau C, Rombouts C, Bakhtiar H, Laurent P, About I. Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. *Dent Mater.* 2019;35(1):24-35.
17. Olsson H, Petersson K, Rohlin M. Formation of a hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. *Int Endod J.* 2006;39(6):429-42.
18. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci.* 2003;11(4):269-82.
19. Okabe T, Sakamoto M, Takeuchi H, Matsushima K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. *J Endod.* 2006;32(3):198-201.
20. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod.* 2010;36(3):400-13.

21. An S, Gao Y, Ling J, Wei X, Xiao Y. Calcium ions promote osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp cells: implications for pulp capping materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(3):789-95.
22. Rashid F, Shiba H, Mizuno N, Mouri Y, Fujita T, Shinohara H, et al. The effect of extracellular calcium ion on gene expression of bone-related proteins in human pulp cells. *J Endod*. 2003;29(2):104-7.
23. Farsi N, Alamoudi N, Balto K, Al Mushayt A. Clinical assessment of mineral trioxide aggregate (MTA) as direct pulp capping in young permanent teeth. *J Clin Pediatr Dent*. 2006;31(2):72-6.
24. Schwendicke F, Brouwer F, Schwendicke A, Paris S. Different materials for direct pulp capping: systematic review and meta-analysis and trial sequential analysis. *Clin Oral Investig*. 2016;20(6):1121-32.
25. Aguilar P, Linsuwanont P. Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *J Endod*. 2011;37(5):581-7.
26. Komabayashi T, Zhu Q. Innovative endodontic therapy for anti-inflammatory direct pulp capping of permanent teeth with a mature apex. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(5):e75-81.
27. Li Z, Cao L, Fan M, Xu Q. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: A Meta-analysis. *J Endod*. 2015;41(9):1412-7.
28. 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;28(1):25-32.
29. Burwell AK, Thula-Mata T, Gower LB, Habelitz S, Kurylo M, Ho SP, et al. Functional remineralization of dentin lesions using polymer-induced liquid-precursor process. *PLoS One*. 2012;7(6):e38852.
30. Li X, De Munck J, Yoshihara K, Pedano M, Van Landuyt K, Chen Z, et al. Re-mineralizing dentin using an experimental tricalcium silicate cement with biomimetic analogs. *Dent Mater*. 2017;33(5):505-13.
31. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, et al. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater*. 2014;30(1):77-96.

32. Bertassoni LE, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW, Jr. Biomechanical perspective on the remineralization of dentin. *Caries Res.* 2009;43(1):70-7.
33. Kim J, Arola DD, Gu L, Kim YK, Mai S, Liu Y, et al. Functional biomimetic analogs help remineralize apatite-depleted demineralized resin-infiltrated dentin via a bottom-up approach. *Acta Biomater.* 2010;6(7):2740-50.
34. Liu Y, Mai S, Li N, Yiu CK, Mao J, Pashley DH, et al. Differences between top-down and bottom-up approaches in mineralizing thick, partially demineralized collagen scaffolds. *Acta Biomater.* 2011;7(4):1742-51.
35. Gower LB, Odom DJ. Deposition of calcium carbonate films by a polymer-induced liquid-precursor (PILP) process. *Journal of Crystal Growth.* 2000;210(4):719-34.
36. Thula TT, Rodriguez DE, Lee MH, Pendi L, Podschun J, Gower LB. In vitro mineralization of dense collagen substrates: a biomimetic approach toward the development of bone-graft materials. *Acta Biomater.* 2011;7(8):3158-69.
37. Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim Y-Y, Kaufman MJ, et al. Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering R: Reports.* 2007;58(3-5):77-116.
38. Niu LN, Jee SE, Jiao K, Tonggu L, Li M, Wang L, et al. Collagen intrafibrillar mineralization as a result of the balance between osmotic equilibrium and electroneutrality. *Nat Mater.* 2017;16(3):370-8.
39. Saeki K, Chien YC, Nonomura G, Chin AF, Habelitz S, Gower LB, et al. Recovery after PILP remineralization of dentin lesions created with two cariogenic acids. *Arch Oral Biol.* 2017;82:194-202.
40. Bacino M, Girn V, Nurrohman H, Saeki K, Marshall SJ, Gower L, et al. Integrating the PILP-mineralization process into a restorative dental treatment. *Dent Mater.* 2019;35(1):53-63.
41. Zaugg LK, Banu A, Walther AR, Chandrasekaran D, Babb RC, Salzlechner C, et al. Translation Approach for Dentine Regeneration Using GSK-3 Antagonists. *J Dent Res.* 2020;99(5):544-51.

42. Li Z, Hao J, Duan X, Wu N, Zhou Z, Yang F, et al. The Role of Semaphorin 3A in Bone Remodeling. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:40.
43. Yoshida S, Wada N, Hasegawa D, Miyaji H, Mitarai H, Tomokiyo A, et al. Semaphorin 3A Induces Odontoblastic Phenotype in Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res.* 2016;95(11):1282-90.
44. Chen J, Cui C, Qiao X, Yang B, Yu M, Guo W, et al. Treated dentin matrix paste as a novel pulp capping agent for dentin regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017;11(12):3428-36.
45. Bakopoulou A, Papachristou E, Bousnaki M, Hadjichristou C, Kontonasaki E, Theocharidou A, et al. Human treated dentin matrices combined with Zn-doped, Mg-based bioceramic scaffolds and human dental pulp stem cells towards targeted dentin regeneration. *Dent Mater.* 2016;32(8):e159-75.
46. Park C, Song M, Kim SY, Min BM. Vitronectin-Derived Peptide Promotes Reparative Dentin Formation. *J Dent Res.* 2022;101(12):1481-9.
47. Cunha D, Souza N, Moreira M, Rodrigues N, Silva P, Franca C, et al. 3D-printed microgels supplemented with dentin matrix molecules as a novel biomaterial for direct pulp capping. *Clin Oral Investig.* 2022.
48. Abdelaz P, ElZoghbi A, Shokry M, Ahmed AZ, Rasha H. Reparative Dentin Formation Using Stem Cell Therapy versus Calcium Hydroxide in Direct Pulp Capping: An Animal Study. *Braz Dent J.* 2019;30(6):542-9.
49. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim.* 2010;44(1):1-6.
50. Tarim B, Hafez AA, Cox CF. Pulpal response to a resin-modified glass-ionomer material on nonexposed and exposed monkey pulps. *Quintessence Int.* 1998;29(8):535-42.
51. Trongkij P, Sutimuntanakul S, Laphthanasupkul P, Chaimanakarn C, Wong R, Banomyong D. Effects of the exposure site on histological pulpal responses after direct capping with 2 calcium-silicate based cements in a rat model. *Restor Dent Endod.* 2018;43(4):e36.

52. Tziafa C, Koliniotou-Koumpia E, Papadimitriou S, Tzias D. Dentinogenic responses after direct pulp capping of miniature swine teeth with Biodentine. *J Endod*. 2014;40(12):1967-71.
53. Louwakul P, Lertchirakarn V. Response of inflamed pulps of rat molars after capping with pulp-capping material containing fluocinolone acetonide. *J Endod*. 2015;41(4):508-12.
54. Cosme-Silva L, Gomes-Filho JE, Benetti F, Dal-Fabbro R, Sakai VT, Cintra LTA, et al. Biocompatibility and immunohistochemical evaluation of a new calcium silicate-based cement, Bio-C Pulpo. *Int Endod J*. 2019;52(5):689-700.
55. Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba 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;34(8):970-4.
56. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J*. 2012;45(5):439-48.
57. Dianat O, Mashhadiabbas F, Ahangari Z, Saedi S, Motamedian SR. Histologic comparison of direct pulp capping of rat molars with MTA and different concentrations of simvastatin gel. *J Oral Sci*. 2018;60(1):57-63.
58. Hanada K, Morotomi T, Washio A, Yada N, Matsuo K, Teshima H, et al. In vitro and in vivo effects of a novel bioactive glass-based cement used as a direct pulp capping agent. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2019;107(1):161-8.
59. Kim J, Song YS, Min KS, Kim SH, Koh JT, Lee BN, et al. Evaluation of reparative dentin formation of ProRoot MTA, Biodentine and BioAggregate using micro-CT and immunohistochemistry. *Restor Dent Endod*. 2016;41(1):29-36.
60. Okamoto M, Takahashi Y, Komichi S, Ali M, Yoneda N, Ishimoto T, et al. Novel evaluation method of dentin repair by direct pulp capping using high-resolution micro-computed tomography. *Clin Oral Investig*. 2018;22(8):2879-87.
61. Berman DS, Massler M. Experimental pulpotomies in rat molars. *J Dent Res*. 1958;37(2):229-42.

62. Yaemkleebua K, Osathanon T, Nowwarote N, Limjeerajarus CN, Sukarawan W. Analysis of hard tissue regeneration and Wnt signalling in dental pulp tissues after direct pulp capping with different materials. *Int Endod J.* 2019;52(11):1605-16.
63. Massa LF, Arana-Chavez VE. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. *Eur J Oral Sci.* 2000;108(1):74-7.
64. Taylor RD. Modification of the Brown and Brenn gram stain for the differential staining of gram-positive and gram-negative bacteria in tissue sections. *Am J Clin Pathol.* 1966;46(4):472-4.
65. Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, Smith AJ, Lesot H, Komnenou A, et al. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. *Arch Oral Biol.* 1995;40(10):883-93
66. Liu S, Wang S, Dong Y. Evaluation of a bioceramic as a pulp capping agent in vitro and in vivo. *J Endod.* 2015;41(5):652-7
67. Trongkij P, Sutimuntanakul S, Lapthanasupkul P, Chaimanakarn C, Wong RH, Banomyong D. Pulpal responses after direct pulp capping with two calcium-silicate cements in a rat model. *Dent Mater J.* 2019;38(4):584-90.
68. Andelin WE, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. *J Endod.* 2003;29(10):646-50.
69. Reis MS, Scarparo RK, Signor B, Bolzan JT, Steier L, Figueiredo JAP. Pulp capping with mineral trioxide aggregate or Biodentine: a comparison of mineralized barrier formation and inflammatory and degenerative events. *Braz Oral Res.* 2021;35:e118.
70. Gower LB. Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor pathway and its role in biomineralization. *Chem Rev.* 2008;108(11):4551-627.
71. Goldberg M, Smith AJ. Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(1):13-27.

72. Shigetani Y, Yoshiba K, Kuratate M, Takei E, Yoshiba N, Yamanaka Y, et al. Temporospatial localization of dentine matrix protein 1 following direct pulp capping with calcium hydroxide in rat molars. *Int Endod J*. 2015;48(6):573-81.
73. Calin C, Sajin M, Moldovan VT, Coman C, Stratul SI, Didilescu AC. Immunohistochemical expression of non-collagenous extracellular matrix molecules involved in tertiary dentinogenesis following direct pulp capping: a systematic review. *Ann Anat*. 2021;235:151674.
74. Liang K, Zhou H, Weir MD, Bao C, Reynolds MA, Zhou X, et al. Poly(amido amine) and calcium phosphate nanocomposite remineralization of dentin in acidic solution without calcium phosphate ions. *Dent Mater*. 2017;33(7):818-29.
75. Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Influence of phosphoproteins' biomimetic analogs on remineralization of mineral-depleted resin-dentin interfaces created with ion-releasing resin-based systems. *Dent Mater*. 2015;31(7):759-77.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Fundada em 1900

"Em constante busca da excelência"

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: "Efeito do ácido poli(aspártico) na regeneração dentinária em molares de rato", registrada com o nº **07/2020**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Roberto Ruggiero Braga, colaboradores: Fernanda Furuse Ventura dos Santos, Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez, Douglas Nesadal de Souza, Elisangela Chinen, do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da FOUSP, 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 08/09/2020.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2020 a 01/09/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico - Wistar
Nº de animais	56
Peso/Idade	250g
Sexo	M
Origem	Biotério de Produção de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da USP

São Paulo, 29 de março de 2022.

Profa. Associada Dra. Silvia Vanessa Lourenço
Coordenadora do CEUA-FOUSP