***“INFLUÊNCIA DA MEMBRANA ABSORVÍVEL DE
CORTICAL ÓSSEA BOVINA DESMINERALIZADA NO
PROCESSO DE REPARO APÓS PULPOTOMIA EM DENTES
DE CÃES: ANÁLISE MICROSCÓPICA E RADIOGRÁFICA”.***

GIOVANA CALICCHIO CANOVA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Endodontia.

(Edição Revisada)

BAURU

2003

***“INFLUÊNCIA DA MEMBRANA ABSORVÍVEL DE
CORTICAL ÓSSEA BOVINA DESMINERALIZADA NO
PROCESSO DE REPARO APÓS PULPOTOMIA EM DENTES
DE CÃES: ANÁLISE MICROSCÓPICA E RADIOGRÁFICA”.***

GIOVANA CALICCHIO CANOVA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Endodontia.

(Edição Revisada)

Orientador: **Prof. Dr. José Mauro Granjeiro**

BAURU

2003

Canova, Giovana Calicchio
C165i Influência da membrana absorvível de cortical
óssea bovina desmineralizada no processo de reparo após
pulpotomia em dentes de cães: análise microscópica e
radiográfica. – Bauru, 2003.
98p.: il.; 30cm

Dissertação. (Mestrado) -- Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura

DADOS CURRICULARES

GIOVANA CALICCHIO CANOVA

Nascimento	15 de Maio de 1975 Guaxupé-MG
Filiação	Valdemar Canova Ligia Maria Calicchio Canova
1994 – 1997	Curso de Odontologia – Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas
1998 – 2000	Curso de Especialização em Endodontia - Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais - USP
2001 – 2003	Curso de Pós-Graduação em Endodontia em nível de Mestrado na Faculdade de Odontologia de Bauru - USP.

AGRADECIMENTOS

À DEUS

*“Que nos deu o dom da vida,
Nos presenteou com a liberdade,
Nos abençoou com a inteligência,
Nos deu a graça de lutarmos
Para a conquista de nossas realizações
Cabe o louvor e a glória.
A mim só cabe agradecer”.*

(RUI BARBOSA)

Aos meus pais, **Ligia e Valdemar**

Por toda dedicação, carinho, incentivo, pela confiança que depositaram em mim, pelo porto seguro nos momentos mais difíceis da minha vida, e tantas outras coisas que me fazem entender o significado do amor incondicional.

Ao começar a trilhar seus próprios caminhos na vida, o homem necessita de um norte, de faróis que o orientem, de caráter bom e forte, de espírito valente e empreendedor..., e para isto me espelho em vocês.

Este momento serve apenas de oportunidade para agradecer-lhes por tudo que representam em minha vida, como se houvesse palavras suficientes para fazê-lo. Sem a ajuda de vocês nada disso se realizaria.

Orgulho-me de ser continuidade de pessoas tão maravilhosas.

Com AMOR, dedico-lhes especialmente este trabalho.

Pai e mãe sou eternamente grata, muito obrigada!

Às minhas irmãs, **Marcela e Marina**

Que tanto pedi à Deus. Agradeço pelo carinho, amizade e cumplicidade, e por estarem sempre torcendo por mim. Vocês são muito especiais e estarão sempre no meu coração.

Ao meu namorado **Reinaldo Zanolla Montefusco**

Acima de tudo, meu grande amigo e companheiro que tem me apoiado em todos os momentos.

Agradeço seu amor, carinho, respeito e compreensão, e à Deus, por você fazer parte da minha vida.

Sou muito feliz ao seu lado.

Ao **Sr. Adorcindo Montefusco, Dona Elza e Renato**

Agradeço-lhes pelo carinho e atenção com que me receberam.

Aos meus **Familiares**

Agradeço de coração a todos aqueles que sempre me apoiaram e torceram por mim. Vocês foram muito importantes nesta conquista.

Ao **Sr. Reinaldo Marques e Dona Irene**

Obrigada por serem minha família em Bauru. Agradeço pelo carinho, pela atenção e pelo apoio durante todos estes anos de convívio.

Meus sinceros agradecimentos ao meu **Amigo e Orientador**

Professor Dr. José Mauro Granjeiro

Pelos ensinamentos, pelo apoio e incentivo, pela amizade e dedicação.
Exemplo de simplicidade e humildade, por quem tenho grande admiração.

“ A razão cardeal de toda superioridade humana é, sem dúvida, a vontade.
O poder nasce do querer. Sempre que um homem aplica a veemência e a
perseverante energia de sua alma a um fim, ele vencerá os obstáculos,
e se não atingir o alvo, fará pelo menos coisas admiráveis ”.

(J. A.)

Ao professor **José Carlos Pereira**, agradeço pelo incentivo e pela grande contribuição na realização deste trabalho. Exemplo de profissionalismo, competência e seriedade, sempre pronto a ajudar. Admiro a sua sabedoria.

Aos professores **Clóvis Monteiro Bramante, Orivaldo Tavano, Roberto Brandão Garcia e Rumio Taga**, pelo apoio e colaboração neste trabalho.

Aos professores da Bioquímica, **Eulásio Mikio Taga e Marília Afonso Rabelo Buzalaf**, pelo respeito e atenção com que me receberam.

Aos professores da Endodontia, **Alceu Berbert, Clóvis Monteiro Bramante, Ivaldo Gomes de Moraes, Norberti Bernardinelli e Roberto Brandão Garcia**, pelos ensinamentos, pela convivência e atenção.

Ao meu grande mestre **Washington Rodrigues Camargo**, pela amizade e confiança, pelos ensinamentos e incentivos. O senhor é um dos grandes responsáveis por esta conquista.

Ao professor **Eloi Dezan Junior**, pelo incentivo no início da minha caminhada na pós-graduação.

Ao professor **Celso Kenji Nishiyama**, professora **Renata Pardini Hussne** e **Edninha** do Centrinho, pessoas de grande importância na minha formação profissional, e que sempre me apoiaram.

A todos os professores e funcionários da Patologia, pela constante disposição em ajudar, em especial ao professor **Luís Antônio de Assis Taveira**, **Sr. Valdir** e **Maria Cristina**, pessoas com as quais eu sempre pude contar, desde que cheguei em Bauru.

Aos amigos de mestrado, **Everdan**, **Fernanda**, **Jazzmina**, **Leandro**, **Maristela**, **Renato**, **Rodrigo** e **Sérgio**, por todo o apoio e pelos agradáveis momentos que compartilhamos juntos.

Aos **amigos de outros mestrados**, pelo convívio durante esses anos de curso.

A todos os **meus amigos da Bioquímica**, que sempre me ajudaram nos momentos difíceis e compartilharam os de felicidade.

Aos meus grandes amigos, **Anderson Siqueira Lessa** e **Enrique Hair Salas Beltrán**, pessoas maravilhosas que eu tive a oportunidade de conhecer e conviver durante o curso de especialização no Centrinho. Sem dúvida vocês deixaram marcas na minha memória que vou carregar comigo para todo sempre.

Ao meu amigo **Diego Ferreira Regalado**, que eu considero um irmão, pela amizade sincera, pelo apoio e incentivo e pela ajuda nos momentos de maior dificuldade.

Ao **Rodrigo Cardoso de Oliveira**, pelo companheirismo e pela dedicação, sempre disposto a ajudar e a ensinar. Um verdadeiro amigo, desde o início.

Aos sempre amigos, **Everdan Carneiro, Sérgio Henrique Staut Brunini, Renato Menezes da Silva e Ariadne Letra**, pela amizade e pela ajuda constante. Sem vocês teria sido bem mais difícil.

À **Tatiana de Almeida Furlani e Esther Rieko Takamori**, pelo apoio, pela atenção, pelo convívio diário, compartilhando alegrias e tristezas.

À minha sempre amiga **Viviane Cassiola**, pela amizade, pelo apoio sincero e pela dedicação constante, sempre disposta a ajudar.

À **Sheila de Carvalho Stroppa**, minha companheira de trabalho, pela amizade, pela ajuda e pela troca de experiências durante a realização deste trabalho.

À minha amiga **Andrea Anzai**, pela amizade sincera e pela atenção em todos os momentos.

Ao **Mauro Vinícius Corotti** e **Thais Accorsi de Mendonça**, pela amizade e pelo apoio que sempre me deram, desde o Centrinho.

Aos funcionários e amigos e da Bioquímica, **Thelma, Ovídio, Pâmela** e **Gilmar**, por toda atenção, dedicação e apoio que eu sempre encontrei.

Aos funcionários da Endodontia, **Edimauro, Dona Neide, Suely** e **Patrícia**, por toda ajuda e atenção.

À **Daniele e Tânia** da Histologia, por toda ajuda, dedicação e amizade. Vocês foram fundamentais na realização deste trabalho. Aprendi muito com vocês.

Aos funcionários do Biotério, **Luiz Carlos, Erasmo** e **Richard** pela constante ajuda e carinho dispensado com os animais.

À **Vanessa Graciela Gomes Carvalho**, Médica Veterinária, pela competência e profissionalismo com que me ajudou na parte experimental deste trabalho, e pela atenção atribuída aos animais.

Ao **Sr. Odair Vicente**, pela realização da técnica da perfusão utilizada nos cães, e ao **Sr. Juraci do Nascimento**, pelo processamento dos cortes dos espécimes.

À **Vera**, secretária do departamento de Ciências Biológicas, pela sua competência e disposição em ajudar.

A todos os **funcionários da FOB-USP**, pela dedicação e auxílio em todos os momentos.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, em nome do seu Ex-Diretor **Professor Doutor Aymar Pavarini** e da atual Diretora **Professora Doutora Maria Fidela de Lima Navarro**.

À comissão de pós-graduação, por meio de seu presidente o **Professor Doutor José Carlos Pereira**.

À **Baumer**, empresa que gentilmente forneceu o material Gen-derm[®] utilizado neste experimento.

À **FAPESP**, pela concessão da bolsa de estudos, sendo possível a realização desta pesquisa.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xviii
RESUMO	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1. Matriz óssea	
2.2. Matriz dentinária	
2.3. Matriz derivada do esmalte	
3. PROPOSIÇÃO	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Procedimentos operatórios	
4.2. Período pós-operatório	
4.3. Eutanásia dos animais	
4.4. Obtenção e análise das radiografias	
4.5. Procedimento histotécnico	
4.6. Análise microscópica	
5. RESULTADOS	37
5.1. Análise microscópica	
5.1.1. Período de sete dias	

A) Grupo I (teste) – Membrana absorvível de cortical óssea

bovina desmineralizada

B) Grupo II (controle) – Hidróxido de cálcio

5.1.2. Período de setenta dias

A) Grupo I (teste) – Membrana absorvível de cortical óssea

bovina desmineralizada

B) Grupo II (controle) – Hidróxido de cálcio

5.2. Análise radiográfica

6. DISCUSSÃO 50

7. CONCLUSÕES 58

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60

ABSTRACT 72

ANEXO 75

LISTA DE TABELAS

	pág.
Tabela 1 Distribuição dos materiais entre os dentes utilizados no período de sete dias.	32
Tabela 2 Distribuição dos materiais entre os dentes utilizados no período de setenta dias.	32
Tabela 3 Indicação radiográfica sugestiva de barreira mineralizada (células em destaque) no período de sete dias.	44
Tabela 4 Indicação radiográfica sugestiva de barreira mineralizada (células em destaque) no período setenta dias.	45

LISTA DE FIGURAS

	pág.
<p>Figura 1 Materiais utilizados no experimento. 1A) Membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada, utilizada no Grupo I; 1B) Discos de membrana absorvível cortados com perfurador de couro; 1C) Hidróxido de cálcio, utilizado no Grupo II.</p>	26
<p>Figura 2 Procedimentos pré-pulpotomia. 2A) Animal com campo fenestrado; 2B) Isolamento absoluto realizado; 2C) Aplicação do cianoacrilato com <i>microbrush</i>.</p>	30
<p>Figura 3 Procedimentos na pulpotomia. 3A) Abertura coronária realizada nos dentes inferiores; 3B) Abertura coronária realizada nos dentes superiores; 3C) Membrana absorvível em posição; 3D) Inserção da pasta de hidróxido de cálcio com aplicador de hidróxido de cálcio; 3E) Guta percha em posição; 3F) Dentes restaurados com ionômero de vidro resinoso fotopolimerizado.</p>	31
<p>Figura 4 Fotomicrografia do remanescente de tecido pulpar protegido com membrana absorvível [A-C] e hidróxido de cálcio [D-F], no período de sete dias. Membrana absorvível em íntimo contato com o tecido conjuntivo pulpar subjacente [, A (H.E. 10X) e B (H.E. 40X)]; fragmento de dentina [, B (H.E. 40X)] e</p>	41

camada odontoblástica alterada [®, C (H.E. 40X)]. Necrose por coagulação, induzida pelo hidróxido de cálcio [➡, D (H.E. 10X)], em contato direto com o tecido pulpar subjacente [➡, E (H.E. 40X)] e camada odontoblástica bem definida [®, F (H.E. 40X)].

Figura 5 Fotomicrografia do remanescente de tecido pulpar protegido com membrana absorvível [A-E] e hidróxido de cálcio [F], no período de setenta dias. Faixa de tecido fibroso na embocadura do canal sobrepondo o tecido mineralizado neoformado aderido às paredes dentinárias [®, A (H.E. 10X)]; tecido mineralizado neoformado obliterando o terço cervical [, B (H.E. 10X)]; tecido mineralizado neoformado unido ao tecido mineralizado do interior do canal [, C (H.E. 10X)]; fragmentos de dentina [*, D (H.E. 100X)] e tecido conjuntivo fibroso formado em toda a extensão do canal radicular [□, E (H.E. 10X)]. Tecido mineralizado neoformado na embocadura do canal radicular [➡, F (H.E. 10X)].

42

Figura 6 Imagens radiográficas do 1º MID (hidróxido de cálcio - sete dias). I - **Digital:** A) Imagem padrão; B) Imagem negativa; C) Imagem 3D. II - **Convencional.**

46

- Figura 7** Imagens radiográficas do 1º MIE (hidróxido de cálcio - sete dias). I 47
- **Digital:** **A)** Imagem padrão; **B)** Imagem negativa;
C) Imagem 3D. **II - Convencional.**
- Figura 8** Imagens radiográficas do CSE (hidróxido de cálcio - sete dias). 48
I - Digital: **A)** Imagem padrão; **B)** Imagem negativa;
C) Imagem 3D. **II - Convencional.**
- Figura 9** Imagens radiográficas do 1º MID (hidróxido de cálcio - setenta 49
dias). **I - Digital:** **A)** Imagem padrão; **B)** Imagem negativa;
C) Imagem 3D. **II - Convencional.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

MA – membrana absorvível

HC – hidróxido de cálcio

BMP – proteína morfogenética óssea

OP – proteína osteogênica

TGF- β – fator de crescimento transformante beta

bFGF – fator de crescimento transformante fibroblástico

IGF-II – fator de crescimento insulínico

EGF – fator de crescimento epidérmico

PDGF – fator de crescimento derivado de plaqueta

rhBMP – proteína morfogenética óssea recombinante humana

rhTGF- β – fator de crescimento transformante beta recombinante humana

AdBMP – proteína morfogenética óssea adenovírus recombinante

EMD – matriz derivada do esmalte

OFE – frações osteocondutivas de extratos provenientes do esmalte

FS – complexo de fibrina

LPS – lipopolissacarídeo

ISO – International Organization for Standardization

RMS – registro no Ministério da Saúde

P.A. – pró-análise

Kg – quilograma
mg – miligrama
µg – micrograma
mA – miliampere
KV – quilovolts
K Gy – quiloGray
3D – terceira dimensão
C – convencional
D – digital
cm – centímetro
mL – mililitro
m/v – massa/volume
v/v – volume/volume
nº – número
% – por cento
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
MTA – agregado trióxido mineral
H.E. – Hematoxilina e Eosina
1º MID – primeiro molar inferior direito
1º MIE – primeiro molar inferior esquerdo
2º PMID – segundo pré-molar inferior direito
2º PMIE – segundo pré-molar inferior direito

3º PMID – terceiro pré-molar inferior direito

3º PMIE – terceiro pré-molar inferior esquerdo

CSD – canino superior direito

CSE – canino superior esquerdo

3º ISD – terceiro incisivo superior direito

3º ISE – terceiro incisivo superior esquerdo

RESUMO

O sucesso da pulpotomia está vinculado à manutenção da vitalidade e da função do complexo dentina-polpa após remoção da polpa coronária e proteção do remanescente pulpar. Vários materiais têm sido preconizados com tal finalidade, no entanto, nenhum reúne todas as qualidades físicas, químicas e biológicas ideais, o que tem estimulado a busca de agentes alternativos. Com o propósito de avaliar um novo material no tratamento da terapia da polpa vital, o objetivo deste estudo foi: *i)* analisar microscopicamente o comportamento do remanescente pulpar protegido com membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada após pulpotomia em dentes de cães (Grupo I), com a hipótese de que este biomaterial pudesse induzir formação de barreira mineralizada, usando como controle o hidróxido de cálcio (Grupo II) e, *ii)* avaliar comparativamente o método radiográfico digital e convencional, com a hipótese de que o digital (Digora) pudesse permitir uma melhor identificação de barreira de tecido mineralizado após pulpotomia. A metodologia obedeceu às normas da “International Organization for Standardization” (ISO) 7405:1997. Dois cães foram utilizados nos períodos experimentais de sete e setenta dias, sendo um para cada período. Os materiais dos Grupos I e II foram distribuídos entre 10 dentes de cada animal. Decorridos os períodos pós-operatórios, os animais foram mortos e os espécimes removidos e preparados para análise microscópica e radiográfica. A análise microscópica demonstrou que, após setenta dias, houve formação de tecido conjuntivo fibroso nos espécimes do Grupo I e formação de tecido mineralizado nos espécimes do Grupo II. O estudo radiográfico de 32 raízes identificou imagem sugestiva de barreira de

tecido mineralizado em 4 raízes (todas do período de sete dias) com a utilização do método digital (Digora), e em 5 raízes (apenas uma do período de setenta dias) pelo método convencional, sendo que todas receberam o hidróxido de cálcio como material protetor. Destarte, concluiu-se que: *i)* a membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada, apesar de biocompatível, não induziu formação de barreira mineralizada após pulpotomia em dentes de cães; *ii)* o método radiográfico convencional foi mais eficiente que o método digital na identificação de barreira mineralizada, e *iii)* não houve uma correspondência entre os resultados microscópicos e radiográficos após a realização da pulpotomia.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A polpa é um tecido conjuntivo de origem mesenquimal que está situado no interior da cavidade pulpar. Na sua periferia, encontram-se uma camada de células altamente especializadas, os odontoblastos. O íntimo contato destas células com a dentina é uma das razões para que a dentina e a polpa sejam denominadas de complexo dentina-polpa⁷².

A pulpotomia ou amputação pulpar é a remoção da polpa dentária coronária viva, não infectada, conservando-se a porção radicular¹¹. O sucesso da pulpotomia está vinculado à manutenção da vitalidade e da função do complexo dentina-polpa após remoção da polpa coronária e proteção do remanescente pulpar.

A idéia de proteger e manter a vitalidade pulpar é bem antiga. Em 1756, PHILLIP PFAFF já capeava polpas dentais expostas com uma placa côncava de ouro puro, colocando sobre esta, o material restaurador¹⁰. HUNTER, em 1883, recomendava o uso de fezes de pardal inglês, misturada com melado, para o capeamento pulpar⁶³.

Entretanto, a pulpotomia somente se popularizou quando HERMANN, em 1920, introduziu o hidróxido de cálcio, na terapia endodôntica⁶⁹.

Com as pesquisas de ORBAN ficou demonstrado que a polpa dentária é um tecido conjuntivo semelhante, em arranjo e células, aos demais tecidos conjuntivos do organismo. Ele acreditava que estas células poderiam se diferenciar, resultando na cicatrização da polpa dentária. Durante os anos 40 e 50,

tornou-se claro que a polpa pode se reparar, como qualquer outro tecido do organismo, quando a agressão é removida⁶⁹.

Porém, o sucesso do reparo após a pulpotomia, vai depender, 1) do correto diagnóstico, que se baseia em aspectos clínicos fundamentais em relação ao remanescente pulpar, como: a presença de sangramento abundante (vermelho vivo), consistência (resistência ao corte) e coroa dentária quase íntegra ou com paredes espessas e resistentes; 2) do tratamento adequado, que inclui a técnica operatória, o efetivo selamento da cavidade^{12,19} e, 3) do material, que deve estimular processos biológicos para a formação de uma barreira mineralizada⁷⁴.

Embora a terapia da polpa vital tenha recebido enorme atenção, tanto no aspecto biológico como no aspecto clínico, durante as últimas quatro décadas, ainda existem controvérsias com respeito à base científica desta terapêutica em relação aos materiais utilizados⁷⁴.

Vários materiais têm sido preconizados com tal finalidade, e podem ser classificados como^{50,51}:

Desvitalizadores: promovem fixação e/ou cauterização do tecido pulpar - Formocresol, Laser e Eletrocoagulação.

Preservadores: promovem desvitalização mínima e não indutiva do tecido pulpar - Glutaraldeído, Sulfato Férrico e Óxido de Zinco e Eugenol.

Regeneradores: promovem indução e reparo do tecido pulpar - Hidróxido de Cálcio e Proteína Morfogenética Óssea (BMP).

O hidróxido de cálcio é o material empregado comumente após o procedimento da pulpotomia. Sua utilização diretamente sobre a polpa resulta em uma terapêutica bem sucedida, especialmente para os dentes permanentes jovens,

por indução de uma ponte de dentina reparadora sob a área exposta⁶². Acredita-se que o melhor protetor da polpa seja a dentina, sendo que o material que apresentava melhor capacidade de induzir a formação de uma barreira mineralizada sobre o tecido pulpar era o hidróxido de cálcio^{12,22,54}.

O agregado de trióxido mineral (MTA) é um novo material com possibilidades animadoras para terapia pulpar de dentes permanentes imaturos com lesões cariosas profundas ou exposições pulpares traumáticas, evitando a terapia endodôntica⁶¹. Estudos relataram que o MTA tem demonstrado um melhor selamento sobre a polpa vital, não é reabsorvível, apresentando melhores resultados, “in vivo”, que o hidróxido de cálcio^{24,71}. TZIAFAS et al. (2002)⁷⁹, concluíram que o MTA é um material efetivo capaz de estimular a formação de dentina reparadora pelos próprios mecanismos de defesa da polpa.

No entanto, estes materiais não reúnem todas as qualidades físicas, químicas e biológicas ideais, o que tem estimulado a busca de agentes alternativos.

Com o propósito de promover um processo de reparo mais natural e biológico do tecido pulpar, visando manter a vitalidade e a função do complexo dentina-polpa, buscou-se novas estratégias de tratamento⁷⁴, dentre elas, a utilização de fatores de crescimento, nos quais podemos destacar as proteínas morfogenéticas do osso.

URIST, em 1965⁸¹, induziu formação de novo osso no músculo de coelho pela implantação de matriz óssea desmineralizada concluindo que a matriz óssea possui fatores protéicos indutores de diferenciação de novas células ósseas que foram designadas de BMPs (“Bone Morphogenetic Proteins”).

As BMPs correspondem a um subgrupo de uma grande família de proteínas, conhecidas como TGF- β ("Transforming Growth Fator- β "). Proteínas desta família estão implicadas em diversas atividades biológicas, envolvendo diferenciação celular, morfogênese tecidual, regeneração, reparo e estímulo de secreção de matriz extracelular^{59,65}. As BMPs são glicoproteínas não colágenas identificadas como BMP-2, -3, -4, -5, -6, -7 (OP-1) e -8 (OP-2). Atuam durante a embriogênese e na idade adulta do indivíduo, modulando negativa ou positivamente vários processos biológicos que ocorrem no organismo humano^{31,33}.

Posteriormente, verificou-se que a matriz de dentina também contém BMP^{2,4,7,44,53} e fatores de crescimento^{9,13,66} e, desde então, tem sido demonstrado que a BMP proveniente tanto do osso como da dentina podem promover dentinogênese^{39,42,43,67,73,75}. As proteínas encontradas na matriz óssea e dentinária desmineralizadas têm a capacidade de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em células odontoblásticas respectivamente, dependendo do local de implantação^{31,33}.

Receptores para BMPs foram identificados na polpa dentária humana¹⁶, indicando que suas implicações na terapia do tratamento conservador são imensas.

Da mesma forma, a BMP também foi encontrada no esmalte^{17,28}. Estudos utilizando matriz derivada do esmalte sobre a polpa mostraram que a quantidade de tecido duro formado é maior quando comparado ao hidróxido de cálcio^{40,41}.

É importante ressaltar que as proteínas morfogenéticas ósseas estimulam a formação de uma ampla camada de dentina reparativa sem causar

danos ao tecido pulpar⁵⁶, isto é, sem a indução de necrose tecidual característica do hidróxido de cálcio.

A membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada é um material biológico constituído por colágeno tipo I (95%) e proteínas não colagênicas (5%) como os fatores de crescimentos e as BMPs. Deste modo, a investigação sobre o potencial deste biomaterial como protetor pulpar na pulpotomia é extremamente válido e oportuno.

Apesar da análise radiográfica ser realizada para verificar a formação de barreira mineralizada após o procedimento de pulpotomia, a imagem fornecida é considerada subjetiva devido às limitações da radiografia, como a não visualização do dente em todas as dimensões e a sobreposição de estruturas. Algumas vezes, a barreira de tecido duro, embora presente, não é observada radiograficamente; em outras ocasiões visualiza-se uma barreira não existente⁶⁸.

Com o intuito de aprimorar a capacidade de visualização e interpretação das radiografias visando uma melhoria na qualidade diagnóstica, diminuir o número de repetições, a dose de radiação ao paciente e o tempo para a obtenção da imagem, eliminando assim o processamento químico e o risco ambiental, desenvolveram-se ferramentas capazes de gerar imagens digitais, obtidas, por exemplo, por meio do sistema Digora, lançado em 1994 pela Soredex (Orion Corporation - Helsinki - Finlândia), que utiliza uma placa de fósforo fotoestimulada que, à semelhança do filme radiográfico, é sensibilizada. O sistema cria e armazena uma imagem latente sem degradação até ser digitalizada por meio de um equipamento que transforma a imagem latente em imagem digital usando um feixe de laser. Uma grande vantagem é a reutilização das placas¹⁸.

Vários estudos comparativos entre os métodos radiográficos digital e convencional são encontrados na literatura^{14,15,37,38,49}, porém, não foram encontrados trabalhos relacionados à identificação de barreira mineralizada formada após a pulpotomia.

Como a radiografia é de grande valia na Odontologia, especificamente na Endodontia, onde sua utilização é imprescindível durante todo o tratamento e após o seu término e acompanhamento, período esse denominado de preservação, julgou-se relevante comparar o método radiográfico digital e convencional em relação à identificação de barreira de tecido mineralizado, após pulpotomia em dentes de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

Assim como a ciência de modo geral, o tratamento endodôntico evoluiu muito nos últimos 20 anos. O domínio de técnicas de biologia celular e molecular associado ao desenvolvimento tecnológico, particularmente o uso de células tronco associadas a fatores de crescimento e carreadores adequados, estão definindo os pilares da engenharia de tecidos, que vêm apresentando progresso expressivo podendo, em breve, estarem disponíveis para a aplicação clínica⁶.

Estas técnicas avançadas poderão modificar profundamente a terapia endodôntica, principalmente quanto aos procedimentos conservadores da polpa. O objetivo desta revisão de literatura é agregar os relatos recentes relacionados ao tratamento conservador da polpa que envolve a utilização de fatores de crescimento, ou seja, moléculas sinalizadoras com capacidade de promover proliferação e diferenciação celular, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs).

Segundo LANGER e VACANTI (1993)³⁴, a engenharia de tecidos é definida como um campo interdisciplinar no qual os princípios de engenharia e biologia são aplicados em razão da geração de substitutos biológicos com o objetivo de criar, preservar ou restaurar uma função perdida. Ela surgiu com a necessidade de encontrar novas técnicas para a restituição de tecidos ou órgãos que, por alguma razão, perderam sua função ou deixaram de cumpri-la adequadamente³⁵.

A descoberta de moléculas sinalizadoras, como as BMPs, estimulou diversos pesquisadores a usá-las para controlar os eventos fisiológicos e

direcionar a resposta tecidual de acordo com o objetivo do tratamento. Isto foi possível graças ao avanço nas técnicas de produção de proteínas recombinantes, cultura de células e um melhor entendimento do mecanismo de interação entre células, proteínas e genes. Estas moléculas sinalizadoras alteram sobremaneira o metabolismo celular, controlando sua diferenciação e proliferação. Dentre os muitos fatores existentes, as BMPs representam um papel importante na osteogênese e reparo ósseo, além de atuar na morfogênese de diversos tecidos. Estas proteínas podem ser produzidas por recombinação gênica⁸⁰, uma vez que sua purificação é um processo laborioso, caro e de baixíssimo rendimento.

A indução da osteogênese ou dentinogênese utilizando as BMPs é um típico exemplo do potencial terapêutico da engenharia de tecidos.

As propriedades osteoindutoras da BMP foram inicialmente demonstradas utilizando matriz orgânica de coelhos⁸¹ e, posteriormente, utilizando BMPs purificadas a partir do osso bovino⁶⁰. Com o domínio das técnicas de biologia molecular, BMPs recombinantes humanas tornaram-se disponíveis para estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos⁸⁴. A BMP é capaz de induzir a formação óssea endocondral ectópica quando implantadas em subcutâneo ou músculo de ratos, bem como de barreira dentinária, quando colocadas sobre a polpa, sendo utilizadas sozinhas ou combinadas ao colágeno como carreador. Posteriormente descobriu-se que a matriz dentinária^{2,4,7,44,53} e a matriz derivada do esmalte^{17,28} também contêm BMP, estando ambas em teste como indutora na formação de barreira dentinária.

Vários estudos têm demonstrado que as BMPs -2, -4 e -7, também conhecida como OP-1 (proteína osteogênica -1) possuem um excelente potencial terapêutico na pulpotomia, como relatado a seguir.

2.1. Matriz óssea

O primeiro estudo de pulpotomia com BMP foi realizado por NAKASHIMA em 1990⁴³, que verificou a indução de dentina reparativa em pulpotomia, utilizando BMP não purificada extraída de matriz óssea, em dentes de cães. O autor concluiu que após duas semanas, a BMP estava na corrente sangüínea e era dissolvida nos fluidos teciduais, estimulando a indução irreversível e subsequente diferenciação das células mesenquimais migratórias, dando origem a grande quantidade de dentina reparativa sem afetar a polpa radicular. A formação de osteodentina foi localizada somente na superfície amputada^{44,58}, não sendo observada nenhuma formação na polpa radicular. Este estudo foi o marco de uma nova era na terapia pulpar conservadora.

Resultados semelhantes foram obtidos por LIANJIA, YUHAO e WHITE em 1993³⁶, que utilizaram BMP extraída de osso bovino para induzir dentinogênese após pulpotomia em dentes de cães, sugerindo que a BMP possui um importante papel na diferenciação e indução de odontoblastos.

Apesar de associadas ao colágeno, as BMPs são classificadas como não colágenas. A utilização do colágeno como agente protetor não demonstrou a capacidade de induzir formação de dentina^{45,58}. Como resultado destes estudos, o colágeno tem sido utilizado como carreador para as proteínas dentinogênicas⁵⁰.

Pioneiro no uso de OP-1 recombinante humana (rhOP-1), RUTHERFORD em 1993⁵⁸, utilizou esta proteína associada a um carreador a base

de colágeno insolúvel, verificando a indução da dentinogênese na polpa de dentes de macacos adultos. Este experimento demonstrou que a capacidade de reparo da polpa adulta em resposta a OP-1, é independente da quantidade de polpa removida, e que, o volume de dentina reparativa formada é proporcional à quantidade de OP-1/colágeno utilizada, ou seja, a resposta é dose dependente.

NAKASHIMA em 1994⁴⁴, examinou a hipótese das BMP-2 e -4 recombinante humana carregadas com matriz dentinária induzirem formação dentinária quando colocadas sobre polpas amputadas de cães. Os resultados demonstraram que ambas induzem diferenciação de células pulparez adultas em odontoblastos, confirmando sua hipótese inicial.

O mesmo autor, também em 1994⁴⁵, num estudo de acompanhamento dos seus trabalhos sobre a indução de dentina em polpas amputadas de cães, utilizou BMP-2 e -4 recombinante humana e TGF- β_1 , combinados com matriz colágena tipo I, relatando que somente a BMP-2 e -4 induziram a dentinogênese reparativa, sendo o TGF- β considerado um inibidor do reparo do tecido pulpar. Neste estudo, o efeito dose dependente da BMP na indução de formação de dentina reparadora também foi demonstrado.

RUTHERFORD et al. em 1994⁵⁹, obtiveram resultados similares usando OP-1 recombinante humana após pulpotomia em dentes de macacos jovens, confirmando a capacidade da OP-1 em preservar a vitalidade pulpar e induzir a formação de dentina reparativa.

JEPSEN et al. em 1996²⁹, realizaram uma pesquisa empregando a OP-1 carregada com matriz colágena, comparada com o hidróxido de cálcio e com a matriz colágena sozinha, em polpas amputadas de *minipigs*. O experimento teve

por objetivo estudar o tempo de indução de dentina reparativa pela OP-1 recombinante humana. Os autores verificaram que após duas semanas, a formação de dentina reparativa induzida pela OP-1/matriz colágena foi evidente, e após cinco semanas todos os dentes tratados com OP-1/matriz colágena mostraram quantidade substancial de formação de dentina reparativa, reafirmando os achados de RUTHERFORD et al. em 1994⁵⁹. Os mesmos autores publicaram um ano mais tarde resultados semelhantes aos que foram publicados no artigo anterior³⁰.

Em culturas primárias de células da polpa dentária, o fator de crescimento transformante beta ($\text{TGF-}\beta_1$), fator de crescimento transformante fibroblástico (bFGF) e fator de crescimento insulínico (IGF-II) exibem efeitos mitóticos e formadores de matriz, como também, mediam os mecanismos de ação durante o reparo da ferida tecidual e desempenham um importante papel em muitos tecidos do corpo. TZIAFAS et al. em 1998⁷⁷, verificaram *in vivo*, se o período de tempo em que as células ectomesenquimais da polpa dentária ficassem em contato com TGF-1, bFGF e IGF-II, induziriam a expressão de um fenótipo semelhante a odontoblasto e formação de dentina reparativa. Os autores concluíram que os fatores de crescimento recombinante bFGF, IGF-II e $\text{TGF-}\beta_1$, pós-implantação *in vivo* no centro da polpa, tiveram um efeito regulatório diferente nas células pulpares. O recombinante bFGF e o IGF-II estimularam somente formação de matriz extracelular de aparência osteotípica distante do local de implantação; não houve formação de dentina reparativa na proximidade do implante ou em outro local na polpa. $\text{TGF-}\beta_1$ implantado por períodos de tempo curto no local da amputação pulpar, induziu células da polpa central a se diferenciarem para um fenótipo semelhante ao

odontoblasto como também estimulou células da camada odontoblástica a aumentar a deposição de dentina circumpulpar.

Outro estudo utilizando fatores de crescimento recombinantes para promover o reparo do tecido pulpar quando aplicado diretamente sobre a polpa dentária, foi realizado por HU et al. em 1998²⁵. Fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento fibroblástico (bFGF), fator de crescimento insulínico II (IGF-II), fator de crescimento derivado de plaqueta-BB (PDGF-BB) e fator de crescimento transformante beta ($TGF-\beta_1$) foram colocados sobre o tecido pulpar de molares de ratos. De todos os fatores de crescimento testados, o $TGF-\beta_1$ foi o que estimulou a formação de uma ponte dentinária contendo numerosos túbulos dentinários, condição esta, que não foi observada nos outros grupos. Estes resultados não são condizentes com os relatos de NAKASHIMA em 1994⁴⁵, que mostrou um efeito inibitório do $TGF-\beta_1$ no reparo pulpar.

Em 1999, REN, YANG e DONG⁵² investigaram a indução de formação de dentina reparativa, em polpas expostas de cães, induzida pela proteína morfogenética óssea -2 (rhBMP-2) com um complexo de fibrina (FS) como carreador e, somente rhBMP-2 ou uma pasta de hidróxido de cálcio como grupo controle. O reparo do tecido pulpar exposto tratado com o complexo de rhBMP-2/FS mostrou ser melhor que a rhBMP-2 sozinha. A formação de uma ponte dentinária foi observada na primeira semana quando a polpa foi tratada com rhBMP-2/FS e na quarta semana com rhBMP-2 e com hidróxido de cálcio. Na nona semana, maior quantidade de ponte dentinária tubular formada foi verificada nas polpas tratadas com o complexo de rhBMP-2/FS. Os resultados sugeriram a existência de um efeito sinérgico entre a fibrina e a rhBMP-2, e que podem ser utilizadas como agente

bioativo no tratamento de polpas expostas por induzirem a formação de ponte dentinária.

Todos os estudos publicados anteriormente, verificando indução de dentina reparativa pelas BMPs, utilizaram somente polpas dentais sadias. RUTHERFORD e GU em 2000⁵⁷, realizaram um estudo com o objetivo de testar os efeitos de uma única aplicação de BMP-7/colágeno recombinante humana (rhBMP-7) na dentinogênese reparativa em tecido pulpar inflamado. Pulpite experimental foi induzida na polpa de dentes de furões adultos, por meio de injeção direta de uma preparação comercial de lipopolissacarídeo (LPS), solúvel em água, da *Salmonella typhimurium*. Os autores concluíram que uma única aplicação de rhBMP-7/colágeno falhou na indução da formação de dentina reparativa em um modelo animal com pulpite reversível.

No ano seguinte, RUTHERFORD⁵⁵ testou, *in vivo*, o reparo do tecido pulpar utilizando adenovírus recombinante (AdBMP-7) também em polpas de furões adultos com pulpite reversível, e verificou que durante uma infecção, *in vivo*, com AdBMP-7 não houve produção de dentina reparativa em todos os casos.

SIX, LASFARGUES e GOLDBERG em 2002⁶⁴, verificaram a diferença na resposta de reparo induzida por três concentrações diferentes de rhBMP-7/colágeno em áreas coronária e radicular de polpas expostas de molares de ratos, analisando a relação dose dependente. Os resultados demonstraram formação de osteodentina na porção coronária do dente, enquanto que, na polpa radicular, uma mineralização densa e homogênea foi verificada abaixo da região pulpar que foi traumatizada. Aparentemente, não ocorreu um efeito dose dependente, sugerindo que os sinais ativados foram rapidamente saturados.

2.2. Matriz dentinária

Em 1967, BANG e URIST² relataram que a matriz de dentina desmineralizada induz formação de osso ectópico similar à matriz óssea desmineralizada. Desde então, o papel da BMP dentinária na dentinogênese e no reparo pulpar tem sido estudado.

Com o objetivo de estudar a influência dos fragmentos de dentina no processo de reparo da polpa dentária, HOLLAND et al. em 1978²¹, após pulpotomia em dentes de cães, protegeram os remanescentes pulpare com fragmentos de dentina colhidos do próprio dente a ser tratado. Os autores observaram que os fragmentos de dentina localizados no interior do tecido da pulpar, estimularam a deposição de tecido duro.

KAWAI & URIST em 1989³², utilizaram dentes bovinos para extrair BMPs. Estas proteínas foram implantadas em tecido muscular de camundongos. Os resultados demonstraram que BMPs extraídas de tecidos dentinários foram capazes de induzir neoformação óssea.

No mesmo ano, NAKASHIMA⁴² avaliou o processo de reparo após pulpotomia em dentes de cães e proteção do remanescente pulpar com matriz de dentina em pó, cujos fatores antigênicos foram removidos. Os resultados sugeriram que essa matriz de dentina pode ter atividade quimiotática e mitogênica na diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas e servir como arcabouço para as mesmas.

Em 1990, TZIAFAS e KOLOKURIS⁷³ avaliaram o efeito da dentina desmineralizada e da matriz óssea autógenas sobre as células ectomesenquimais da polpa de dentes de cães. A análise microscópica demonstrou que estas matrizes responderam de forma diferente. Formação dentinária associada com odontoblastos foi demonstrada em todos os implantes de dentina na polpa. Deposição de osteodentina seguida de algumas áreas de formação de pré-dentina tubular foi observada em contato com os implantes de osso. Foi concluído que a interação das células pulpares com matriz de dentina desmineralizada, constitui um modelo experimental de indução de dentinogênese secundária e células semelhantes a odontoblastos.

A presença de BMP na matriz dentinária foi verificada por BESSHO et al. em 1991⁴. Eles extraíram e purificaram BMP da matriz dentinária humana e implantaram em músculo de ratos. Segundo os autores, a BMP estaria envolvida na diferenciação de células mesenquimais imaturas em cartilagem, e o processo subsequente de diferenciação óssea endocondral seria regulado por outros fatores de crescimento. A BMP derivada da matriz dentinária pode não ser idêntica, mas provavelmente é bastante similar a BMP derivada de matriz óssea, uma vez que ambas produzem a mesma ação *in vivo*.

A resposta inicial das células ectomesenquimais da polpa dentária de cães, após implantação de matriz dentinária desmineralizada, natural ou pré-dentina sobre a polpa, foi analisada por TZIAFAS et al. em 1992⁷⁵. Diferenciação odontoblástica foi demonstrada em íntimo contato com a pré-dentina, enquanto que a dentina desmineralizada e a natural, estavam associadas com a neoformação de matriz extracelular. Os resultados indicaram que a dentinogênese induzida por

dentina é iniciada por dois mecanismos: indução direta por células semelhantes a odontoblastos, bem como indução indireta por síntese de matriz.

SMITH et al. em 1994⁶⁷, estudaram *in vivo* o efeito da implantação de frações de proteínas liofilizadas de matriz dentinária na atividade secretora de odontoblastos de polpas expostas de dentes de furões. O mecanismo de estimulação dos odontoblastos por componentes da matriz de dentina foi elucidado, mas os autores sugeriram que fatores de crescimento angiogênicos poderiam ter sido seqüestrados do interior da matriz dentinária durante o preparo da cavidade e contribuído no processo de reparo.

Um ano depois, TZIAFAS et al.⁷⁶ estudaram a capacidade dos componentes da matriz extracelular de dentina nas células da polpa de dentes de cães, utilizando-se fragmentos de dentina solúveis em EDTA. Os resultados demonstraram que os componentes bioativos presentes na matriz de dentina solúvel em EDTA, induziram diretamente a polarização celular e a secreção apical de matriz tubular quando implantados em contato com as células da polpa.

Os estudos realizados até o momento foram baseados na indução direta da diferenciação das células tipo odontoblastos e formação de dentina reparativa na interface do material protetor. Experimentalmente, ficou demonstrando que as células da polpa podem se diferenciar em células tipo odontoblasto em associação com matrizes extracelulares específicas. Em 2000, TZIAFAS et al.⁷⁴ verificaram que a diferenciação das células pulpares também ocorria com a utilização de substratos artificiais contendo rhTGF- α 1. Porém, um ano depois, TZIAFAS et al.⁷⁸ estudando o potencial de indução direta da diferenciação

das células tipo odontoblastos, a curto prazo, não observaram formação de dentina reparativa.

2.3. Matriz derivada do esmalte

Durante a odontogênese, amelogeninas provenientes dos pré-ameloblastos, são translocadas para odontoblastos em diferenciação na papila dentária²⁶. Baseando-se nestas observações, sugere-se que as amelogeninas podem estar associadas com a diferenciação dos odontoblastos durante o desenvolvimento, e subsequente formação de pré-dentina^{40,41}, o que tem levado pesquisadores a utilizarem a matriz derivada do esmalte no tratamento conservador da polpa, obtendo excelentes resultados.

NAKAMURA et al. em 2001⁴⁰, analisaram os efeitos da matriz derivada do esmalte (EMD) no processo de reparo de polpas expostas de *minipigs*, usando como controle pasta de hidróxido de cálcio. Foi demonstrado, por meio de análise morfométrica, que a quantidade de tecido duro formado em dentes tratados com EMD foi duas vezes maior do que a quantidade apresentada nos dentes do grupo controle, sugerindo que a EMD é capaz de promover um processo de reparo pulpar superior ao hidróxido de cálcio.

No ano seguinte, NAKAMURA et al.⁴² realizaram um estudo após pulpotomia em *minipigs*, e obtiveram resultados semelhantes, demonstrando que o potencial da EMD como agente biologicamente ativo induz reparo pulpar e formação de dentina em dentes pulpotomizados.

IWATA et al.²⁸ no mesmo ano, verificaram que frações osteocondutivas de extratos provenientes do esmalte (OFE), em cultura de células, induzem diferenciação dos odontoblastos, indicando que os OFEs contém BMPs que contribuem na indução de biomineralização.

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi analisar:

- i) Microscopicamente o comportamento do remanescente pulpar protegido com membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada após pulpotomia em dentes de cães, com a hipótese de que este material biológico pudesse induzir formação de barreira de tecido mineralizado;
- ii) Comparativamente o método radiográfico digital e convencional, com a hipótese de que o método digital (Digora) pudesse permitir uma melhor identificação de barreira de tecido mineralizado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, 2 cães sem raça definida, com idade em torno de três anos, sendo um macho com peso aproximado de 15 Kg, proveniente do canil do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru, e uma fêmea com aproximadamente 30 Kg de peso, proveniente do canil da Vigilância Sanitária do município de São Manoel, foram utilizados para o experimento após o período de quarentena, apresentando ótima condição de saúde.

Estes animais foram confinados, isoladamente, no canil do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, sob os cuidados de uma Médica Veterinária. A alimentação foi à base de ração, sendo fornecida água à vontade.

O método obedeceu às normas da “International Organization for Standardization” (ISO) 7405:1997²⁷.

Os materiais utilizados foram divididos em dois grupos:

- Grupo I (material teste): membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada - Gen-derm[®] / RMS:103.455.00007 - Baumer S.A. (Mogi Mirim, SP, Brasil) (Figura 1A).

A membrana foi previamente cortada, com perfurador de couro, em pequenos discos com diâmetros compatíveis com a embocadura dos canais (Figura 1B) e novamente esterilizados com raios Gama (25 KGy).

- Grupo II (material controle): pasta de hidróxido de cálcio - (Figura 1C, hidróxido de cálcio P. A. - Biodinâmica[®] - Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, Ibiporã, PR, Brasil) e solução salina estéril 0,9% (m/v).

Os períodos experimentais foram de sete e setenta dias, sendo um animal para cada período.

Foram utilizados 10 dentes de cada animal: 3^{os} e 4^{os} pré-molares e 1^{os} molares inferiores, caninos e 3^{os} incisivos superiores, distribuídos sem critério entre os dois grupos, sendo 7 dentes para o grupo I e 3 dentes para o grupo II (Tabelas 1 e 2).

Figura 1: Materiais utilizados no experimento. 1A) Membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada, utilizada no Grupo I; **1B)** Discos de membrana absorvível cortados com perfurador de couro; **1C)** Hidróxido de cálcio, utilizado no Grupo II.

4.1. Procedimentos operatórios

Todos os cuidados necessários para a obtenção de um ambiente asséptico para a realização dos procedimentos operatórios foram tomados, bem como a paramentação completa do operador e auxiliares.

Os animais foram submetidos a um jejum sólido de 10 horas e hídrico de 4 horas antes da anestesia.

Para a intervenção nos animais foi realizada contenção química por meio de medicação pré-anestésica, Levomepromazina (fenotiazina, Neozine[®] - Rhodia Farma) 0,5 mg/Kg intramuscular, associada a um anestésico dissociativo, sendo o seu princípio ativo a Tiletamina/Zolazepan (Telazol[®] - Fort Dodge Animal Health). A dose de indução anestésica administrada foi de 0,06 mL/Kg 15 minutos após a administração do pré-anestésico, também pela via intramuscular.

Durante todo o procedimento cirúrgico, os animais receberam solução salina estéril a 0,9% (m/v) via endovenosa, por meio de um cateter. A manutenção da anestesia foi realizada com sucessivas reaplicações endovenosas do anestésico descrito anteriormente, na dose de 0,03 mL/Kg a cada 40 minutos, em média, até o término dos procedimentos.

Para completar a anestesia requerida, já que os anestésicos dissociativos não são capazes de oferecer uma completa analgesia, foi efetuado um bloqueio com anestésico local, utilizando-se para isso o Cloridrato de Prilocaína (Citanest[®] a 3%, com vasoconstritor- Astra) na dose máxima de 9 mg/Kg. Os forames bloqueados foram, na maxila, o infra-orbitário, sendo o acesso obtido levantando-se o lábio superior na borda dorsal do terceiro pré-molar, anestesiando

os incisivos, caninos e pré-molares do lado correspondente, e, na mandíbula, o forame mandibular que se encontra na face interna do ramo da mandíbula, dessensibilizando todos os dentes do lado correspondente⁸³.

Com os animais anestesiados, iniciou-se a remoção de cálculos com curetas periodontais e, quando necessário, com brocas diamantadas esféricas em alta rotação. Com o campo fenestrado em posição (Figura 2A), realizou-se o isolamento absoluto com arco de plástico Young, lençol de borracha e grampos nº 00 (Figura 2B), com posterior aplicação de adesivo cianoacrilato (SuperBonder® - Loctite) na interface borracha/dente e borracha/gengiva, com aplicador *microbrush* (Figura 2C), para a obtenção de um melhor vedamento. Tanto previamente como posteriormente à realização do isolamento absoluto, foi feita uma anti-sepsia da superfície do dente e do campo operatório com clorexidina 0,2%.

A pulpotomia foi realizada com brocas diamantadas esféricas nº 1013 e 1014 HL K.G. Sorensen (SP, Brasil) em alta rotação sob constante irrigação com água destilada. Nos dentes posteriores (3^{os} e 4^{os} pré-molares e 1^{os} molares inferiores), inicialmente removeu-se a cúspide e a polpa sob a mesma, depois realizou-se uma abertura na fossa distal e outra na fossa mesial (Figura 3A), diminuindo assim o risco de perfuração. Nos anteriores (caninos e 3^{os} incisivos superiores), realizou-se uma cavidade classe V que se estendeu em direção à borda incisal dos dentes (Figura 3B), seguindo o caminho da polpa para que a mesma fosse totalmente removida.

Após as cavidades serem lavadas com solução salina estéril 0,9% (m/v) e secas com bolinhas de algodão estéreis até conseguir hemostasia fisiológica, colocou-se os materiais sobre o remanescente pulpar.

O disco de membrana absorvível foi levado em posição com uma pinça clínica e uma cuidadosa acomodação foi realizada com um condensador para amálgama nº 1 de Ward (Figura 3C). A hidratação da membrana se deu a partir do contato com o remanescente pulpar.

O hidróxido de cálcio e o soro fisiológico foram misturados em um pote Dapen, formando assim uma pasta que foi levada em posição com o auxílio de um aplicador de cimento de hidróxido de cálcio (Figura 3D) e acomodado cuidadosamente com uma bolinha de algodão estéril.

Para a proteção dos mesmos utilizou-se guta percha em bastão plastificada (Figura 3E), previamente esterilizada com raios Gama (25 KGy). O material restaurador empregado foi o cimento de ionômero de vidro resinoso Vitremer® - 3M (St. Paul, MN, USA), usado de acordo com as normas do fabricante, e inserido na cavidade com uma seringa Centrix e fotopolimerizado (Figura 3F).

Figura 2: Procedimentos pré-pulpotomia. 2A) Animal com campo fenestrado; **2B)** Isolamento absoluto realizado; **2C)** Aplicação do cianoacrilato com *microbrush*.

Figura 3: Procedimentos na pulpotomia. 3A) Abertura coronária realizada nos dentes inferiores; **3B)** Abertura coronária realizada nos dentes superiores; **3C)** Membrana absorvível em posição; **3D)** Inserção da pasta de hidróxido de cálcio com aplicador de hidróxido de cálcio; **3E)** Guta percha em posição; **3F)** Dentes restaurados com ionômero de vidro resinoso fotopolimerizado.

Tabela 1. Distribuição dos materiais entre os dentes utilizados no período de sete dias.

DENTES	MATERIAIS
1° molar inferior direito	Hidróxido de cálcio
1° molar inferior esquerdo	Hidróxido de cálcio
2° pré-molar inferior direito	Membrana absorvível
2° pré-molar inferior esquerdo	Membrana absorvível
3° pré-molar inferior direito	Membrana absorvível
3° pré-molar inferior esquerdo	Membrana absorvível
Canino superior direito	Membrana absorvível
Canino superior esquerdo	Hidróxido de cálcio
3° incisivo superior direito	Membrana absorvível
3° incisivo superior esquerdo	Membrana absorvível

Tabela 2. Distribuição dos materiais entre os dentes utilizados no período de setenta dias.

DENTES	MATERIAIS
1° molar inferior direito	Hidróxido de cálcio
1° molar inferior esquerdo	Membrana absorvível
2° pré-molar inferior direito	Membrana absorvível
2° pré-molar inferior esquerdo	Hidróxido de cálcio
3° pré-molar inferior direito	Membrana absorvível
3° pré-molar inferior esquerdo	Membrana absorvível
Canino superior direito	Hidróxido de cálcio
Canino superior esquerdo	Membrana absorvível
3° incisivo superior direito	Membrana absorvível
3° incisivo superior esquerdo	Membrana absorvível

4.2. Período pós-operatório

A recuperação pós-anestésica dos animais levou em média 2 horas, com o retorno total das funções normais ocorrendo, em média, 4 horas após o término do procedimento cirúrgico.

Esses animais, que ficaram em observação durante os períodos pós-operatórios de sete e setenta dias, não manifestaram nenhuma mudança de comportamento que indicasse presença de dor ou algum outro sinal. Nesse período a alimentação foi à base de ração pastosa, sendo fornecida água à vontade.

4.3. Eutanásia dos animais

Decorridos os períodos experimentais, foi realizada a eutanásia por perfusão sob anestesia^{5,46}. Os animais foram pré-anestesiados com Levomepromazina (Neozine[®] - Rhodia Farma), na dose de 0,5 mg/Kg, via intramuscular. Aproximadamente 15 minutos depois, os animais foram anestesiados através da via intravenosa com Tiopental sódico (Thionembutal[®] - Abbott), na dose de 12,5 mg/Kg.

Já anestesiados, foram iniciados os trabalhos de perfusão, realizados após a dissecação bilateral das carótidas e jugulares, utilizando-se uma bomba perfusora (DKS – David Kopf System – Calif, USA) que bombeou para o interior da artéria carótida, primeiramente, a solução de cloreto de sódio 0,9% (m/v) e depois o formol 10% (m/v) tamponado para a fixação do tecido. Quando

necessário, aplicava-se uma suplementação anestésica com $\frac{1}{4}$ ou até metade da dose anestésica inicial, para a ausência total de consciência e de dor até a constatação da morte do animal.

Em seguida, as peças foram removidas e colocadas em solução de formol 10% tamponado durante uma semana.

Todos os procedimentos relativos à anestesia dos animais, os procedimentos clínicos propriamente ditos, períodos pós-operatórios e eutanásia, foram acompanhados pela Médica Veterinária.

4.4. Obtenção e análise das radiografias

Após a fixação, as peças foram radiografadas pelo método digital, em placas de fósforo fotoestimuladas do sistema Digora, e também, pelo método convencional, em filmes periapicais Kodak Insight® - Eastman Kodak Company (Rochester, NY, USA). Para isso foi utilizado um aparelho de raios X Dabi Atlante® Spectro 70/10, regulado para 70 kV e 10 mA, com uma distância de 50 cm do ponto focal ao sensor de imagem, sendo 0,3 segundo de exposição para a placa óptica e 0,6 segundo para o filme periapical.

A leitura das placas ópticas foi realizada imediatamente após a tomada radiográfica, em uma leitora do sistema Digora, e as imagens padrão, negativa e terceira dimensão (3D) foram capturadas pelo software do sistema digital *Digora for Windows 1.51*. Os filmes radiográficos periapicais foram processados pelo

método tempo-temperatura, em uma câmara escura com iluminação de segurança adequada, utilizando-se revelador e fixador Kodak Dental® – Kodak (SP, Brasil).

Em seguida, as imagens digitais e as radiografias convencionais obtidas foram interpretadas por quatro profissionais experientes, sendo dois da área de Endodontia, um da Dentística e um da Radiologia, que desconheciam o material utilizado sobre o remanescente pulpar em cada dente, os quais observaram a presença ou não de uma imagem sugestiva de barreira mineralizada.

4.5. Procedimento histotécnico

Depois de radiografadas, as peças foram desmineralizadas em solução de Morse (ácido fórmico 25% (v/v) e citrato de sódio 10% (m/v), renovada semanalmente, como pré-requisito para o processamento histotécnico.

O processo de desmineralização dos espécimes consumiu aproximadamente três meses, sendo monitorado por meio de exames radiográficos convencionais, nos quais eram observadas áreas radiopacas (menor desmineralização) e radiolúcidas (maior desmineralização) e pela penetração de um alfinete para verificar a consistência.

Constatada a completa desmineralização, os espécimes foram lavados em água corrente, desidratados em série crescente de concentração de álcoois, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram processados 20 dentes no total, sendo 10 para o período de sete dias e 10 para o período de setenta dias. Dentre estes, 4 eram 1^{os} molares inferiores, que, por serem muito grandes, foram divididos ao meio e, assim, a raiz mesial e a distal foram incluídas separadamente,

totalizando, desta forma, 24 blocos, após o que, foram realizados os cortes seriados de 6 μm de espessura, colorações com Hematoxilina e Eosina (H.E.) e montagem das lâminas para a realização da análise ao microscópico óptico.

4.6. Análise microscópica

Com o auxílio de um microscópio óptico Bauch & Lomb[®] (USA), foram avaliados os seguintes eventos:

1. Neoformação de tecido mineralizado;
2. Características do tecido mineralizado neoformado;
3. Características do tecido pulpar remanescente;
4. Características da camada odontoblástica;
5. Resposta celular inflamatória.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os resultados foram obtidos por meio da análise microscópica descritiva do processo de reparo da polpa dentária e por meio da análise radiográfica digital (Digora) e convencional, após os períodos experimentais de sete e setenta dias, depois de realizada a pulpotomia em dentes de cães e proteção do remanescente pulpar com membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada (Grupo I – material teste) e com o hidróxido de cálcio (Grupo II – material controle).

5.1. Análise microscópica

5.1.1 Período de sete dias

A) Grupo I (teste) – Membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada

Os espécimes examinados demonstraram a embocadura do canal radicular fechada por uma estrutura amorfa, basofílica e homogênea, representando o material protetor (Figura 4A). O tecido conjuntivo pulpar subjacente apresentou-se em íntimo contato com a referida estrutura (Figura 4B), exibindo um aspecto frouxo e um ou outro fragmento de dentina. A camada odontoblástica da parede dentinária estava alterada (Figura 4C).

B) Grupo II (controle) – Hidróxido de cálcio

A microscopia demonstrou a embocadura dos canais radiculares tomada por uma estrutura de aspecto eosinofílico e homogêneo, caracterizando uma massa disforme compatível com a necrose por coagulação (Figura 4D). Essa massa apresentou-se em contato direto com o tecido conjuntivo subjacente (Figura 4E), que apresentava fragmentos de dentina e moderado infiltrado inflamatório crônico estendendo-se, gradativamente, de modo discreto, para o tecido conjuntivo pulpar nos limites do terço cervical. A camada de células odontoblásticas estava alterada na região do terço cervical, no entanto, foi possível detectar remanescentes das referidas células posicionadas junto à camada de pré-dentina, bem como a presença, em alguns espécimes, de um foco hemorrágico nas imediações. A partir do terço médio para apical, o tecido conjuntivo pulpar exibiu características de normalidade com a camada odontoblástica bem definida (Figura 4F).

5.1.2 Período de setenta dias

A) Grupo I (teste) – Membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada

Das 11 raízes que receberam este material, apenas 2 apresentaram a embocadura do canal fechada por uma faixa estreita de tecido fibroso que se sobrepunha a um tecido neoformado de aspecto eosinofílico, compatível com tecido mineralizado (Figura 5A), que se posicionava aderido às paredes dentinárias para depois se projetar em direção à luz do canal. Este tecido

mineralizado neoformado apresentava-se espesso e homogêneo em toda a extensão do canal, cujo processo de formação evoluiu da periferia para o centro, obliterando-o no terço cervical (Figura 5B). Ele encontrava-se unido ao tecido mineralizado do interior do canal (Figura 5C) que continha estruturas basofílicas sugestivas de fragmentos de dentina (Figura 5D). O tecido pulpar subjacente estava presente demonstrando, inclusive, presença de células odontoblásticas posicionadas nas paredes laterais. As demais raízes também apresentaram a embocadura dos canais fechada por estreita faixa de tecido fibroso, porém não houve formação de tecido mineralizado neoformado, e o interior dos canais estavam preenchidos por tecido conjuntivo fibroso em toda a extensão (Figura 5E). Células inflamatórias não foram observadas no remanescente do tecido conjuntivo pulpar.

B) Grupo II (controle) – Hidróxido de cálcio

A embocadura do canal radicular de todos os espécimes examinados apresentou-se fechada por um tecido mineralizado neoformado com características dentinóides, demonstrando na sua intimidade áreas homogêneas entremeadas por estruturas sugestivas de túbulos dentinários (Figura 5F). Observou-se a presença de tecido conjuntivo pulpar de aspecto predominantemente denso e rico em fibras colágenas, que continuou até o terço apical com remanescentes de tecido conjuntivo frouxo e células odontoblásticas em desarranjo estrutural.

Figura 4: Fotomicrografia do remanescente de tecido pulpar protegido com membrana absorvível [A-C] e hidróxido de cálcio [D-F], no período de sete dias. Membrana absorvível em íntimo contato com o tecido conjuntivo pulpar subjacente [, **A** (H.E. 10X) e **B** (H.E. 40X)]; fragmento de dentina [*, **B** (H.E. 40X)] e camada odontoblástica alterada [®, **C** (H.E. 40X)]. Necrose por coagulação, induzida pelo hidróxido de cálcio [➡, **D** (H.E. 10X)], em contato direto com o tecido pulpar subjacente [➡, **E** (H.E. 40X)] e camada odontoblástica bem definida [®, **F** (H.E. 40X)].

Figura 5: Fotomicrografia do remanescente de tecido pulpar protegido com membrana absorvível [A-E] e hidróxido de cálcio [F], no período de setenta dias. Faixa de tecido fibroso na embocadura do canal sobrepondo o tecido mineralizado neoformado aderido às paredes dentinárias [⊗, A (H.E. 10X)]; tecido mineralizado neoformado obliterando o terço cervical [◄, B (H.E. 10X)]; tecido mineralizado neoformado unido ao tecido mineralizado do interior do canal [◄, C (H.E. 10X)]; fragmentos de dentina [*, D (H.E. 100X)] e tecido conjuntivo fibroso formado em toda a extensão do canal radicular [◻, E (H.E. 10X)]. Tecido mineralizado neoformado na embocadura do canal radicular [➡, F (H.E. 10X)].

5.2. Análise radiográfica

Os observadores analisaram os 20 dentes, totalizando 32 raízes, 16 para cada período experimental. Cada raiz foi interpretada quatro vezes (uma para cada observador).

Dentre as 32 raízes analisadas, 22 foram protegidas com membrana absorvível após a pulpotomia, entretanto, nenhuma delas apresentou imagem sugestiva de barreira mineralizada, por nenhum dos métodos radiográficos. A proteção com hidróxido de cálcio foi realizada em 10 raízes, das quais 5 apresentaram imagem sugestiva de barreira mineralizada.

A análise das imagens digitais indicou a presença de imagem sugestiva de barreira mineralizada em 4 raízes, que receberam o hidróxido de cálcio como material protetor, sendo todas referentes ao período de sete dias. Por este método, não houve concordância entre todos os observadores em qualquer das raízes (Tabela 3, Figuras 6-8). Não houve diferença entre as imagens padrão, negativa e 3D para cada raiz observada.

Em contrapartida, através da análise das radiografias convencionais, 5 raízes apresentaram imagem sugestiva de barreira mineralizada, mas apenas 1, a distal do 1º molar inferior direito, correspondia ao período de setenta dias e havia sido tratada com hidróxido de cálcio (Tabela 4, Figura 9). Interessante notar que todos os observadores foram concordes na identificação de imagem sugestiva de barreira em apenas 2 raízes, embora no período de sete dias, mas apenas três foram concordes na identificação da raiz distal do 1º molar inferior direito.

Tabela 3. Indicação radiográfica sugestiva de barreira mineralizada (células em destaque) no período de sete dias.

Dentes	Materiais	Observadores							
		1		2		3		4	
		D	C	D	C	D	C	D	C
1º MID - mesial	HC								
1º MID - distal	HC								
1º MIE - mesial	HC								
1º MIE - distal	HC								
2º PMID	MA								
2º PMIE	MA								
3º PMID	MA								
3º PMIE	MA								
CSD	MA								
CSE	HC								
3º ISD	MA								
3º ISE	MA								

D = Digital

C = Convencional

HC = Hidróxido de cálcio

MA = Membrana absorvível

Tabela 4. Indicação radiográfica sugestiva de barreira mineralizada (células em destaque) no período setenta dias.

Dentes	Materiais	Observadores							
		1		2		3		4	
		D	C	D	C	D	C	D	C
1º MID-mesial	HC								
1º MID-distal	HC								
1º MIE-mesial	MA								
1º MIE-distal	MA								
2º PMID	MA								
2º PMIE	HC								
3º PMID	MA								
3º PMIE	MA								
CSD	HC								
CSE	MA								
3º ISD	MA								
3º ISE	MA								

D = Digital

C = Convencional

HC = Hidróxido de cálcio

MA = Membrana absorvível

Figura 6: Imagens radiográficas do 1º MID (hidróxido de cálcio - sete dias).

- **Digital:** **A)** Imagem padrão; **B)** Imagem negativa; **C)** Imagem 3D.

II - Convencional.

Figura 7: Imagens radiográficas do 1º MIE (hidróxido de cálcio - sete dias).

- **Digital:** **A)** Imagem padrão; **B)** Imagem negativa; **C)** Imagem 3D.

II - Convencional.

Figura 8: Imagens radiográficas do CSE (hidróxido de cálcio - sete dias).

- **Digital:** **A)** Imagem padrão; **B)** Imagem negativa; **C)** Imagem 3D.

II - Convencional.

Figura 9: Imagens radiográficas do 1º MID (hidróxido de cálcio - setenta dias).

I - Digital: **A)** Imagem padrão; **B)** Imagem negativa; **C)** Imagem 3D.

II - Convencional.

6. *DISCUSSÃO*

6. Discussão

O tratamento conservador por meio da pulpotomia visa manter a polpa radicular vital, saudável e completamente isolada da câmara pulpar por uma camada de dentina e odontoblastos. A formação de uma barreira mineralizada, após a realização da pulpotomia, isola o tecido pulpar remanescente dos efeitos tóxicos oriundos dos materiais restauradores ou mesmo de uma microinfiltração bacteriana⁵⁰.

Para tanto, se faz necessária a utilização de materiais que promovam o reparo pulpar e estimulam a formação da barreira mineralizada, o que tem estimulado buscas incessantes por um material biológico ideal.

Até o momento, cães têm sido largamente utilizados como modelo experimental em pulpotomia, sendo também aceitos macacos e *minipigs*. Optou-se neste estudo pela utilização de cães uma vez que a maioria dos relatos na literatura os tem utilizado como modelo experimental, e pelo fato dos pesquisadores envolvidos terem conhecimentos dos procedimentos clínicos e cirúrgicos relacionados a este animal. Ainda, determinou-se a distribuição dos dentes e períodos experimentais, quantidade e distribuição dos animais, o material restaurador e a utilização do processo de perfusão para a fixação das peças, em estrita aplicação das normas da “International Organization for Standardization” (ISO) 7405:1997²⁷, com o intuito de permitir a reprodutibilidade do trabalho por qualquer outro grupo de investigadores.

O hidróxido de cálcio foi usado como controle neste trabalho, apesar de não ser um material biológico⁵⁶, devido ao sucesso clínico confirmado pela

análise microscópica, como protetor do remanescente pulpar, demonstrado ao longo dos anos quando da sua utilização, e também, por ser preconizado pela norma nº 7405:1997²⁷ da ISO como controle em tratamentos conservadores do complexo dentina-polpa.

Na busca de agentes alternativos para a pulpotomia, visando manter a vitalidade e a função do complexo dentina-polpa e promover um processo de reparo mais natural e biológico, decidiu-se testar a membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada.

Os resultados microscópicos encontrados neste experimento demonstraram diferenças notáveis entre as respostas pulpares após o procedimento de pulpotomia e proteção dos remanescentes pulpares com membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada e hidróxido de cálcio.

Com a utilização do hidróxido de cálcio, os resultados observados tanto no período de sete como no de setenta dias, foram similares àqueles relatados por outros autores^{3,22,23,48,69,85}. Inicialmente observou-se a zona de necrose formada abaixo do material, e, no período mais longo, a formação de barreira de tecido mineralizado composta por dentina tubular na região próxima à polpa, apresentando continuidade com a dentina das paredes laterais do terço cervical, em todos os espécimes.

A biocompatibilidade da membrana de cortical óssea desmineralizada é claramente observada no período de sete dias, quando não se verifica necrose de coagulação, morte celular e presença de células do sistema

imune. Em contra-partida, nas polpas protegidas com hidróxido de cálcio, a necrose por coagulação, após sete dias, é típica.

Os resultados obtidos após setenta dias, com a utilização da membrana absorvível, não foram satisfatórios, pois não houve formação de barreira de tecido mineralizado na embocadura de nenhum dos canais analisados. A formação de tecido mineralizado neoformado nas paredes dentinárias dos canais radiculares e a calcificação pulpar observada em apenas 2 raízes, parece estar relacionada com a presença de fragmentos de dentina, localizados no interior do tecido pulpar, sugerindo que eles tenham estimulado a formação de tecido duro, pois o tecido mineralizado encontrava-se em íntima relação com as partículas de dentina. Estes eventos foram relatados por HOLLAND et al. em 1978²¹, quando utilizaram fragmentos de dentina sobre o remanescente pulpar após pulpotomia em dentes de cães. Os fragmentos de dentina introduzidos para o interior da polpa durante o mecanismo de exposição, induzem formação de tecido mineralizado, assim como dentina desmineralizada implantada na polpa dentária, devido à capacidade da dentina induzir células mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em odontoblastos^{42,75}. Provavelmente, os fragmentos de dentina que penetraram no interior do tecido pulpar, foram provenientes da remoção da polpa coronária realizada com brocas²¹.

Nos demais espécimes do Grupo I, no período de setenta dias, houve formação de tecido conjuntivo fibroso aderido às paredes do canal, em toda sua extensão. Resultado semelhante foi relatado por NAKASHIMA em 1994⁴⁵, utilizando 0,66 µg de BMP-2 recombinante humana combinada com matriz de colágeno tipo I em polpas amputadas de cães, após setenta dias. Estes autores

somente observaram a formação de tecido mineralizado utilizando 2 µg de BMP-2, sugerindo que os odontoblastos são estimulados de maneira dose dependente. O efeito dose dependente da BMP na indução de formação de dentina reparadora também foi observado quando se utilizou BMP bovina purificada associada ao colágeno insolúvel, sobre a polpa de macacos⁵⁸.

Aparentemente, a quantidade de BMP presente na membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada, utilizada como material teste neste estudo, pode ter sido insuficiente para estimular a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em odontoblastos. Por outro lado, a concentração de BMPs presente na matriz dentinária pode ser superior à encontrada na matriz óssea bovina, pois estudos demonstram indução de dentinogênese com a utilização de dentina alogênica desmineralizada^{42,75}. Portanto, a hipótese de que a membrana absorvível pudesse induzir a formação de barreira de tecido mineralizado não foi confirmada.

É preciso considerar, ainda, a hipótese de que o processamento utilizado para a produção das membranas de osso cortical bovino desmineralizado tenha, de alguma forma, desnaturado os fatores de crescimento disponíveis na membrana. De acordo com dados fornecidos pelo fabricante, o processo de desmineralização do osso cortical bovino ocorre de maneira adequada e controlada, a baixa temperatura, dificultando a desnaturação protéica. Pesquisas serão necessários para estabelecer a concentração efetiva de fatores de crescimento, particularmente da BMP.

Um futuro promissor no tratamento de polpa vital parece ser evidente com o surgimento dos fatores de crescimento como indutores da formação

dentinária. Contudo, novos estudos ainda serão necessários a fim de determinar a qualidade da proteção oferecida ao remanescente pulpar, visando a manutenção da sua vitalidade e integridade.

Foi também objetivo deste estudo analisar comparativamente a eficiência do método radiográfico digital em relação ao método convencional na indentificação da barreira mineralizada.

Por meio da análise microscópica sabe-se que não houve formação de barreira mineralizada em nenhuma raiz do período de sete dias. Setenta dias após a pulpotomia apenas nas raízes tratadas com hidróxido de cálcio (cinco) houve formação de barreira.

A análise radiográfica de 32 raízes indicou imagem sugestiva de barreira mineralizada em 4 raízes com a utilização do método digital (Digora), entretanto, todas estas referentes ao período de sete dias e tratadas com hidróxido de cálcio (Tabela 3) quando não houve formação de barreira, como confirmado pela análise microscópica.

Utilizando o método convencional, 5 raízes apresentaram imagem sugestiva de barreira mineralizada, sendo que todas essas raízes receberam o hidróxido de cálcio como material protetor e, apenas 1, era do período de setenta dias (Tabelas 3 e 4), quando efetivamente houve formação de barreira mineralizada confirmada pela microscopia.

Segundo SYRIOPOULOS et al. (2000)⁷⁰, a habilidade do avaliador é um fator importante na variabilidade do diagnóstico radiográfico, e não a modalidade da imagem. Quando as radiografias são tecnicamente bem feitas e o

processamento digital ou químico é bem elaborado, a dificuldade encontrada para se comparar métodos diferentes de obtenção de uma imagem se remete ao observador, pois a interpretação da imagem sempre será subjetiva⁸.

Neste trabalho, apesar da análise radiográfica ter sido realizada por profissionais muito experientes e calibrados, apenas uma barreira mineralizada dentre as cinco induzidas pelo hidróxido de cálcio, no período de setenta dias, foi efetivamente identificada. Destaque-se, ainda, que um de quatro examinadores não identificou esta barreira (Tabela 4). Mais preocupantes foram os resultados falsos positivos observados em 4 raízes do período de sete dias, quando nenhuma barreira ainda havia sido formada (Tabela 3).

O número de imagens sugestivas de barreira mineralizada obtidas por meio do método radiográfico digital foi inferior às aquelas identificadas pelo método convencional e nenhuma delas foi coincidente com o resultado da análise microscópica. Estudos comparativos entre método radiográfico digital e convencional, demonstram que o digital pode ser menos sensível para visualizar determinadas imagens^{15,82}, particularmente em função de suas dimensões e consistência, sugerindo que o mesmo pode ter ocorrido em relação à presença da barreira mineralizada.

Tendo em vista os benefícios que a imagem digital pode trazer para acelerar os procedimentos, diminuindo a exposição do paciente e o impacto ambiental, o aprimoramento do sistema digital deve ser vigorosamente estimulado.

Entretanto, os resultados radiográficos encontrados neste trabalho não foram confirmados durante a análise microscópica. Da mesma forma, as barreiras mineralizadas encontradas microscopicamente, não foram observadas na

análise radiográfica, não havendo, portanto, uma correspondência entre ambas^{1,47,48,68}. Isto pode ter ocorrido devido a pouca mineralização da barreira ou quando uma trabécula óssea é projetada estrategicamente sobre o local onde se espera que esteja a estrutura procurada. Assim, a presença ou ausência de áreas radiopacas próximas da área onde foi realizado o corte da polpa coronária, não é um indicativo de sucesso ou fracasso do tratamento conservador da polpa²⁰.

7. CONCLUSÕES

7. Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste experimento, pode-se concluir que:

- A membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada, apesar de biocompatível, não induziu formação de barreira de tecido mineralizado quando utilizada como protetor do remanescente pulpar após pulpotomia em dentes de cães;
- O método radiográfico convencional foi mais eficiente que o método digital (Digora) na identificação de barreira de tecido mineralizada, após pulpotomia em dentes de cães;
- Não houve correspondência entre os resultados microscópicos e radiográficos encontrados após a realização da pulpotomia em dentes de cães, nos períodos experimentais de sete e setenta dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAGONES, A. **Hidroxiapatita microgranular em pulpotomias de dentes permanentes de humanos**. Bauru, 1993. 103p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
2. BANG, G.; URIST, M.R. Bone induction in excavation chambers in matrix of decalcified dentin. **Arch. Surg.**, v.94, p.781-789, 1967.
3. BERMAN, D.S.; MASSLER, M. Experimental pulpotomies in rat molars. **J. Dent. Res.**, v.37, n.2, p.229-242, 1958.
4. BESSHO, K. et al. Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. **J. Dent. Res.**, v.70, n.3, p.171-175, 1991.
5. BRAMANTE, C.M. et al. Técnica de perfusão para fixação de tecidos no animal vivo. **Rev. Gaúcha Odontol.**, v.26, n.3, p.205-208, 1978.
6. BRITO, L.R., JIANG, J., VERTUCCI, F.J. The role of biological modulators in endodontic therapy. **Rev. Fac. Odontol. Bauru**, v.10, n.4, p.201-208, 2002.
7. BUTTER, W.T.; MIKULSKI, A.; URIST, M. R. Noncollagenous proteins of a rat dentine matrix possessing bone morphogenetic activity. **J. Dent. Res.**, v.56, p.228-232, 1977.
8. CAPELOZZA, A.L.A. **Estudo comparativo de algumas lesões do periápice através da imagem digital indireta utilizando o programa Adobe Photoshop 5.0**. Bauru, 2002. 127p. Dissertação (Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
9. CASSIDY, N. et al. Comparative analysis of transforming growth factor- α

- isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. **Archs. Oral Biol.**, v.42, p.219-223, 1997.
10. CASTAGNOLA, L. Conservacion de la vitalidad de la pulpa en operatoria dental. In: DE DEUS, Q.D. **Endodontia**. 5.ed. Rio de Janeiro, Medsi, 1992. Cap.7, p.189-204.
11. DE DEUS, Q.D. **Endodontia**. 5.ed. Rio de Janeiro, Medsi, 1992, Cap.7, p.189-204.
12. ESTRELA, C. Correlação entre o diagnóstico da pulpa inflamada e o reparo após pulpotomia. **Rev. Odontol. Brasil Central**, v.6, p.4-8, 1996.
13. FINKELMAN, R.D. et al. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II and TGF- β in human dentin. **J. Bone Min. Res.**, v.5, p.717-723, 1990.
14. FORNER, L. et al. Digital radiology and image analysis for approximal caries diagnosis. **Oper. Dent.**, v.24, p.312-315, 1999.
15. FRIEDLANDER, L.T.; LOVE, R.M.; CHANDLER, N.P. A comparison of phosphor-plate digital images with conventional radiographs for the perceived clarity of fine endodontic files and periapical lesions. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.93, p.321-327, 2002.
16. GU, K.; SMOKE, R.H.; RUTHERFORD, R.B. Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp. **Archs. Oral Biol.**, v.41, n.10, p.919-923, 1996.
17. HELDER, M.N. et al. Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1, OP-1) and tooth development. **J. Dent. Res.**, v.77, n.4, p.545-554, 1998.
18. HILDEBOLT, C.F.; COUTURE, R.A.; WHITING, B.R. Dental photostimulable

- phosphor radiography. **Dent. Clin. N. Amer.**, v.44, p.273-297, 2000.
19. HOLLAND, R.; SOUZA, V. O problema do diagnóstico clínico e indicação de tratamento da polpa dental inflamada. **Rev. Assoc. Paul. Cirur. Dent.**, v.24, n.5, p.188-193, 1970.
20. HOLLAND, R.; SOUZA, V. Tratamento conservador da polpa dental. In: LEONARDO, M.L.; LEAL, J.M. **Endodontia: Tratamento de canais radiculares**. 3.ed. São Paulo, Panamericana, 1998. Cap.4, p.63-75.
21. HOLLAND, R. et al. Influência dos fragmentos de dentina no resultado do tratamento conservador da polpa dental exposta inflamada. **Rev. Gaúcha Odontol.**, v.26, n.2, p. 98-102, 1978.
22. HOLLAND, R. et al. Healing process of dog's dental pulp after pulpotomy and protection with calcium hydroxide or dycal. **Rev. Odont. UNESP**, v.8, p.67-73, 1980.
23. HOLLAND, R. et al. Healing process of dog's dental pulp after pulpotomy and pulp covering with calcium hydroxide in powder or past form. **Acta. Odontol. Pediat.**, v.2, n.2, p.47-51, 1981.
24. HOLLAND, R. et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. **Braz. Dent. J.**, v.12, p.109-13, 2001.
25. HU, C.C. et al. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. **J. Endod.**, v.24, n.11, p.744-751, 1998.
26. INAI, T. et al. Immunohistochemical demonstration of amelogenin penetration toward the dental pulp in the early stages of ameloblast

- development in rat molar tooth germs. **Record**, v.229, p.259-270, 1991.
27. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 7405: Dentistry - Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry - Test methods for dental materials**. Switzerland, ISO, 1997.
28. IWATA, T. et al. Noggin blocks osteoinductive activity of porcine enamel extracts. **J. Dent. Res.**, v.81, n.6, p.387-391, 2002.
29. JEPSEN, S. et al. Osteogenic protein-1 induces reparative dentin formation. In: SHIMONO, M. et al. **Proceedings of the International Conference on dentin/pulp complex 1995 and the International Meeting on clinical topics of dentin/pulp complex**. Tokyo, Quintessence Publishing Co Ltd, 1996. Cap.40, p.321-322.
30. JEPSEN, S. et al. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. **J. Endod.**, v.23, n.6, p.378-382, 1997.
31. JORTIKKA, L. Target cells and receptors for bone morphogenetic protein. In: LINDHOLM, T.S. **Bone Morphogenetic Proteins: Biology, Biochemistry and Reconstructive Surgery**. Georgetown, R.G. Landes Company, 1996. Cap.7, p.65-73.
32. KAVAI, T.; URIST, M.R. Bone tooth-derived bone morphogenetic protein. **J. Dent. Res.**, v.68, n.6, p.1069-1074, 1989.
33. KELLOKUMPU-LEHTINEN, P.; TULIJOKI, T. Osteogenic protein-1 (BMP-7), a novel bone morphogenetic protein. In: LINDHOLM, T.S. **Bone Morphogenetic Proteins: Biology, Biochemistry and Reconstructive Surgery**. Georgetown, R.G. Landes Company, 1996. Cap.5, p.47-51.

-
34. LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v.260, p.920-926, 1993.
35. LI, R.H.; WOZNEY, J.M. Delivering on the promise of bone morphogenetic protein. **Rev. Trends in Biotechnol.**, v.19, n.7, p.255-265, 2001.
36. LIANJIA, Y.; YUHAO, G.; WHITE, F.H. Bovine bone morphogenetic protein induced dentinogenesis. **Clin. Orthop.**, n.295, p.305-312, 1993.
37. MELIUS, B.; JIANG, J.; ZHU, Q. Measurement of the distance between the minor foramen and the anatomic apex by digital and convencional radiography. **J. Endod.**, v.28, p.125-126, 2002.
38. MENTES, A.; GENCOGLU, N. Canal length evaluation of curved canals by direct digital or conventional radiography. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.93, p.88-91, 2002.
39. MIZUTANI, H. et al. A study of the bone morphogenetic protein derived from bovine demineralized dentine matrix. **Nagoya J. Med. Sc.**, v.59, p.37-47, 1996.
40. NAKAMURA, Y. et al. Enamel matrix derivative promotes reparative processes in the dental pulp. **Adv. Dent. Res.**, v.15, p.105-107, 2001.
41. NAKAMURA, Y. et al. The induction of reparative dentine by enamel proteins. **Int. Endod. J.**, v.35, n.5, p.407-417, 2002.
42. NAKASHIMA, M. Dentin induction by implants of autolyzed antigen-extracted allogeneic dentin on amputated pulps of dogs. **Endod. Dent. Traumatol.**, v.5, n.6, p.279-286, 1989.
43. NAKASHIMA, M. The induction of reparative dentine in the amputated

- dental pulps of the dog by bone morphogenetic protein. **Archs. Oral Biol.**, v.35, n.7, p.493-497, 1990.
44. _____. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP) -2 and -4. **J. Dent. Res.**, v.73, n.9, p.1515-1522, 1994.
45. _____. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins -2 and -4 with collagens matrix. **Archs. Oral Biol.**, v.39, n.12, p.1085-1089, 1994.
46. NETO, J.V. Ética em Pesquisa. In: ESTRELA, C. **Metodologia Científica: Ensino e Pesquisa em odontologia**. São Paulo, Artes Médicas, 2001. Cap.18, p.405-447.
47. PEREIRA, J.C.; STANLEY, H.R. Pulp capping: influence of the exposure site on pulp healing histologic and radiographic study in dog's pulp. **J. Endod.**, v.7, p.213-223, 1981.
48. PEREIRA, J.C. et al. Effect of calcium hydroxide in powder or in paste form on pulp-capping procedures: histopathologic and radiographic analysis in dog's pulp. **Oral Surg.**, v.50, n.2, p.176-186, 1980.
49. RADAN, E.; PRICE, C. Evaluation of digital and geometric unsharpness in dental radiographs using an endodontic file model. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.93, p.208-214, 2002.
50. RANLY, D.M. Pulpotomy therapy in primary teeth: new modalities for old rationales. **Pediatr. Dent.**, v.16, n.6, p.403-409, 1994.
51. RANLY, D.M.; GARCIA-GODOY, F. Current and potential pulp therapies for

- primary and young permanent teeth. **J. Dent.**, v.28, n.1, p.153-161, 2000.
52. REN, W.H.; YANG, L.J.; DONG, S.Z. Induction of reparative dentin formation in dogs with combined recombinant human bone morphogenetic protein 2 and fibrin sealant. **Chin. J. Dent. Res.**, v.2, n.3-4, p.21-24, 1999.
53. ROBERTS-CLARK, D.J.; SMITH, A.J. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. **Archs. Oral Biol.**, v.45, n.11, p.1013-1016, 2000.
54. RUSSO, M. et al. Radiographic and histological evaluation of the treatment of inflamed dental pulps. **Int. Endod. J.**, v.15, p.137-142, 1982.
55. RUTHERFORD, R.B. BMP-7 gene transfer to inflamed ferret dental pulps. **Eur. J. Oral Sci.**, v.109, n.6, p.422-424, 2001.
56. RUTHERFORD, R.B.; FITZGERALD, M. A new biological approach to vital pulp therapy. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v.6, n.3, p.218-229, 1995.
57. RUTHERFORD, R.B.; GU, K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7. **Eur. J. Oral Sci.**, v.108, n.3, p.202-206, 2000.
58. RUTHERFORD, R.B. et al. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. **Archs. Oral Biol.**, v.38, n.7, p.571-576, 1993.
59. RUTHERFORD, R.B. et al. The time-course of the induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. **Archs. Oral Biol.**, v.39, n.10, p.833-838, 1994.
60. SAMPATH, T.K.; REDDI, A.H. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation.

- Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.78, p.7599-7603, 1981.
61. SCHMITT, D.; LEE, J.; BOGEN, G. Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. **Pediatr. Dent.**, v.23, p.326-330, 2001.
62. SCHRÖDER, U. Effects of calcium hidroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. **J. Dent. Res.**, Spec Iss, p.541-548, 1985.
63. SELTZER, S.; BENDER, I.B. The dental pulp. In: DE DEUS, Q.D. **Endodontia**. 5.ed. Rio de Janeiro, Medsi, 1992. Cap.7, p.189-204.
64. SIX, N.; LASFARGUES, J.J.; GOLDBERG, M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). **Archs. Oral Biol.**, v.47, n.3, p.177-187, 2002.
65. SLOAN, A.J.; RUTHERFORD, R.B.; SMITH, A.J. Stimulation of the rat dentine-pulp complex by bone morphogenetic protein-7 in vitro. **Archs. Oral Biol.**, v.45, n.2, p.173-177, 2000.
66. SMITH, A.J. et al. In vivo morphogenetic activit of dentine matrix proteins. **J. Biol. Buccale**, v.18, p.123-129, 1990.
67. SMITH, A.J. et al. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. **Archs. Oral Biol.**, v.39, n.1, p.13-22, 1994.
68. SOUZA, V.; HOLLAND, R.; HYZATUGU, R. Evaluation of X-ray examination in the diagnosis of pulps response to conservative treatment. **J. Dent.**, v.41, p.206-213, 1971.
69. STANLEY, H.R. Pulp capping: Conserving the dental pulp - Can it be done?

- Is it worth it? **Oral Surg.**, v.68, n.5, p.628-39, 1989.
70. SYRIOPOULOS, K. et al. Radiography detection of approximal caries: a comparison of dental films and digital imaging systems. **Dentomaxillofac. Radiol.**, v.29, p.312-318, 2000.
71. TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **J. Endod.**, v.25, p.197-205, 1999.
72. TROWBRIDGE, H.O.; KIM, S. Desenvolvimento, estrutura e função da polpa. In: COHEN, S.; BURNS, R.C. **Caminhos da Polpa**. 6.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994. Cap.11, p.297-336.
73. TZIAFAS, D.; KOLOKURIS, I. Inductive of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. **J. Dent. Res.**, v.69, n.1, p.75-81, 1990.
74. TZIAFAS, D.; SMITH, A.J.; LESOT, H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. **J. Dent.**, v.28, n.2, p.77-92, 2000.
75. TZIAFAS, D. et al. Short-term dentinogenic response of dog dental pulp tissue after its induction by demineralized or native dentine, or predentine. **Archs. Oral Biol.**, v.37, n.2, p.119-128, 1992.
76. TZIAFAS, D. et al. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. **Archs. Oral Biol.**, v.40, n.10, p.883-893, 1995.
77. TZIAFAS, D. et al. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor- β_1 on dog dental pulp cells in vivo. **Archs. Oral Biol.**, v.43, n.6, p.431-444, 1998.

- 78.TZIAFAS, D. et al. Dentin regeneration in vital pulp therapy: design principles. **Adv. Dent. Res.** , v.15, p.96-100, 2001.
- 79.TZIAFAS, D. et al. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short term capping experiments. **Int. Endod. J.**, v.35, n.3, p.245-254, 2002.
- 80.UEDA, M. et al. Tissue engineering: applications for maxillofacial surgery. **Mater. Sci. and Eng.**, v.13, p.7-14, 2000.
- 81.URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v.150, n.3698, p.893-899, 1965.
- 82.VALE, I.S.; BRAMANTE, C.M. Visibilidade de algumas limas endodônticas por meio do sistema de imagem digital Digora e de três filmes radiográficos periapicais. **Rev. FOB**, v.10, n.1, p.29-33, 2002.
- 83.WHYTE, A. et al. Anatomia, estrutura e desenvolvimento. In: ROMAN, F.S. **Atlas de Odontologia de Pequenos Animais**. São Paulo, Manole, 1999. Cap.3, p.17-38.
- 84.WOZNEY, J.M. et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. **Science**, v.242, p.1528-1534, 1988.
- 85.ZANDER, H.A. Reaction of the pulp to calcium hydroxide. **J. Dent. Res.**, v.18, p.373-379, 1939.

ABSTRACT

ABSTRACT

“INFLUENCE OF ABSORBABLE DEMINERALIZED BOVINE CORTICAL MEMBRANE ON THE REPARATION PROCESS AFTER PULPOTOMY IN DOGS: MICROSCOPIC AND RADIOGRAPHIC ANALYSIS.”

The success of the pulpotomy is directly related to maintaining vitality and function of the pulp-dentin complex after removal of the coronary portion of the pulp and protection of the radicular pulp. Several materials have been studied for such purpose, however none has yet presented all of the physical, chemical and biologic properties desired, thereby indicating the need for a continuous search for alternative materials. Aiming the analysis of new material for the vital pulp, the purposes of this study were: i) to microscopically evaluate the behavior of dog dental pulp after pulpotomy followed by capping with absorbable demineralized bovine cortical membrane (Group I), with the hypothesis that this biomaterial could induce formation of mineralized tissue barrier after pulpotomy in dogs' teeth, or with calcium hydroxide (Group II, control); and ii) to compare digital and conventional radiographic methods in their ability to identify the pulp responses to treatments, with the hypothesis that digital (Digora) radiographic method in comparison with conventional (periapical film) allows better identification of the mineralized tissue barrier formed after pulpotomy. Methods followed the “International Organization for Standardization” (ISO) specification #7405:1997. One dog was used for each experimental period of 7 and 70 days. Ten teeth per animal were treated according to Groups I and II. The animals were killed after the experimental periods and the teeth removed and prepared for

microscopic and radiographic analysis. After the 70-day period, microscopic evaluation showed formation of a fibrous connective tissue in teeth from group I and mineralized tissue in teeth from group II. Radiographic evaluation of 32 roots demonstrated a suggestive image of mineralized tissue formation in 4 roots (all from the period of 7 days) by the digital method and 5 roots (only one from the period of 70 days) by the conventional method, all from the calcium hydroxide group. Nevertheless it was possible to conclude that: *i)* Although absorbable demineralized bovine cortical membrane is regarded a biocompatible material, it did not induce formation of mineralized tissue barrier after pulpotomy in dogs' teeth; *ii)* the conventional radiographic method is more efficient than the digital method to identify mineralized tissue barrier, and *iii)* there was no correspondence between microscopic and radiographic findings after pulpotomy.

ANEXO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679
Departamento de Ciências Biológicas
e-mail: dep-cibi@fob.usp.br – Fone: (0XX14)235-8282

Abril, 25, 2003

DECLARAÇÃO

Declaro que a pesquisa intitulada “Influência da membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada no processo de reparo após pulpotomia em dentes de cães: análise microscópica e radiográfica” dos autores Canova GC; Granjeiro JM. foi desenvolvida seguindo os princípios propostos em 1959 por Russel e Burch e ratificados em Assembléia da UNESCO, em Bruxelas, em 21/01/78, que culminou com a Declaração dos Direitos dos Animais, especificamente em seus artigos 8º, letra a) e b) e 14º e do sugerido no texto: Princípios Éticos na Experimentação Animal – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal COBEA.

Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Biotério
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
Faculdade de Odontologia de Bauru - USP