FRANCISCO WANDERLEY GARCIA DE PAULA E SILVA

**RESPOSTA PULPAR E PERIAPICAL DE DENTES DE CÃES APÓS PULPOTOMIA E
UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA ÓSSEA MORFOGENÉTICA (rHuBMP-7).
ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E RADIOGRÁFICO.**

Ribeirão Preto

2006

FRANCISCO WANDERLEY GARCIA DE PAULA E SILVA

**RESPOSTA PULPAR E PERIAPICAL DE DENTES DE CÃES APÓS PULPOTOMIA E
UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA ÓSSEA MORFOGENÉTICA (rHuBMP-7).
ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E RADIOGRÁFICO.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva

Ribeirão Preto

2006

Silva, Francisco Wanderley Garcia de Paula e

Resposta pulpar e periapical de dentes de cães após pulpotomia e utilização da proteína óssea morfogenética (rHuBMP-7). Estudo histopatológico e radiográfico. Ribeirão Preto, 2006.

79 p. : il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP - Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientadora: Silva, Léa Assed Bezerra da

1. pulpotomia
2. proteína óssea morfogenética recombinante humana
3. colágeno recombinante humano
4. hidróxido de cálcio
5. óxido de zinco e eugenol

FRANCISCO WANDERLEY GARCIA DE PAULA E SILVA

**RESPOSTA PULPAR E PERIAPICAL DE DENTES DE CÃES APÓS PULPOTOMIA E
UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA ÓSSEA MORFOGENÉTICA (rHuBMP-7).
ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E RADIOGRÁFICO.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Odontopediatria.

Data da defesa: 06 / 02 / 2006

Banca Examinadora

Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo

Instituição: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Alberto Consolaro

Instituição: Faculdade de Odontologia de Bauru/ Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovado

DADOS CURRICULARES

FRANCISCO WANDERLEY GARCIA DE PAULA E SILVA

- Nascimento** 28 de março de 1982 – Itamogi – MG
- Filiação** Francisco Wanderley de Paula e Silva
Maria Angélica Garcia de Paula e Silva
- 2000-2003** Curso de Graduação
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
- 2004** Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
- 2004-2006** Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais *Francisco Wanderley de Paula e Silva* e *Maria Angélica Garcia de Paula e Silva*, pelos incentivos e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Por compreenderem os motivos da minha constante ausência. Obrigado pela dedicação e carinho, pelos esforços para que minha educação fosse a melhor possível. Serei eternamente grato.

A minha irmã *Livia Cristina Arcipreti de Paula e Silva*, por toda força, ajuda e amizade.

A *Maya Fernanda Manfrin Arnez*, pelo carinho, apoio constante e companheirismo. Obrigado por acreditar em mim, por me incentivar na busca de vitórias e na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À *Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva*, pela experiência compartilhada e orientação segura no desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por acreditar na minha capacidade e abrir novos caminhos para a minha formação intelectual e científica. Agradeço por ter me recebido como aluno, pelos ensinamentos, por guiar meus passos na Odontologia.

Ao *Prof. Dr. Mário Roberto Leonardo* pelas importantes contribuições científicas, pela atenção e disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Ao *Prof. Dr. Paulo Nelson Filho*, pelas contribuições na realização deste trabalho, pelos incentivos constantes à pesquisa e pela dedicação ao ensino, fundamentais para formação docente.

À *Profª. Alexandra Mussolino de Queiroz*, pela forma amiga e incentivadora que me recebeu. Pelas orientações desde a graduação, por ter me apresentando a Odontopediatria. *Danda*, obrigado pela confiança em mim depositada em todos os momentos.

MEUS AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual Diretora *Profª. Dra. Marisa Semprini* e da Vice-Diretora *Profª. Dra. Sada Assed*.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da *Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva*.

Aos Professores do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Profª. Dra. Sada Assed*, *Profª. Dra. Maria Cristina Borsatto*, *Profª. Dra. Aldevina Campos Freitas*, *Profª. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva*, *Prof. Dr. Paulo Nelson Filho*, *Profª. Dra. Kranya Victória Díaz Serrano*, *Profª. Alexandra Mussolino de Queiroz*, *Profª. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuaní*, *Profª. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto*, *Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira*, *Prof. Dr. Adílson Thomazinho* e *Profª. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva* pela agradável convivência e valiosos ensinamentos durante minha formação acadêmica e científica.

Ao *Prof. Dr. Mário Tanomaru Filho* pela colaboração durante a documentação fotográfica.

À *Profª. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva* e *Gisele Faria* pela disponibilidade e orientação na análise estatística dos resultados.

Aos Pós-Graduandos *Adriana Sasso Stuaní*, *Andréa Soares de Oliveira Ortolan*, *Fumio Matoba Júnior*, *Valéria Pontelli Navarro*, *Júlio César Avendaño Rueda*, *Regina Karla Pontes Lima*, *Fabício Kitazono de Carvalho*, *Glauce Regina Costa de Almeida*, *Raquel Assed Bezerra da Silva*, *Carolina de Souza Guerra*, *Cristiane Ristum Bagatin Rossi*, *Cristiane Tomaz Rocha*, *Iza Teixeira Alves Peixoto*, *Jaciara Miranda Gomes da Silva*, *Maria Stella Gaspar Gomes Raffaini*, *Patrícia Maria Monteiro*, *Patrícia Motta Fernandes*, *Regina Segatto Saiani*, *Soraya Cheier Gonçalves* e *Thais Helena Andreolli do Amaral* pela agradável convivência.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Benedita Viana Rodrigues, Nilva Aparecida Afonso Ruggiero, Rejane Gomes Cavaleiro Mazer, Marco Antônio dos Santos e Fátima Aparecida Jacinto Daniel* e aos funcionários do Centro de Formação de Recursos Humanos no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais, *Carolina Paes Torres Mantovani, Fátima Rizóli, Gisele Faria, Oswaldo Pinheiro, Naadir Felício e Renata Aparecida Fernandes Rodrigues* pela amizade e atenção que sempre manifestaram.

Ao *Marco Antônio dos Santos* e *Deise Lúcia Chesca Simões* por toda a ajuda e disponibilidade na realização do processamento histológico.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Isabel Cristina Galino Sola* e *Regiane Cristina Moi Sacilotto* pela cordialidade e atenção.

Ao *Júlio César de Matos* e *Cláudia Regina Corrêa de Matos*, pelo profissionalismo e atenção durante a diagramação e impressão deste trabalho.

À *FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)*, pelo suporte técnico, científico e financeiro fundamentais para a realização deste trabalho.

RESUMO

Silva FWGP. Resposta pulpar e periapical de dentes de cães após pulpotomia e utilização da proteína óssea morfogenética (rHuBMP-7). Estudo histopatológico e radiográfico [dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2006.

O objetivo deste estudo foi a avaliação histopatológica e radiográfica da resposta pulpar e periapical de dentes de cães após pulpotomia e utilização da Proteína Morfogenética Óssea Recombinante Humana 7. Foram utilizados 60 dentes (120 raízes) de 6 cães, divididos em 8 grupos, nos períodos experimentais de 7 dias (Grupos I, II, III, IV) e 70 dias (Grupos V, VI, VII, VIII). Após a pulpotomia, o remanescente pulpar foi recoberto com os seguintes materiais: Grupos I e V - Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 (rHuBMP-7) associada ao Colágeno Recombinante Humano (rHuCollagen); Grupos II e VI - Colágeno Recombinante Humano (rHuCollagen); Grupos III e VII (Controle Negativo) - Hidróxido de Cálcio p.a. e soro fisiológico e Grupos IV e VIII (Controle Positivo) - Óxido de Zinco e Eugenol. Decorridos os períodos experimentais, os animais foram mortos, as peças removidas e submetidas ao processamento histológico. A avaliação histopatológica foi realizada subjetivamente em microscópio óptico. A avaliação radiográfica foi realizada considerando-se a integridade da lâmina dura, presença de áreas de rarefação óssea periapical, de reabsorções radiculares (interna e externa) e de ponte de dentina, sendo os resultados submetidos à análise estatística utilizando-se o teste exato de Fisher. Nos espécimes que apresentavam áreas de rarefação periapical, as medidas radiográficas das lesões foram comparadas entre os grupos por meio do teste de Kruskal-Wallis. Os achados histopatológicos evidenciaram que no período de 7 dias, nos Grupos I e II havia um infiltrado inflamatório severo e intensa proliferação vascular no tecido pulpar, no Grupo IV um infiltrado inflamatório moderado enquanto no Grupo III foi observado um infiltrado inflamatório leve, estando o tecido pulpar íntegro. Em todos os grupos não havia formação de ponte de dentina e a região periapical apresentava aspectos de normalidade. No período de 70 dias, nos Grupos V, VI e VIII não houve formação de ponte de dentina, o tecido pulpar apresentava áreas de necrose com presença de células inflamatórias na região periapical e reabsorção cementária e óssea. Por outro lado, no Grupo VII, foi observada presença de ponte de dentina, ausência de processo inflamatório e ausência de reabsorção dos tecidos mineralizados. Com relação aos achados radiográficos, no período de 7 dias, todos os espécimes dos Grupos I, II, III e IV apresentavam integridade da lâmina dura,

ausência de rarefação óssea periapical, ausência de reabsorção radicular (interna e externa) e ausência de ponte de dentina. No período de 70 dias, nos Grupos V, VI e VIII não houve formação de ponte de dentina em nenhum espécime sendo observadas áreas de rarefação óssea periapical em 100% das raízes do Grupo VI, 60% das raízes do Grupo VIII e 40% das raízes do Grupo V, sendo as maiores lesões encontradas no Grupo VI, seguida pelos Grupos V e VIII ($p < 0,05$). No grupo VII, foi observada presença de ponte de dentina em 60% dos casos, integridade da lâmina e ausência de rarefação óssea periapical em 100% dos casos. Pode-se concluir que a Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 quando associada ao Colágeno Recombinante Humano não apresentou resultados satisfatórios.

Palavras-chave: pulpotomia, proteína óssea morfogenética recombinante humana, colágeno recombinante humano, hidróxido de cálcio, óxido de zinco e eugenol.

ABSTRACT

Silva FWGP. Pulpal and periapical response of dogs' teeth after pulpotomy and use of bone morphogenetic protein (rHuBMP-7). Histopathologic and radiographic study [dissertation]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2006.

The purpose of this study was to evaluate, both histopathologically and radiographically, the pulpal and periapical response of dogs' teeth after pulpotomy and use of recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rHuBMP-7). For such purpose, 60 teeth (120 roots), obtained from 6 dogs, were divided in 8 groups and evaluated in two experimental periods: 7 days (Groups I, II, III, IV) and 70 days (Groups V, VI, VII, VIII). After pulpotomy, pulp remnant was covered with the following materials: Groups I and V - recombinant human bone morphogenetic protein-7 (rHuBMP-7) associated to recombinant human like collagen (rHuCollagen); Groups II and VI - recombinant human like collagen (rHuCollagen); Groups III and VII (negative control) - calcium hydroxide and sodium chloride solution; and Groups IV and VIII (positive control) - zinc oxide and eugenol. At the established experimental periods, the animals were sacrificed and the anatomic pieces were obtained and histologically processed. The histopathologic evaluation was realized subjectively in a light microscope. The radiographic evaluation was performed considering the integrity of the lamina dura, presence of areas of periapical bone rarefaction, root resorption (internal and external) and dentin bridge formation. The results were analyzed statistically using Fisher's exact test. In the specimens presenting periapical bone rarefaction areas, the lesions' radiographic measurements were compared among the groups using the Kruskal-Wallis test. The histopathologic findings in the 7-day period revealed that Groups I and II presented a severe inflammatory infiltrate and intense vascular proliferation in the pulp tissue, Group IV presented a moderate inflammatory infiltrate while Group III presented a mild inflammatory infiltrate and intact pulp tissue. In all groups, there was no dentin bridge formation and the periapical region had normal appearance. In the 70-day period, Groups V, VI and VIII showed no dentin bridge formation and pulp tissue presented necrotic areas with inflammatory cells in the periapical region as well as bone and cemental resorption. On the other hand, in Group VII, there was dentin bridge formation, absence of inflammatory process and absence of resorption of mineralized tissues. Regarding the radiographic findings, in the 7-day period, all specimens in Groups I, II, III and IV present intact lamina dura, absence of periapical bone rarefaction, absence of root resorption (internal and

external) and absence of dentin bridge formation. In the 70-day period, Groups V, VI and VIII did not present dentin bridge formation in any specimen. Periapical bone rarefaction areas were observed in 100% of the roots in Group VI, 60% of the roots in Group VIII and 40% of the roots in Group V. The largest lesions were found in Group VI, followed by Groups V and VIII ($p < 0.05$). In Group VII, there was dentin bridge formation in 60% of the cases, intact lamina dura and absence of periapical bone rarefaction in 100% of the cases. Based on these results, it may be concluded that recombinant human bone morphogenetic protein-7 associated to recombinant human like collagen did not present satisfactory results.

Key Words: Pulpotomy, recombinant human bone morphogenetic protein, recombinant human collagen, calcium hydroxide, zinc oxide and eugenol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	18
3 MATERIAL E MÉTODO	20
3.1 PREPARO DA PROTEÍNA ÓSSEA MORFOGENÉTICA ASSOCIADA AO COLÁGENO.....	21
3.2 PROCEDIMENTOS OPERATÓRIOS.....	21
3.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	24
3.4 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA	26
4 RESULTADOS	28
4.1 RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS	29
4.2 RESULTADOS RADIOGRÁFICOS.....	44
5. DISCUSSÃO.....	53
5.1 DOS ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO.....	54
5.2 DA TÉCNICA OPERATÓRIA E DOS MATERIAIS TESTADOS.....	55
5.3 DOS RESULTADOS.....	58
6. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO

I NTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A pulpotomia é uma técnica de tratamento endodôntico conservador, que consiste na remoção do tecido pulpar coronário seguida pela proteção da polpa radicular remanescente com um material capeador que preserve sua vitalidade e integridade, além de estimular a deposição de tecido mineralizado de reparação (Cvek, 1978; Holland et al., 1980; Nakashima, 1989; AAPD, 2000; Andreasen e Andreasen, 2001; Holland et al., 2001; Assed et al., 2005). A pulpotomia é considerada um tratamento definitivo e de custo reduzido, quando comparada aos procedimentos endodônticos radicais, sendo sua taxa de sucesso em torno de 96,0%, tanto para dentes permanentes quanto para dentes decíduos (Assed et al., 2005).

Esta técnica de tratamento está indicada em casos de dentes que apresentam exposição pulpar por cárie, em dentes com polpa exposta por mais de 24 horas em decorrência de traumatismos e em dentes com ampla destruição coronária em que não há necessidade de pino intracanal, sendo indispensável em todos esses casos que haja vitalidade pulpar. Assim, a indicação da pulpotomia está na dependência direta da condição patológica do tecido pulpar, sendo o diagnóstico obtido por meio da anamnese criteriosa, da avaliação clínica e radiográfica e do aspecto macroscópico da polpa (Russo, 1997; Assed et al., 2005).

Desde há muito, o material de escolha amplamente aceito para a realização da pulpotomia tem sido o hidróxido de cálcio (Glass e Zander, 1949; Holland et al., 1980; Ranly, 1994; Nosrat e Nosrat, 1998; Ranly e García-Godoy, 2000; Andreasen e Andreasen, 2001; Accorinte et al., 2005; Assed et al., 2005), devido às suas excelentes propriedades biológicas tais como a capacidade de induzir a formação de barreira de tecido mineralizado quando em contato com o tecido pulpar exposto, bem como sua ação antimicrobiana (Schröder e Granath, 1971; Schröder, 1985; Foreman e Barnes, 1990; Queiroz et al., 2005; Silva et al., 2006).

Entretanto, nas últimas décadas, diversas pesquisas *in vitro* e *in vivo* vêm sendo realizadas na busca por outros produtos ou técnicas que conduzam à reparação do tecido pulpar. Destacam-se, dentre esses, o laser (Kimura et al., 2003), a eletrocirurgia (Sasaki et al., 2002), o glutaraldeído (Fuks et al., 1991; Ranly, 1994), o sulfato férrico (Salako et al., 2003), o Agregado de Trióxido Mineral – MTA (Salako et al., 2003; Faraco-Junior e Holland, 2004; Queiroz et al., 2005), os vidros bioativos (Oguntebi et al., 1993; Salako et al., 2003), o osso congelado liofilizado (Fadavi e Anderson, 1996), a hidroxiapatita (Sübay e Asci, 1993; Tziafas et al., 2001), os fatores de crescimento transformadores- β (Hu et al., 1998; Tziafas

et al., 2001), o colágeno (Carmichael et al., 1974; Nevins et al., 1980; Silva et al., 2006), a matriz derivada do esmalte (Nakamura et al., 2004; Olsson et al., 2005) e as proteínas ósseas morfogenéticas (Nakashima, 1990, 1992, 1994; Rutherford et al., 1993, 1994; Gao et al., 1995; Jenpsen et al., 1997; Ren et al., 1999; Rutherford e Gu, 2000; Rutherford, 2001; Six et al., 2002; Iohara et al., 2004; Saito et al., 2004; Nakashima, 2005).

Os avanços que existiram na área da biologia celular e molecular possibilitaram a compreensão mais detalhada de diversos fenômenos biológicos. Com os novos conhecimentos foi observado que existe uma família de fatores de crescimento capaz de induzir a mineralização, as chamadas proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs). Estas proteínas compõem uma subfamília do Fator de Crescimento Transformador Beta (TGF- β) e fazem parte de um grupo de proteínas não-colagênicas, amplamente distribuídas em tecidos mineralizados e não mineralizados, importantes durante a embriogênese (Lianjia et al., 1993; Gonçalves et al., 1998; Ranly e Garcia-Godoy, 2000; Nakashima e Reddi, 2003; Nakashima, 2005).

As BMPs são responsáveis por diversas atividades biológicas, envolvendo a morfogênese, a regeneração e a reparação tecidual, bem como está envolvida nos processos de diferenciação celular (Nakashima e Reddi, 2003; Iohara et al., 2004). Estas proteínas foram descobertas por Marshall Urist, em 1965, que implantou amostras de tecido ósseo desmineralizado liofilizado no tecido muscular de coelhos. Decorridas 4 a 6 semanas foi observada deposição de tecido ósseo ao redor do material, provavelmente induzida por um fator, posteriormente denominado proteína óssea morfogenética.

Nos primeiros estudos, as BMPs eram extraídas e purificadas de ossos de animais ou da matriz dentinária, o que tornava o procedimento de alto custo, podendo ainda, gerar riscos para o paciente no que diz respeito à transmissão de doenças e possibilidade de estimular a resposta imune do hospedeiro (Hu et al., 2006). Atualmente, a produção de biomateriais recombinantes, sintetizados por técnicas de engenharia molecular, disponibiliza no mercado produtos uniformes e padronizados, de alta qualidade, reprodutibilidade e venda a custo mais acessível ao profissional e ao paciente (Caúla et al., 1999; Carvalho e Silva, 2004; Nakashima e Reddi, 2003; Valois, 2004).

Embora essa proteína seja denominada proteína óssea morfogenética, a mesma não atua estimulando somente a formação de tecido ósseo, mas também os tecidos neural, renal e cardíaco, assim como está envolvida na odontogênese (Nakashima, 1992). Rotineiramente, as BMPs são utilizadas para estimular a reparação de defeitos no tecido ósseo (Sato e Urist, 1985; Sorensen et al., 2004) e, mais recentemente, têm sido empregadas para estimular a formação de tecido dentinário (Nakashima, 1990, 1994;

Rutherford et al., 1993, 1994; Gao et al., 1995; Jepsen et al., 1997; Rutherford e Gu, 2000; Andelin et al., 2003; Nakashima, 2005).

A proteína óssea morfogenética, quando aplicada sobre a polpa dentária, dissolve-se nos fluídos teciduais no período de duas semanas, estimulando a mitose de células mesenquimais e a diferenciação celular (Nakashima, 1990). As células-alvo das BMPs no tecido pulpar são as células mesenquimais indiferenciadas (Iohara et al., 2004; Saito et al., 2004; Nakashima, 2005), que apresentam receptores de superfície específicos para as BMPs, as quais se ligam e iniciam uma cascata de eventos celulares e bioquímicos, que culminam com a proliferação e diferenciação celular e produção de dentina reparadora (Lianjia et al., 1993; Gu et al., 1996; Nakashima e Reddi, 2003; Iohara et al., 2004; Saito et al., 2004).

Entretanto, para exercer sua função biológica, a BMP deve estar associada a um carreador adequado, uma vez que se utilizada isoladamente apresenta alta solubilidade, dispersando-se imediatamente após o implante (Nakashima, 1994; Gonçalves, 1998; Nakashima e Reddi, 2003; Nakashima, 2005). O carreador ideal deveria apresentar relativa insolubilidade em condições fisiológicas, ser biodegradável, proteger contra atividades proteolíticas, funcionar como uma estrutura para a adesão e proliferação celular, ser inerte imunologicamente e permitir a liberação lenta de BMPs, por meio da degradação biológica controlada (Hotz et al., 1994; Gonçalves, 1998; Geiger et al., 2003; Nakashima e Reddi, 2003). Embora nenhum carreador preencha todos estes requisitos, trabalhos recentes têm evidenciado que a matriz óssea desmineralizada, a hidroxiapatita, o sulfato de cálcio, a fibrina, o fosfato tricálcio, o ácido polilático, o ácido poliglicólico e o colágeno são considerados veículos satisfatórios (Missana et al., 1994; Geiger et al., 2003; Nakashima e Reddi, 2003).

O colágeno tem sido utilizado como carreador de escolha por apresentar características importantes, como a facilidade de manipulação e propriedade hemostática, promovendo também a liberação controlada da BMP (Rutherford et al., 1993, 1994; Jepsen et al., 1997; Geiger et al., 2003; Nakashima e Reddi, 2003). Entretanto, embora seja um excelente arcabouço natural para proteínas não-colagênicas, a matriz de colágeno não é capaz de induzir mineralização quando utilizada isoladamente (Rutherford et al., 1993; Nakashima, 1994; Goldberg et al., 2001; Six et al., 2002; Goldberg et al., 2003; Silva et al., 2006).

Assim, a proteína óssea morfogenética associada ao colágeno tem se mostrado um biomaterial promissor para terapias conservadoras do tecido pulpar, devido à sua capacidade de induzir a deposição de dentina reparadora (Nakashima, 1990, 1992; Linjia et al., 1993; Rutherford et al., 1993, 1994; Nakashima, 1994; Ranly, 1994; Ranly e Garcia-Godoy, 2000;

Goldberg et al., 2001, 2003). Evidentemente, novos estudos, laboratoriais e clínicos, que avaliem a resposta do tecido pulpar frente ao emprego destas proteínas e seus carreadores, fornecerão subsídios mais consistentes para a sua possível aplicação em humanos.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta dos tecidos pulpar e periapical de dentes de cães após pulpotomia e proteção do remanescente pulpar com a Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 (rHuBMP-7), por meio de análise histopatológica e radiográfica.

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Preparo da Proteína Óssea Morfogenética associada ao Colágeno

No fluxo laminar, o Colágeno Recombinante Humano – rHuCollagen (Recombinant Human Like Collagen – Lote nº #605COL01 – ProSpec Tany TechnoGene Ltd. – Rehovot – Israel) e a Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 – rHuBMP-7 (Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 7 – Lote nº #605BMP01 – ProSpec Tany TechnoGene Ltd. – Rehovot – Israel) foram solubilizados em água livre de pirogênio (Milli-Q® Ultrapure Water Purification – Millipore Corporate Headquarters – Billerica – USA) e misturados, para a obtenção de uma solução na concentração de 2,5µg de rHuBMP-7/mg de rHuCollagen. A solução foi armazenada em eppendorfs aprotogênicos (Mundial Química – São Paulo – Brasil) e posteriormente liofilizada (Speed Vac® SC 100 – Savant – Ramsey – USA) a 25°C por 2 horas. Porções de 3,0mg da Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 associada ao Colágeno Recombinante Humano foram pesadas e armazenadas em criotubos de 2,0mL (Lio Serum Produtos para Laboratório – Ribeirão Preto – Brasil). O material foi submetido à esterilização em óxido de etileno e, posteriormente, armazenado em freezer a -20°C até o momento da utilização.

3.2 Procedimentos Operatórios

O presente estudo foi realizado de acordo com as normas da International Organization for Standardization (ISO) nº 7405:1997.

Após aprovação do projeto de Pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto, processo nº04.1.402.53.8 (Anexo A), foram selecionados os 2^{os} e 3^{os} pré-molares superiores e os 2^{os}, 3^{os} e 4^{os} pré-molares inferiores de 6 cães, provenientes de uma mesma ninhada, sem raça definida, de ambos os gêneros, com 12 meses de idade e pesando, em média, de 8 a 10 quilos. Deste modo, foram utilizados 60 dentes (120 raízes) distribuídos em 8 grupos, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Material utilizado no presente estudo, distribuição do número de dentes para cada grupo e períodos experimentais

Grupo	Material	Número de dentes	Período Experimental
I	Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 associada ao Colágeno Recombinante Humano	10 dentes (20 raízes)	7 dias
II	Colágeno Recombinante Humano	10 dentes (20 raízes)	7 dias
III	Hidróxido de Cálcio (Controle Negativo)	5 dentes (10 raízes)	7 dias
IV	Óxido de Zinco e Eugenol (Controle Positivo)	5 dentes (10 raízes)	7 dias
V	Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 associada ao Colágeno Recombinante Humano	10 dentes (20 raízes)	70 dias
VI	Colágeno Recombinante Humano	10 dentes (20 raízes)	70 dias
VII	Hidróxido de Cálcio (Controle Negativo)	5 dentes (10 raízes)	70 dias
VIII	Óxido de Zinco e Eugenol (Controle Positivo)	5 dentes (10 raízes)	70 dias

Os animais receberam vermífugos (Drontal® Puppy – Bayer – São Paulo – Brasil) e vitaminas (Glicopan® Pet - Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda – Louveira – Brasil), foram aplicadas vacinas anti-rábica (Rai-Vac I® – Fort Dodge – Campinas – Brasil) e tríplice (Vanguard® HTLP 5/CV-L – Laboratórios Pfizer Ltda. – Guarulhos – Brasil), em 3 doses, com 3 semanas de intervalo entre cada aplicação. Os cães foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com livre acesso à água e dieta padrão da Unidade durante todo o período de experimentação.

Inicialmente os animais foram pré-anestesiados, por meio de injeção intramuscular de 2,0mL de Rompum® (Cloridrato de Dihidrotiazina – Bayer S/A Produtos Veterinários – São Paulo – Brasil) na dosagem de 3,0 mg/Kg de peso, 30 minutos antes do ato operatório. A seguir, por via endovenosa, foi efetuada a anestesia geral com Thionembutal® (Tiopental Sódico – Abbot Laboratórios do Brasil Ltda. – Rio de Janeiro – Brasil), na dosagem de 30mg/kg de peso e, quando necessário, foi realizada a suplementação anestésica. Durante todo o ato operatório, os animais foram mantidos com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% com 2,5% de glicose (Glicolabor Indústria Farmacêutica Ltda. – Ribeirão Preto – Brasil).

A seguir, foi efetuado o exame radiográfico periapical dos dentes a serem utilizados no estudo, utilizando o dispositivo para padronização de tomadas radiográficas em cães, descrito por Cordeiro et al. (1995). Foram utilizados filmes periapicais Ultraspeed® – tamanho 2 (Eastman Kodak Company – Rochester – USA), aparelho de raios-X odontológico Heliodent® (Siemens – New York – USA) , com 60 kVp e 10 mA e tempo de exposição de 1

segundo. As radiografias foram reveladas pelo método tempo/temperatura e arquivadas em cartelas plásticas.

Todo o instrumental utilizado nos procedimentos operatórios foi esterilizado em autoclave a 121°C, por 20 minutos (Souza-Gugelmin et al., 2005). A profilaxia dental foi realizada com o objetivo de remover cálculo e biofilme, seguida pela anestesia infiltrativa complementar com Mepivacaína a 2% com Noradrenalina 1:100.000 (Scandicaine® – Septodont Distribuidora DFL Indústria e Comércio Ltda – Rio de Janeiro – Brasil).

Foi realizado o isolamento do campo operatório com dique de borracha, e anti-sepsia com peróxido de hidrogênio a 3%, seguida pela aplicação de digluconato de clorexidina a 2,0%. A abertura coronária foi realizada utilizando pontas esféricas diamantadas número 1015 (K.G. Sorensen – São Paulo – Brasil) montadas em caneta de alta rotação, refrigeradas a ar e água, determinando uma cavidade classe I, na qual foi removida a ponte de esmalte, de maneira a unir a embocadura dos canais radiculares mesial e distal. A cada 4 preparos cavitários uma nova ponta diamantada foi utilizada para assegurar a eficiência de corte e evitar o aquecimento excessivo.

A câmara pulpar foi então irrigada com solução de soro fisiológico esterilizado (Glicolabor Indústria Farmacêutica Ltda. – Ribeirão Preto – Brasil) e realizada a amputação da polpa coronária, com curetas endodônticas afiadas, até o nível da entrada dos canais radiculares. A hemostasia foi obtida por meio de irrigação da câmara pulpar com solução de soro fisiológico.

Para que todas as variáveis fossem testadas em um mesmo animal, e em diferentes quadrantes, cada hemi-arco recebeu, em sistema de rodízio distribuído ao acaso, os diferentes produtos avaliados, sendo seguidas as instruções dos fabricantes.

Grupos I (7 dias) e V (70 dias): nesses grupos foi avaliada a Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 associada ao Colágeno Recombinante Humano. No momento do procedimento, foram incorporados 3,0mg do material (2,5µg rhBMP-7/mg de rHuCollagen) a 0,5mL de soro fisiológico, em uma placa de vidro esterilizada, sendo a mistura depositada sobre o tecido pulpar com o auxílio de uma cureta e acomodada com mechas de algodão esterilizadas, sem pressão excessiva.

Grupos II (7 dias) e VI (70 dias): nesses grupos foi avaliado o Colágeno Recombinante Humano. Foram incorporados 3,0mg do material a 0,5mL de soro fisiológico sendo a mistura depositada sobre o tecido pulpar com o auxílio de uma cureta e acomodada com mechas de algodão esterilizadas, sem pressão excessiva.

Grupos III (7 dias) e VII (70 dias): nesses grupos foi avaliado o hidróxido de cálcio p.a. (Calcium Hydroxide zur Analyse – Merck – Darmstadt – Alemanha). O pó de

hidróxido de cálcio (0,5g) foi manipulado com soro fisiológico (0,5mL) em uma placa de vidro esterilizada até a obtenção de uma pasta espessa. Essa pasta foi colocada sobre todo o tecido pulpar com o auxílio de uma cureta e acomodada com mechas de algodão esterilizadas, sem pressão excessiva.

Grupos IV (7 dias) e VIII (70 dias): nesses grupos foi avaliado o óxido de zinco e eugenol (IRM[®] – Dentsply Indústria e Comércio Ltda. – Petrópolis – Brasil). O pó de óxido de zinco (1g) foi manipulado com eugenol (1 gota) em uma placa de vidro esterilizada, até a obtenção de uma massa espessa, a qual foi colocada sobre o tecido pulpar com o auxílio de uma cureta e acomodado com mechas de algodão esterilizadas, sem pressão excessiva.

Em todos os grupos o material protetor foi recoberto com cimento de hidróxido de cálcio (Dycal[®] – Dentsply Indústria e Comércio Ltda. – Petrópolis – Brasil) e a cavidade restaurada com cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrem[®] – 3M ESPE Produtos Dentários – Sumaré – Brasil), manipulado de acordo com as instruções do fabricante. Após o término dos procedimentos operatórios foi efetuado o exame radiográfico.

Os animais foram acompanhados durante todo o período experimental para observação de mudanças de hábitos alimentares, desenvolvimento de processos inflamatórios ou supuração dos tecidos, dentre outras anormalidades.

Decorridos os períodos experimentais de 7 (Grupos I, II, III e IV) e 70 dias (Grupos V, VI, VII e VIII), as hemi-arcadas foram radiografadas, da mesma maneira descrita anteriormente, e os animais foram mortos por sobredose anestésica de Thionembutal[®]. As maxilas e mandíbulas foram dissecadas, com auxílio de um bisturi, reduzidas em seu volume e as peças lavadas em água corrente. Para facilitar o processamento histológico, as peças foram seccionadas utilizando discos diamantados, sob constante refrigeração com água, sendo obtidos blocos das peças anatômicas contendo os dentes individualmente.

3.3 Processamento Histológico

As peças foram submetidas à fixação em solução de formol tamponado a 10%, por 72 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as peças foram imersas em um recipiente de vidro contendo uma solução à base de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) composta de EDTA (93,05g – EDTA Disodium Salt Dihydrate – Merck — Darmstadt

Alemanha), glutaraldeído a 25% (20mL – Glutaraldehyde 25% Aqueous Solution® – Mallinckrodt Chemicals – Phillipsburg – EUA), cacodilato de sódio 98% - solução tamponada pH 7,4 (280mL – Sigma® Cacodylic acid – Sigma – St. Louis – EUA), água destilada (200mL) e hidróxido de sódio 0,1N (Hidróxido de Sódio p.a.® – Casa da Química Ind. e Com. Ltda – Diadema – Brasil) e submetidas a desmineralização, acelerada pelo forno microondas (Sharp Carousel® – São Paulo – Brasil). Para a realização deste procedimento, o recipiente contendo as peças foi parcialmente imerso em outro recipiente de vidro contendo água e gelo, com o objetivo de retardar o aumento da temperatura e, conseqüentemente, incrementar o tempo de ação das microondas. O forno de microondas operou na frequência de trabalho de 2450MHz, correspondendo a uma frequência de onda no vácuo de 12,2cm, potência máxima nominal de 700W, regulado em potência média/máxima à temperatura de 30°C para evitar alterações teciduais. As peças foram irradiadas por 10 minutos, com intervalos de 5 minutos entre as irradiações, por um período de 4 horas/dia. A cada 6 irradiações, as peças foram lavadas com solução tampão de cacodilato de sódio a 98% tamponado, pH 7,4, e renovada a solução à base de EDTA. No intervalo entre os dias, o material permaneceu na solução desmineralizadora sem agitação, à temperatura ambiente.

A completa desmineralização das amostras, avaliada por meio da penetração de uma agulha nos tecidos para verificação da sua consistência e por meio de exame radiográfico das peças, foi obtida em aproximadamente 30 dias. Concluída a desmineralização, as peças foram neutralizadas em solução de sulfato de sódio a 5% (Sulfato de Sódio Anhidro – J.T.Baker – Xalostoc – México) por 24 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (Álcool Etílico Absoluto Anhidro® - J.T. Baker – Xalostoc – México), diafanizadas em xilol (Xylol® - Merck – Darmstadt – Alemanha) e incluídas em parafina (Histosec® Pastillen – Merck – Darmstadt – Alemanha), de acordo com a rotina histológica (Tabela 2). Os blocos contendo os dentes individualizados foram reduzidos pela microtomia a cortes seriados longitudinais com 5,0µm de espessura. Para avaliação histopatológica, as lâminas foram coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE), Tricrômico de Mallory e pelo método de Brown & Brenn e observadas em microscópio óptico.

Tabela 2 – Materiais e tempos utilizados para desidratação, diafanização e inclusão das peças

Processo	Material	Tempo (horas)
Desidratação	Álcool 70%	1
	Álcool 80%	1,5
	Álcool 95% (I)	1,5
	Álcool 95% (II)	2
	Álcool Absoluto (I)	2
	Álcool Absoluto (II)	2
	Álcool Absoluto (III)	2
	Álcool Absoluto (IV)	2
Diafanização	Xilol (I)	1,5
	Xilol (II)	1,5
Inclusão	Parafina (I)	2
	Parafina (II)	2

3.4 Avaliação Radiográfica

A avaliação radiográfica foi realizada utilizando as radiografias periapicais obtidas previamente à execução dos atos operatórios e após 7 dias e 70 dias da intervenção. As radiografias foram avaliadas por 3 examinadores calibrados, com relação à presença ou ausência da lâmina dura, de áreas de rarefação óssea periapical, de reabsorções radiculares (interna e externa) e de ponte de dentina. A concordância entre os examinadores foi determinada pelo teste kappa e considerada muito boa ($k=0,9636$). Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do teste exato de Fisher, utilizando-se o software GMC 8.0 (Maia-Campos, 2006). Visando a comparação dos 4 grupos quanto aos diferentes parâmetros, foi utilizado o fator de correção de Bonferroni. Dessa maneira, o nível de significância ($\alpha=0,05$) foi dividido pelo número de parâmetros avaliados (5) e o nível de significância considerado para cada um dos parâmetros passou a ser 1%.

Os grupos I, II, III e IV foram comparados entre si no período de 7 dias e os grupos V, VI, VII e VIII foram comparados entre si no período de 70 dias. Com o objetivo de avaliar se houve diferença nos resultados radiográficos entre os dois períodos experimentais, os grupos I, II, III e IV, no período de 7 dias foram comparados respectivamente com os grupos V, VI, VII e VIII no período de 70 dias.

Para mensuração das lesões periapicais, quando presentes, as radiografias das hemi-arcadas, obtidas previamente à morte dos animais, foram digitalizadas com auxílio de

scanner óptico (Hewlett-Packard – Scanjet 7450 c series – programa versão 3.0.2 – San Diego – CA) e transferidas para o programa Image J 1.28 u (National Institutes of Health – USA). Com o objetivo de calibrar o programa foi realizada a medida da distância da ponta da cúspide até a borda cervical da face distal de cada dente, com compasso de ponta seca, sendo esta medida transferida para o programa. A delimitação e a medida da área radiolúcida sugestiva de lesão periapical, presente em cada raiz, foi determinada em mm². Para realização da análise estatística, as medidas das áreas de rarefação óssea periapical sugestivas de lesão periapical foram inseridas em um teste preliminar para verificar a normalidade da distribuição amostral. Como os valores apresentavam distribuição não-normal, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Resultados Histopatológicos

Grupo I (7 dias) – Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 (rHuBMP -7) associada ao Colágeno Recombinante Humano (rHuCollagen) – Figuras 1 e 2

De acordo com a caracterização histopatológica do tecido pulpar, 7 dias após a pulpotomia, pôde ser verificado que o material protetor encontrava-se parcialmente reabsorvido, observando-se junto ao mesmo um infiltrado inflamatório severo, misto, composto por neutrófilos, macrófagos, plasmócitos e linfócitos associados a edema intersticial. Adjacente a esse processo inflamatório, em sítio mais distante, foi observado no tecido pulpar intensa proliferação vascular, vasos congestos, dissociação fibrilar e células inflamatórias em grau moderado com perda de considerável quantidade de matriz. Não foi observada presença de ponte de dentina em nenhum espécime. Próximo ao terço médio havia intensa proliferação angioblástica, sendo a matriz mais consistente, porém com reduzida população celular, quadro este persistente até a região apical. No ápice radicular, os canais do delta encontravam-se ampliados em sua maioria, ora contendo reduzida população celular, ora parcialmente vazios. Junto ao ápice, a superfície do cimento apresentava-se regular, com cementoblastos em toda sua extensão, presença de fibras e ausência de áreas de reabsorção. O ligamento periodontal estava íntegro. O osso alveolar não apresentava áreas de reabsorção, havendo elevada presença de osteoblastos em sua superfície. Não foram observadas bactérias em nenhum espécime.

Grupo II (7 dias) – Colágeno Recombinante Humano (rHuCollagen) – Figuras 3 e 4

Nesse grupo, o material encontrava-se parcialmente reabsorvido e o tecido pulpar apresentava sinais de inflamação severa, com presença de um infiltrado inflamatório misto, predominantemente mononuclear e ausência de ponte de dentina, sendo observada intensa dissociação de fibras e pequena população celular. No terço médio, à distância do material, foi observada proliferação vascular, vasos congestos, hemorragia intensa, com derramamento de hemácias e áreas de necrose nessa região. Os canais do delta se apresentavam ampliados, muitas vezes preenchidos por células hemorrágicas. Na superfície do cimento apical não havia áreas de reabsorção, sendo a superfície regular, porém com reduzida população de cementoblastos. O ligamento periodontal apresentava-se suavemente aumentado e com pequenos focos hemorrágicos. O osso alveolar se apresentava íntegro. Não foram observadas bactérias em nenhum espécime.

Grupo III (7 dias) – Hidróxido de Cálcio – Figura 5

No período de 7 dias, junto ao hidróxido de cálcio não foi observada ponte de dentina em nenhum espécime. O tecido pulpar adjacente ao material apresentava um infiltrado inflamatório leve, mononuclear e aumento no número de vasos. Ao longo do canal radicular, o tecido pulpar e a camada odontoblástica apresentavam-se íntegros. As regiões apical e periapical também estavam íntegras. No ligamento periodontal não haviam células inflamatórias, sendo observada intensa presença de células e fibras que partiam do cimento e se inseriam no osso alveolar, em meio a um tecido conjuntivo denso e vascularizado. Não foi observada a presença de bactérias em nenhum espécime.

Grupo IV (7 dias) – Óxido de Zinco e Eugenol – Figura 6

Aos 7 dias, não foi observada ponte de dentina em nenhum espécime. O tecido pulpar, junto ao material, apresentava concentrado infiltrado de células inflamatórias misto e com áreas de edema. Ao longo do canal radicular, o tecido pulpar apresentava vasos congestos e acentuada proliferação dos mesmos. No ápice radicular, os canais do delta se encontravam aumentados e preenchidos por tecido conjuntivo íntegro. Não havia áreas de reabsorção na superfície do cimento. O ligamento periodontal mostrava intensa quantidade de fibras colágenas e proliferação angioblástica. O osso alveolar se apresentava íntegro. Não foram detectadas bactérias em nenhum espécime.

Grupo V (70 dias) – Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 (rHuBMP-7) associada ao Colágeno Recombinante Humano (rHuCollagen) – Figuras 7 e 8

Após 70 dias da pulpotomia não foi observada ponte de dentina em nenhum espécime deste grupo, estando a camada odontoblástica ausente ao longo das paredes dentinárias. Nos terços cervical e médio, o remanescente pulpar estava necrosado em todos os casos, circundado pela presença de células inflamatórias. A superfície do cimento era irregular devido às áreas de reabsorção, as quais formavam lacunas cementárias, algumas com presença de células clásticas. No ligamento periodontal, células inflamatórias do tipo mononucleares e polimorfonucleares se encontravam mais concentradas junto ao ápice, formando um ou mais focos. Havia edema generalizado e escassa presença de células. O osso alveolar mostrava áreas de reabsorção não reparadas determinando um aumento acentuado da região periapical. Não foram detectadas bactérias em nenhum espécime.

Grupo VI (70 dias) – Colágeno Recombinante Humano (rHuCollagen) – Figuras 9 e 10

Após 70 dias da pulpotomia e utilização do colágeno, não houve a formação de ponte dentinária em nenhum espécime. Junto ao material, o remanescente pulpar encontrava-se desintegrado ou ausente, estando a polpa nos terços médio e apical, quando presente, com áreas extensas de necrose, dissociação fibrilar e ausência quase total de células. No ápice radicular havia áreas de reabsorção não reparadas na superfície do cimento, estando a superfície irregular e com ausência de cementoblastos. No ligamento periodontal era comum a presença de células inflamatórias, formando um ou mais focos, densos e mistos, quase sempre acompanhado de abscesso, havendo dissociação fibrilar e edema em toda a região periapical. O tecido ósseo alveolar extensamente reabsorvido e não reparado determinava aumento da região periapical. Não foram detectadas bactérias em nenhum espécime.

Grupo VII (70 dias) – Hidróxido de Cálcio – Figura 11

Neste grupo, a resposta padrão observada foi a presença de ponte de dentina de diferentes espessuras, ora mais delgadas ora mais espessas, obliterando a exposição pulpar. A camada de odontoblastos em toda a extensão da dentina encontrava-se dentro dos padrões de normalidade. O tecido conjuntivo estava íntegro, com considerável população fibroblástica e fibras colágenas, além de numerosos vasos. As regiões apical e periapical se apresentavam íntegras. A superfície do cimento apical era regular e continha numerosos cementoblastos em sua superfície. O ligamento periodontal apresentava tecido conjuntivo denso, ausência de células inflamatórias e intensa presença de fibras colágenas dispostas perpendicularmente à superfície cementária. O osso alveolar não apresentava áreas de reabsorção, havendo elevada presença de osteoblastos em sua superfície. Não foram observadas bactérias.

Grupo VIII (70 dias) – Óxido de Zinco e Eugenol – Figura 12

Neste grupo, não ocorreu a formação de ponte de tecido mineralizado em nenhum espécime. O tecido pulpar encontrava-se inflamado com moderada quantidade de células inflamatórias mononucleares em todas as raízes, entre as quais era observada discreta presença de polimorfonucleares. Áreas de dissociação fibrilar eram frequentes em todo o tecido pulpar, acompanhadas de edema e pontos de necrose. A superfície do cimento apical apresentava áreas de reabsorção não reparadas. Na região do ápice radicular, as foraminas encontravam-se ampliadas e com restos teciduais inflamados em seu interior. O ligamento periodontal estava ampliado com presença de infiltrado inflamatório de grau moderado e edema generalizado. O tecido ósseo alveolar apresentava-se reabsorvido e não reparado. Não foram observadas bactérias.

GRUPO I
PROTEÍNA ÓSSEA MORFOGENÉTICA RECOMBINANTE HUMANA 7 ASSOCIADA AO COLÁGENO RECOMBINANTE HUMANO
7 DIAS

Figura 1 – Fotomicrografias representativas dos espécimes do grupo I. No terço cervical, distante do material, tecido pulpar (p) apresentava-se suavemente alterado com ausência de ponte de dentina (A). Junto ao material capeador observava-se presença de severo infiltrado de células inflamatórias (i) (B e D). No terço médio, o tecido pulpar e a camada odontoblástica apresentavam-se íntegros e com proliferação e congestão vascular (C). Ápice radicular evidenciando ramificações levemente aumentadas (setas). Espaço periodontal (Lp) suavemente aumentado e osso alveolar íntegro (E). Maior aumento do painel anterior evidenciando presença de matriz, fibras e células (F). Hematoxilina e Eosina. A e E, 24x. B e C, 40x. D e F, 64x.

GRUPO I
PROTEÍNA ÓSSEA MORFOGENÉTICA RECOMBINANTE HUMANA 7 ASSOCIADA AO COLÁGENO RECOMBINANTE HUMANO
7 DIAS

Figura 2 – Fotomicrografias representativas dos espécimes do grupo I. No terço cervical, ausência de ponte de dentina e infiltrado inflamatório severo junto ao material. À distância do material, tecido pulpar (p) com proliferação e congestão vascular (setas) (A). Região apical e periapical íntegras com ligamento periodontal (Lp) normal (C). Ausência de bactérias na dentina radicular e na região apical e periapical (D e E). Radiografia periapical exibindo características de normalidade (B). Tricrômico de Mallory. A, 24x. C, 40x. Brown e Brenn. D, 24x. E, 64x.

GRUPO II
COLÁGENO RECOMBINANTE HUMANO
7 DIAS

Figura 3 – Fotomicrografias representativas dos espécimes do grupo II. Tecido pulpar (p) alterado no terço cervical e ausência de ponte de dentina (A). Os painéis B e C detalham a presença acentuada de células inflamatórias junto ao colágeno recombinante humano (seta) e proliferação vascular à distância. Terço médio evidenciando tecido pulpar (p) alterado e aumento de vasos (D). Nas regiões apical e periapical o ligamento periodontal (Lp) encontrava-se suavemente aumentado, com intensa presença de fibras e osso alveolar (o) íntegro (E). Hematoxilina e Eosina. A, D e E, 24x. B, 64x. C, 100x.

GRUPO II
COLÁGENO RECOMBINANTE HUMANO
7 DIAS

Figura 4 – Fotomicrografias representativas dos espécimes do grupo II. No terço cervical, ausência de ponte de dentina e infiltrado inflamatório severo junto ao material. À distância do material, tecido pulpar com tendência à normalidade (A e B). Região apical e periapical normais (C). Radiografia periapical exibindo aspectos de normalidade (D). Ausência de bactérias na dentina radicular e na região apical e periapical (E e F). Tricrômico de Mallory. A, 24x. B e C, 40x. Brown e Brenn. E, 24x. F, 64x.

GRUPO III
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO
7 DIAS

Figura 5 – Fotomicrografias representativas dos espécimes do grupo III. Tecido pulpar íntegro (p) e ausência de ponte de dentina em contato direto com o material capeador (m) (A e B). No terço médio, o tecido pulpar (p) e a camada odontoblástica se apresentavam íntegros, sendo evidenciada proliferação angioblástica e suave congestão vascular (C e D). Nas regiões apical e periapical o ligamento periodontal (Lp) encontrava-se normal, com intensa presença de fibras (seta), células e osso alveolar normal (E e F). Maior aumento da região periapical evidenciando cimento (c) e osso alveolar (o) íntegros. O ligamento periodontal (Lp) apresentava intensa presença de fibras de Sharpey (setas) e de células, com ausência de células inflamatórias (G). Radiografia periapical evidenciando a integridade da lâmina dura e ausência de alterações no tecido ósseo (H). Hematoxilina e Eosina. A, 24x. C e E, 40x. Tricrômico de Mallory. B, 24x. D e F, 40x. G, 64x.

GRUPO IV
ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL
7 DIAS

Figura 6 – Fotomicrografias representativas dos espécimes do grupo IV. Tecido pulpar (p) no terço cervical evidenciando extensas áreas hemorrágicas (seta) e ausência de ponte de dentina junto ao material capeador (m) (A e B). O painel C detalha o contato do material capeador com o tecido pulpar (p). Polpa radicular (p) no terço médio em decomposição (D). O painel E evidencia o ápice radicular íntegro e espaço periodontal normal. Radiografia periapical evidenciando a integridade da lâmina dura e ausência de alterações no tecido ósseo (F). Hematoxilina e Eosina. A, D e E, 24x. B, 40x. C, 64x.

GRUPO V
PROTEÍNA ÓSSEA MORFOGENÉTICA RECOMBINANTE HUMANA 7 ASSOCIADA AO COLÁGENO RECOMBINANTE HUMANO
70 DIAS

Figura 7 – Fotomicrografias representativas dos espécimes do grupo V. Tecido pulpar no terço cervical (p) necrosado e ausência de ponte de dentina (A). No terço médio a polpa radicular (p) mostrava aspectos de degeneração tecidual (B). No ápice radicular observava-se áreas de reabsorção cementária (seta), ligamento periodontal (Lp) severamente ampliado e infiltrado inflamatório (i) severo na região periapical (C). O painel D ilustra o infiltrado inflamatório severo próximo ao ápice radicular, presença de edema e dissociação fibrilar. O painel E detalha a figura anterior, evidenciando o infiltrado inflamatório composto predominantemente por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos. A radiografia periapical mostra a perda de integridade da lâmina dura e a presença de áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical crônica (setas) (F). Hematoxilina e Eosina. A, B e C, 24x. D, 64x. E, 100x.

GRUPO V
PROTEÍNA ÓSSEA MORFOGENÉTICA RECOMBINANTE HUMANA 7 ASSOCIADA AO COLÁGENO RECOMBINANTE HUMANO
70 DIAS

Figura 8 – Fotomicrografias representativas dos espécimes do grupo V. Tecido pulpar (p) alterado no terço cervical e ausência de ponte dentinária (A). No terço médio observa-se o tecido pulpar (p) com nítida alteração tecidual, fibrose e áreas de necrose (B). O painel C ilustra as regiões apical e periapical evidenciando ligamento periodontal moderadamente aumentado, presença moderada de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e áreas de reabsorção óssea alveolar. O painel D detalha a região periapical com moderado infiltrado de células inflamatórias. No terço médio observa-se ausência de bactérias no tecido pulpar e nas paredes laterais do canal radicular (E). No ápice radicular e na região periapical com ausência de bactérias (F). Tricrômico de Mallory. A, B e C, 24x. D, 64x. Brown e Brenn. E, 24x. F, 64x.

GRUPO VI
COLÁGENO RECOMBINANTE HUMANO
70 DIAS

Figura 9 – Fotomicrografias representativas dos espécimes do grupo VI. Tecido pulpar parcialmente necrosado no terço cervical e ausência de ponte de dentina na região da exposição pulpar (A). No terço médio observa-se a degeneração da polpa radicular (p) (B). O painel C ilustra o ápice radicular com áreas de reabsorção cementária, região periapical com infiltrado inflamatório severo, edema e ligamento periodontal severamente aumentado. Os painéis D (círculo do painel anterior) e F (quadrado do painel anterior) detalham as áreas de reabsorção cementária (seta). Adjacente às mesmas, observa-se a presença de infiltrado inflamatório severo, predominantemente composto por células mononucleares, edema generalizado e ausência quase total de fibras (E). Radiografia periapical evidenciando a perda de integridade da lâmina dura e a presença de áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical crônica (setas) (G). Hematoxilina e Eosina. A, B, C, 24x. D e F, 64x. E, 100x.

GRUPO VI
COLÁGENO RECOMBINANTE HUMANO
70 DIAS

Figura 10 – Fotomicrografias representativas dos espécimes do grupo VI. Tecido pulpar (p) em decomposição no terço cervical e ausência de ponte de dentina (A). No terço médio observa-se a polpa radicular (p) com áreas de fibrose e degeneração tecidual (B). O painel C ilustra o ápice radicular com áreas de reabsorção cementária, presença de infiltrado inflamatório, edema e abscesso. O painel D detalha a região do ligamento periodontal, severamente ampliado, com edema generalizado, dissociação de fibras, reduzida presença de células e intensa quantidade de células inflamatórias. Os painéis E e F ilustram áreas correspondentes aos painéis C e D, evidenciando a ausência de bactérias. Tricrômico de Mallory. A, B e C, 24x. D, 64x. Brown e Brenn. E, 24x. F, 64x.

GRUPO VII
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO
70 DIAS

Figura 11 – Fotomicrografias representativas dos espécimes do grupo VII. Ponte de dentina (b) em contato direto com o material capeador e tecido pulpar (p) íntegro (A). O painel B ilustra a camada odontoblástica e o tecido pulpar (p) íntegros no terço médio. Os painéis C e E ilustram as regiões apical e periapical, onde o ligamento periodontal (Lp) encontrava-se normal, com intensa presença de fibras de Sharpey (seta). O painel D detalha a região do delta apical mostrando foraminas contendo tecido conjuntivo íntegro no seu interior. A radiografia periapical evidencia a presença de ponte de dentina (seta), integridade da lâmina dura e ausência de alterações no tecido ósseo (F). Tricrômico de Mallory. A, 40x. Hematoxilina e Eosina. C, 40x. D, 64x. B e E, 100x.

GRUPO VIII
ÓXIDO DE ZINCO E EUGENOL
70 DIAS

Figura 12 – Fotomicrografias representativas dos espécimes do grupo VIII. Tecido pulpar (p) em decomposição e ausência de ponte de dentina (A). No terço médio observa-se a polpa radicular (p) com considerável fibrose e áreas de degeneração tecidual (B). Os painéis C, D e E ilustram as regiões apical e periapical evidenciando a superfície cementária com áreas de reabsorção e com presença de infiltrado inflamatório moderado composto predominantemente por linfócitos, macrófagos e plasmócitos, edema e reduzida presença celular. No ápice radicular observou-se a ausência de bactérias (F). Hematoxilina e Eosina. A e C, 24x. B, 40x. D, 64x. E, 100x. Brown e Brenn. F, 40x.

4.2 Resultados Radiográficos

A avaliação radiográfica foi realizada por 3 examinadores calibrados ($k=0,9636$), com relação à integridade da lâmina dura, presença de áreas de rarefação óssea periapical, presença de reabsorções radiculares (interna e externa) e presença de ponte de dentina. Os resultados obtidos nos períodos de 7 e 70 dias encontram-se descritos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Resultados da avaliação radiográfica 7 dias após a pulpotomia, com relação à integridade da lâmina dura, presença de áreas de rarefação óssea periapical, presença de reabsorção radicular (interna e externa) e presença de ponte de dentina. Os valores encontram-se expressos em número de raízes e porcentagem

	Integridade da lâmina dura		Rarefação óssea periapical		Reabsorção radicular interna		Reabsorção radicular externa		Ponte de dentina	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente
rHuBMP7/ rHuCollagen (Grupo I- 20 raízes)	0	20 (100%)	20 (100%)	0	20 (100%)	0	20 (100%)	0	20 (100%)	0
rHuCollagen (Grupo II- 20 raízes)	0	20 (100%)	20 (100%)	0	20 (100%)	0	20 (100%)	0	20 (100%)	0
Hidróxido de Cálcio (Grupo III- 10 raízes)	0	10 (100%)	10 (100%)	0	10 (100%)	0	10 (100%)	0	10 (100%)	0
Óxido de Zinco e Eugenol (Grupo IV- 10 raízes)	0	10 (100%)	10 (100%)	0	10 (100%)	0	10 (100%)	0	10 (100%)	0

Nos 4 grupos estudados, no período experimental de 7 dias, foi observada integridade da lâmina dura, ausência de rarefação óssea periapical, ausência de reabsorção radicular (interna e externa) e ausência de ponte de dentina.

Tabela 4 – Resultados da avaliação radiográfica 70 dias após a pulpotomia, com relação à integridade da lâmina dura, presença de áreas de rarefação óssea periapical, presença de reabsorção radicular (interna e externa) e presença de ponte de dentina. Os valores encontram-se expressos em número de raízes e porcentagem

	Integridade da lâmina dura		Rarefação óssea periapical		Reabsorção radicular interna		Reabsorção radicular externa		Ponte de dentina	
	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Presente
rHuBMP7/ rHuCollagen (Grupo V- 20 raízes)	8 (40%)	12 (60%)	12 (60%)	8 (40%)	20 (100%)	0	20 (100%)	0	20 (100%)	0
rHuCollagen (Grupo VI- 20 raízes)	20 (100%)	0	0	20 (100%)	20 (100%)	0	8 (40%)	12 (60%)	20 (100%)	0
Hidróxido de Cálcio (Grupo VII- 10 raízes)	0	10 (100%)	10 (100%)	0	10 (100%)	0	10 (100%)	0	4 (40%)	6 (60%)
Óxido de Zinco e Eugenol (Grupo VIII- 10 raízes)	6 (60%)	4 (40%)	4 (40%)	6 (60%)	10 (100%)	0	7 (70%)	3 (30%)	10 (100%)	0

Nos 4 grupos estudados, no período experimental de 70 dias, não foi detectada a presença de reabsorção radicular interna em nenhuma das raízes.

As comparações entre os grupos V, VI, VII e VIII quanto aos parâmetros integridade da lâmina dura, presença de rarefação óssea periapical, presença de reabsorção radicular externa e ponte de dentina encontram-se nas tabelas 5 a 8.

Tabela 5 – Comparação entre os grupos V, VI, VII e VIII com relação à integridade da lâmina dura

	INTEGRIDADE DA LÂMINA DURA		p
	Presente	Ausente	
Grupo V	12	8	<0,0001
Grupo VI	0	20	
Grupo V	12	8	0,0215*
Grupo VII	10	0	
Grupo V	12	8	0,2589*
Grupo VIII	4	6	
Grupo VI	0	20	<0,0001
Grupo VII	10	0	
Grupo VI	0	20	0,0076
Grupo VIII	4	6	
Grupo VII	10	0	0,0054
Grupo VIII	4	6	

*= não significante (p>0,01)

Com relação à integridade da lâmina dura, houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos V e VI, Grupos VI e VII, Grupos VI e VIII e Grupos VII e VIII. A lâmina dura se apresentava íntegra em 100% dos espécimes do Grupo VII (Hidróxido de Cálcio), 60% dos espécimes do Grupo V (Proteína Óssea Morfogenética 7 Recombinante Humana associada ao Colágeno Recombinante Humano), 40% dos espécimes do Grupo VIII (Óxido de Zinco e Eugenol) e estava ausente em todos os espécimes do Grupo VI (Colágeno Recombinante Humano). Assim, considerando-se as comparações dos resultados obtidos nos 4 grupos pôde-se estabelecer que o Hidróxido de Cálcio apresentou maior freqüência de espécimes com integridade da lâmina dura, seguido pela Proteína Óssea Morfogenética 7 Recombinante Humana associada ao Colágeno Recombinante Humano, Óxido de Zinco e Eugenol e Colágeno Recombinante Humano.

Tabela 6 – Comparação entre os grupos V, VI, VII e VIII com relação à presença de rarefação óssea periapical

	RAREFAÇÃO ÓSSEA PERIAPICAL		P
	Ausente	Presente	
Grupo V	12	8	<0,0001
Grupo VI	0	20	
Grupo V	12	8	0,0215*
Grupo VII	10	0	
Grupo V	12	8	0,2589*
Grupo VIII	4	6	
Grupo VI	0	20	<0,0001
Grupo VII	10	0	
Grupo VI	0	20	0,0076
Grupo VIII	4	6	
Grupo VII	10	0	0,0054
Grupo VIII	4	6	

*= não significativa ($p>0,01$)

Com relação à presença de rarefação óssea periapical, houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos V e VI, Grupos VI e VII, Grupos VI e VIII e Grupos VII e VIII. Havia rarefação óssea periapical em 100% dos espécimes do Grupo VI (Colágeno Recombinante Humano), 60% dos espécimes do Grupo VIII (Óxido de Zinco e Eugenol) e 40% dos espécimes do Grupo V (Proteína Óssea Morfogenética 7 Recombinante Humana associada ao Colágeno Recombinante Humano). No Grupo VII (Hidróxido de Cálcio) não foi observada rarefação óssea periapical em nenhum dos espécimes. Assim, considerando-se as comparações dos resultados obtidos nos 4 grupos pôde-se estabelecer que o Colágeno Recombinante Humano apresentou maior freqüência de espécimes com rarefação óssea periapical, seguido pelo Óxido de Zinco e Eugenol e Proteína Óssea Morfogenética 7 Recombinante Humana associada ao Colágeno Recombinante Humano.

Tabela 7 – Comparação entre os grupos V, VI, VII e VIII com relação à presença de reabsorção radicular externa

	REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA		P
	Ausente	Presente	
Grupo V	20	0	<0,0001
Grupo VI	8	12	
Grupo V	20	0	1,00*
Grupo VII	10	0	
Grupo V	20	0	0,0295*
Grupo VIII	7	3	
Grupo VI	8	12	0,0014
Grupo VII	10	0	
Grupo VI	8	12	0,1225*
Grupo VIII	7	3	
Grupo VII	10	0	0,1052*
Grupo VIII	7	3	

*= não significante ($p>0,01$)

Com relação à presença de reabsorção radicular externa, houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos V e VI e Grupos VI e VII. Havia presença de reabsorção radicular externa em 60% dos espécimes do Grupo VI (Colágeno Recombinante Humano) e 30% dos espécimes do Grupo VIII (Óxido de Zinco e Eugenol), estando a mesma ausente em todos os espécimes dos Grupos V (Proteína Óssea Morfogenética 7 Recombinante Humana associada ao Colágeno Recombinante Humano) e VII (Hidróxido de Cálcio). Assim, considerando-se as comparações dos resultados obtidos nos 4 grupos pôde-se estabelecer que o Colágeno Recombinante Humano apresentou maior frequência de espécimes com reabsorção radicular externa, seguido pelo Óxido de Zinco e Eugenol.

Tabela 8 – Comparação entre os grupos V, VI, VII e VIII com relação à presença de ponte de dentina

	PONTE DE DENTINA		P
	Presente	Ausente	
Grupo V	0	20	1,00*
Grupo VI	0	20	
Grupo V	0	20	0,0003
Grupo VII	6	4	
Grupo V	0	20	1,00*
Grupo VIII	0	10	
Grupo VI	0	20	0,0003
Grupo VII	6	4	
Grupo VI	0	20	1,00*
Grupo VIII	0	10	
Grupo VII	6	4	0,0054
Grupo VIII	0	10	

*= não significante ($p>0,01$)

Com relação à presença de ponte de dentina, houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos V e VII, Grupos VI e VII e Grupos VII e VIII. Foi observada a presença de ponte de dentina apenas nos espécimes do Grupo VII (Hidróxido de Cálcio), em 60% dos casos.

Com o objetivo de avaliar se houve diferença nas alterações radiográficas nos dois períodos experimentais, os grupos I, II, III e IV (período de 7 dias) foram comparados respectivamente com os grupos V, VI, VII e VIII (período de 70 dias). As comparações encontram-se descritas nas tabelas 9 a 12.

Tabela 9 – Comparação entre os grupos I, II, III e IV (7 dias) e grupos V, VI, VII e VIII (70 dias), respectivamente, com relação à integridade da lâmina dura

	INTEGRIDADE DA LÂMINA DURA		P
	Presente	Ausente	
Grupo I	20	0	0,0016
Grupo V	12	8	
Grupo II	20	0	<0,0001
Grupo VI	0	20	
Grupo III	10	0	1,00*
Grupo VII	10	0	
Grupo IV	10	0	0,0054
Grupo VIII	4	6	

*= não significante ($p>0,01$)

Com relação à integridade da lâmina dura, houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos I e V, Grupos II e VI e Grupos IV e VIII. No período de 7 dias a lâmina dura se encontrava íntegra em todos os grupos avaliados, enquanto que no período de 70 dias a lâmina dura se encontrava ausente em 100% dos espécimes do grupo VI (Colágeno Recombinante Humano), 60% dos espécimes do Grupo VIII (Óxido de Zinco e Eugenol) e 40% dos espécimes do Grupo V (Proteína Óssea Morfogenética 7 Recombinante Humana associada ao Colágeno Recombinante Humano). Por outro lado, a lâmina dura se apresentava íntegra em todos os espécimes do Grupo VII (Hidróxido de Cálcio), no período de 70 dias.

Tabela 10 – Comparação entre os grupos I, II, III e IV (7 dias) e grupos V, VI, VII e VIII (70 dias), respectivamente, com relação à presença de rarefação óssea periapical

	RAREFAÇÃO ÓSSEA PERIAPICAL		P
	Ausente	Presente	
Grupo I	20	0	0,0016
Grupo V	12	8	
Grupo II	20	0	<0,0001
Grupo VI	0	20	
Grupo III	10	0	1,00*
Grupo VII	10	0	
Grupo IV	10	0	0,0054
Grupo VIII	4	6	

*= não significante ($p>0,01$)

Com relação à presença de rarefação óssea periapical, houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos I e V, Grupos II e VI e Grupos IV e VIII. No período de 7 dias não havia rarefação óssea periapical em nenhum dos grupos avaliados, enquanto que no período de 70 dias esta estava presente em 100% dos espécimes do grupo VI (Colágeno Recombinante Humano), 60% dos espécimes do Grupo VIII (Óxido de Zinco e Eugenol) e 40% dos espécimes do Grupo V (Proteína Óssea Morfogenética 7 Recombinante Humana associada ao Colágeno Recombinante Humano). Não havia áreas de rarefação óssea periapical em nenhum espécime do Grupo VII (Hidróxido de Cálcio), no período de 70 dias.

Tabela 11 – Comparação entre os grupos I, II, III e IV (7 dias) e grupos V, VI, VII e VIII (70 dias), respectivamente, com relação à presença de reabsorção radicular externa

	REABSORÇÃO RADICULAR EXTERNA		P
	Ausente	Presente	
Grupo I	20	0	1,00*
Grupo V	20	0	
Grupo II	20	0	<0,0001
Grupo VI	8	12	
Grupo III	10	0	1,00*
Grupo VII	10	0	
Grupo IV	10	0	0,0105*
Grupo VIII	7	3	

*= não significante ($p>0,01$)

Com relação à presença de reabsorção radicular externa, houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os Grupos II e VI. No período de 7 dias não havia reabsorção radicular externa em nenhum dos grupos avaliados, enquanto que no período de 70 dias esta estava presente em 60% dos espécimes do grupo VI (Colágeno Recombinante

Humano) e 30% dos espécimes do Grupo VIII (Óxido de Zinco e Eugenol). Nos Grupos V (Proteína Óssea Morfogenética 7 Recombinante Humana associada ao Colágeno Recombinante Humano) e VII (Hidróxido de Cálcio) não havia reabsorção radicular externa em nenhum dos espécimes, no período de 70 dias..

Tabela 12 – Comparação entre os grupos I, II, III e IV (7 dias) e grupos V, VI, VII e VIII (70 dias), respectivamente, com relação à presença de ponte de dentina

	PONTE DE DENTINA		P
	Presente	Ausente	
Grupo I	0	20	1,00*
Grupo V	0	20	
Grupo II	0	20	1,00*
Grupo VI	0	20	
Grupo III	0	10	0,0054
Grupo VII	6	4	
Grupo IV	0	10	1,00*
Grupo VIII	0	10	

*= não significante ($p>0,01$)

Com relação à presença de ponte de dentina, houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os Grupos III e VII. No período de 7 dias não havia presença de ponte de dentina em nenhum dos grupos avaliados, enquanto que no período de 70 dias esta estava presente em 60% dos espécimes do Grupo VII (Hidróxido de Cálcio). Nos Grupos V (Proteína Óssea Morfogenética 7 Recombinante Humana associada ao Colágeno Recombinante Humano), VI (Colágeno Recombinante Humano) e VIII (Óxido de Zinco e Eugenol) não havia ponte de dentina em nenhum dos espécimes, no período de 70 dias.

No período de 70 dias foram observadas áreas de rarefação óssea periapical sugestivas de lesão periapical nos espécimes dos Grupos V, VI e VIII. A quantificação da extensão dessas lesões foi obtida por meio da mensuração das áreas radiolúcidas para cada raiz, utilizando o programa Image J 1.28 u (National Institutes of Health – USA), sendo os valores expressos em mm^2 . Os resultados das medidas das lesões correspondentes a cada raiz de cada grupo encontram-se descritos na tabela 13.

Tabela 13 – Medida das áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical nos espécimes dos grupos V, VI, VII e VIII.

	Medida das áreas radiolúcidas (mm ²)				
Grupo V	13,61	11,06	0	0	0
	14,74	8,4	0	0	0
	6,72	5,8	0	0	0
	4,55	2,33	0	0	0
Grupo VI	25,19	20,85	17,34	6,99	2,85
	27,82	24,53	13,24	4,32	3,85
	15,32	7,47	10,23	3,37	3,78
	13,47	5,83	10,98	2,23	2,54
Grupo VII	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
Grupo VIII	6,73	3,96	3,95	0	0
	5,69	4,46	6,67	0	0

Para realização da análise estatística, as medidas das áreas de rarefação óssea periapical sugestivas de lesão periapical foram inseridas em um teste preliminar para verificar a normalidade da distribuição amostral. Como os valores apresentavam distribuição não-normal, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, ao nível de significância de 5%, para comparação das medidas das áreas radiolúcidas na região periapical entre os 4 grupos estudados (Tabela 14).

Tabela 14 – Comparação entre as médias dos postos das medidas das áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical entre os grupos V, VI, VII e VIII.

	Valores críticos ($\alpha=0,05$)	Diferenças entre médias
Grupo V Grupo VI	8,0571	19,3500
Grupo V Grupo VII	9,8679	12,3250
Grupo V Grupo VIII	9,8679	2,8750*
Grupo VI Grupo VII	9,8679	31,6750
Grupo VI Grupo VIII	9,8679	16,4750
Grupo VII Grupo VIII	11,3945	15,2000

*= não significante ($p>0,05$)

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com relação ao tamanho das áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical ($p < 0,05$). No Grupo VI (Colágeno Recombinante Humano) foi observada a presença de áreas radiolúcidas na região periapical em todos os espécimes. Por outro lado, no grupo VII (Hidróxido de Cálcio) não foram observadas áreas de rarefação óssea periapical em nenhuma das raízes.

A comparação entre os grupos evidenciou que as lesões periapicais presentes no Grupo VI (Colágeno Recombinante Humano) foram significativamente maiores que aquelas presentes nos Grupos V (Proteína Óssea Morfogenética 7 Recombinante Humana associada ao Colágeno Recombinante Humano) e VIII (Óxido de Zinco e Eugenol) ($p < 0,05$). Não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os Grupos V e VIII ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Dos animais de experimentação

Para que um material odontológico seja aplicado em seres humanos, é necessário que seja submetido a pesquisas, em diferentes níveis, cujos resultados ofereçam respaldo para sua utilização de forma eficiente e segura. Com esse objetivo existem órgãos responsáveis pela padronização e avaliação dos métodos de avaliação desses produtos os quais recomendam inicialmente a realização de testes *in vitro*. Embora sejam relativamente de baixo custo, rápidos e de fácil execução, estes testes ficam limitados às análises dos efeitos locais em células ou tecidos que estão isolados do organismo, prejudicando assim a extrapolação dos resultados para um sistema funcional (Mjör, 1994).

Em seres humanos, o efeito biológico de qualquer material para pulpotomia é avaliado, fundamentalmente, pela resposta dos tecidos pulpar e periapical, frente à utilização destes materiais. Na prática clínica, o método de avaliação dessa resposta é representado pelos sinais e sintomas clínicos e pela avaliação radiográfica. No entanto, a verdadeira resposta dos tecidos pulpar e periapical, após pulpotomia, somente poderia ser avaliada com a avulsão do elemento dental, juntamente com os tecidos periapicais de suporte, para realização do exame histopatológico (Watts e Paterson, 1992; Browne, 1994). Como esta forma de análise é inviável, torna-se essencial a utilização de um modelo animal que permita o exame microscópico das respostas celulares e teciduais, após a utilização de materiais odontológicos indicados para proteção do remanescente pulpar na técnica da pulpotomia.

Rowe (1980) salientou a necessidade de selecionar para estudo um modelo animal fisiologicamente semelhante ao homem. Para isso, o padrão mastigatório do animal, sua resistência à infecção, o tamanho e a morfologia dental deveriam ser o mais próximo aos da espécie humana. Além disso, seu padrão de crescimento deve ser semelhante ao do homem, porém rápido o suficiente para que se obtenha respostas em menores períodos de tempo.

Com esse objetivo, vários animais de experimentação têm sido testados, dentre eles o macaco, os roedores e o cão. Com relação ao processo de reparo, embora cada modelo animal tenha suas próprias particularidades e diferenças quando comparados ao homem, espécies filogenéticas inferiores, como os roedores, apresentam um alto potencial para osteogênese e dentinogênese, impossibilitando a transferência dos resultados obtidos para os seres humanos (Gonçalves et al., 2002).

Com relação aos macacos, exceto os babuínos, Torneck et al. (1973) afirmaram ser enganosa a sua semelhança com o homem, uma vez que esses animais apresentam resistência orgânica acentuadamente superior à humana, possuindo um tecido pulpar

altamente resistente aos efeitos da contaminação bucal, o que poderia levar a resultados errôneos frente aos materiais odontológicos testados.

Para o presente estudo, foi selecionado o cão, tendo em vista que este animal apresenta um processo de reparo pulpar, apical e periapical semelhante ao humano. Além disso, é de fácil obtenção e manuseio, sua manutenção em canil é viável economicamente, são animais que resistem à anestesia geral por longos períodos de tempo, e por isso tem sido o modelo animal mais empregado nos trabalhos de pesquisa biológica (Citrome et al., 1979; Nakashima, 1989; Nakashima, 1990; Nakashima, 1994; Katebzadech et al., 1999; Holland et al., 2001; Gonçalves et al., 2002; Faraco-Junior e Holland, 2004; Queiroz et al., 2005; Sorensen et al., 2005; Silva et al., 2006).

A seleção dos segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores e segundos, terceiros pré-molares superiores foi baseada no fato desses dentes possuírem semelhança anatômica entre si e apresentarem tecido pulpar de volume semelhante, facilitando assim as tomadas radiográficas. No arco superior, o quarto pré-molar não foi utilizado pelo fato de possuir 3 raízes e por ter volume pulpar bem maior que seus homônimos. Não foram utilizados os primeiros pré-molares por esses serem unirradiculares e também porque, segundo Evans e Christensen (1979), por não serem substituídos, são considerados como pertencentes à dentição decídua.

5.2 Da técnica operatória e dos materiais avaliados

Para a realização dos procedimentos experimentais, inicialmente os cães foram pré-anestesiados com solução de Rompum para reduzir a dosagem anestésica endovenosa de Tiopental Sódico e, conseqüentemente, diminuir os riscos de vômito, depressão respiratória e parada cardíaca (Barker e Lockett, 1971).

Durante o preparo da proteína óssea morfogenética tomou-se o cuidado de evitar a contaminação do material, realizando todo o procedimento em um ambiente asséptico (fluxo laminar) e utilizados criotubos, eppendorfs e material de laboratório esterilizados. Após o preparo, os materiais dos grupos I, II, V e VI foram submetidos à esterilização em óxido de etileno, uma vez que este tem sido amplamente utilizado para a esterilização de dispositivos médicos por ser considerado um meio seguro (Nakashima, 1990; Lianjia et al., 1993; Rutherford et al., 1994; Gao et al., 1995). Além disso, a elevação de temperatura durante o processo é pequena e incapaz de provocar a desnaturação de proteínas (Geiger et al., 2003).

Durante a técnica operatória, cuidados foram tomados para que o aquecimento decorrente do preparo cavitário não interferisse nos nossos resultados como descrito por

Holland et al., em 1972, que observaram, em dentes de cães, a presença de uma reação inflamatória pulpar mais intensa quando o preparo cavitário foi realizado apenas com refrigeração a ar. Desse modo, para minimizar esse problema, as cavidades foram realizadas sob refrigeração abundante com água/ar, evitando-se pressão excessiva. Para assegurar a eficiência do corte e evitar o aquecimento, a cada 4 preparos cavitários, foi utilizada uma nova ponta diamantada.

A amputação da polpa coronária foi realizada até o nível da entrada dos canais radiculares com curetas endodônticas afiadas. Segundo Assed et al. (2005), o emprego de brocas movidas em baixa rotação deve ser evitado, pois com frequência condensam raspas de dentina sobre a polpa dental. Entre outros inconvenientes, essas raspas de dentina, quando não impedem a ação do material capeador, podem incorporar-se à barreira de tecido mineralizado, formando soluções de continuidade que comprometem o sucesso após o tratamento.

O controle do sangramento foi facilmente obtido após irrigação abundante com solução de soro fisiológico esterilizado. Optamos por uma solução inerte para que os resultados não sofressem interferência das substância irrigadora. Além do controle do sangramento, a irrigação foi realizada para remoção de raspas de dentina e para impedir a formação de um coágulo sangüíneo espesso.

Schröder (1973) observou que a presença de um coágulo sangüíneo extra-pulpar reduziu a incidência de formação de ponte de dentina em 54% dos casos. Ainda, o coágulo sangüíneo, ou os produtos de sua degradação, pode agir como substrato bacteriano, atraindo microrganismos que poderiam causar infecção. De acordo com Stanley (1998), os agentes capeadores não devem ser aplicados sobre polpas com sangramento ou na presença de coágulos sangüíneos visíveis clinicamente. Quando o material é colocado sobre o sangramento, os eritrócitos oriundos dos vasos lesados se infiltram no tecido pulpar remanescente, e a subsequente hemólise dos eritrócitos pelos macrófagos pode produzir excesso de hemossiderina e infiltrado inflamatório prejudicando, retardando, ou mesmo impedindo o processo de reparo.

Os grupos experimentais foram confrontados com os grupos controle nos períodos experimentais de 7 e 70 dias, como preconizado pelo Padrão ISO 7405:1997. O controle positivo utilizado foi o Óxido de Zinco e Eugenol e o controle negativo o Hidróxido de Cálcio, aplicados no mesmo animal, com o objetivo de minimizar a influência da resistência orgânica do animal na resposta obtida e para que o material experimental fosse comparado com materiais de reações biológicas conhecidas, aumentando, assim, a confiabilidade do experimento.

Com relação às proteínas ósseas morfogenéticas, nos primeiros estudos publicados, os autores utilizavam materiais extraídos do tecido ósseo de animais (Nakashima, 1990; Lianjia et al., 1993; Gao et al., 1995). Embora tenham obtido bons resultados, atualmente existe uma grande preocupação com relação à transmissão de doenças e risco de rejeição imunológica, quando se utiliza um produto de origem animal (Hu et al., 2006). Com os avanços nas áreas da biologia celular e molecular, especificamente no campo da engenharia tecidual, tem sido possível a obtenção de proteínas puras, por meio da técnica do DNA recombinante. Esta evolução permitiu a produção das BMPs recombinantes humanas 1 a 8 em larga escala, de alta qualidade, custo reduzido e com menores riscos quando comparadas às BMPs de origem animal (Carvalho e Silva, 2004).

Entretanto, apesar desse conhecimento, os autores continuam utilizando como agente carreador o colágeno de origem animal. Percebe-se, então, que existe uma contradição quando os autores afirmam que dentre as vantagens do material experimental em seu estudo está a utilização de uma BMP pura, com risco reduzido de transmissão de doenças. Em 2002, Silva et al. afirmaram que ainda não existia um carreador adequado para as BMPs, uma vez que a utilização da matriz colagênica, carreador mais comum nos diferentes estudos, poderia levar à transmissão de doenças e elicitar a resposta imune do hospedeiro. Deste modo, propusemos este trabalho com o objetivo de avaliar a resposta dos tecidos pulpar e periapical de dentes de cães após pulpotomia e proteção do remanescente pulpar com a Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 (rHuBMP-7) associada a um colágeno (rHuCollagen) também obtido pela técnica do DNA recombinante, ou seja, uma combinação proteína-carreador pura.

As rHuBMPs 2, 4 e 7 têm sido amplamente empregadas nos estudos que avaliam a resposta do tecido pulpar após capeamento e têm mostrado resultados promissores. Como não existem estudos que avaliaram a biocompatibilidade da proteína óssea morfogenética 7 recombinante humana, após pulpotomia em dentes de cães, seguindo o Padrão ISO 7405:1997 nos períodos experimentais de 7 e 70 dias, selecionamos esta proteína para uso no presente estudo.

Com relação à quantidade necessária de proteína para a indução da formação de ponte de dentina, acreditava-se que esta fosse dose-dependente. Assim, foram utilizadas, nos diferentes estudos, concentrações variando de 1,5µg a 50µg de BMP por miligrama de carreador (Rutherford et al., 1993, 1994; Nakashima, 1994; Rutherford e Gu, 2000; Six et al., 2002) ou até mesmo 200µg a 3 mg de BMP pura (Nakashima, 1990; Lianjia et al., 1993; Gao et al., 1995), com o objetivo de obter a concentração ideal. Por meio destes estudos foi estabelecido que dosagens superiores a 2,5µg de BMP por miligrama de carreador não

aumentam a quantidade de dentina reparadora formada, sendo esta concentração considerada suficiente para estimular a proliferação e diferenciação celular na polpa, bem como induzir a formação de ponte de dentina. Dessa maneira, no presente estudo, utilizamos a dosagem de 2,5µg de rHuBMP-7 por mg de colágeno.

O colágeno recombinante humano (rHuCollagen) puro foi empregado neste estudo como controle do material experimental, uma vez que existe uma controvérsia na literatura sobre a real capacidade do colágeno em induzir a deposição de tecido mineralizado (Carmichael et al., 1974; Dick e Carmichael, 1980; Nakashima, 1994; Rutherford et al., 1993, 1994; Six et al., 2002; Silva et al., 2006). Dessa maneira, julgamos importante avaliar, se a formação de ponte de dentina, caso estivesse presente, era ocasionada pela proteína óssea morfogenética 7 (rHuBMP-7) ou pelo colágeno (rHuCollagen).

5.3 Dos resultados

5.3.1 Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 (rHuBMP-7) associada ao Colágeno Recombinante Humano (rHuCollagen) – Grupos I e V

As proteínas ósseas morfogenéticas são moduladores biológicos identificados durante a odontogênese e, posteriormente, clonadas para aplicação experimental e clínica (Britto et al., 2002). Têm sido descritas na literatura como materiais promissores para terapias conservadoras do tecido pulpar, uma vez que são capazes de induzir a deposição de dentina reparadora, sem agredir o tecido pulpar em contato (Nakashima, 1990; Lianjia et al., 1993; Rutherford et al., 1993, 1994; Nakashima, 1994; Gao et al., 1995; Jepsen et al., 1997; Rutherford e Gu, 2000; Six et al., 2002; Goldberg et al., 2003).

Os trabalhos existentes na literatura têm mostrado que as proteínas ósseas morfogenéticas são capazes de induzir a formação de ponte de dentina após proteção pulpar direta (Rutherford et al., 1993; Rutherford et al., 1994; Jepsen et al., 1997) ou pulpotomia (Nakashima, 1990; Nakashima, 1994; Lianjia et al., 1993; Rutherford e Gu, 2000).

No presente estudo, no período experimental de 7 dias após a pulpotomia e recobrimento do remanescente pulpar com a proteína óssea morfogenética 7 recombinante humana associada ao colágeno recombinante humano, o tecido pulpar apresentava sinais de inflamação severa, restos do material aplicado sobre o tecido pulpar e extravasamento de hemácias, resultados estes divergentes dos obtidos por Nakashima (1990), Lianjia et al. (1993) e Six et al. (2002), que observaram apenas um infiltrado inflamatório suave em contato com o material protetor. Embora não tenham analisado as regiões apical e

periapical, as mesmas, em nosso estudo, estavam normais e com ausência de células inflamatórias e ausência de reabsorção de tecidos mineralizados.

Com relação aos parâmetros radiográficos avaliados, não foi possível identificar alterações em nenhum espécime, estando a lâmina dura íntegra em todos os casos, não sendo detectadas também reabsorções radiculares nem áreas de rarefação óssea periapical. Assim, de acordo com os resultados radiográficos e histopatológicos observados no Grupo I, pode-se inferir que a Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 associada ao Colágeno Recombinante Humano, no período de 7 dias, ocasionou alterações restritas à área de contato com o tecido pulpar.

Contrariamente, período de 70 dias, na ausência de bactérias, foi observada necrose do tecido pulpar e ausência de ponte de dentina em todos os espécimes. A região periapical apresentava-se alterada, com presença severa de células inflamatórias, formação de abscesso e reabsorção de tecidos mineralizados. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Oliveira (2004), que não observou formação de ponte de dentina após proteção pulpar direta em dentes de macacos, utilizando a proteína óssea morfogenética derivada da matriz dentinária de coelhos. A autora atribuiu esse resultado à temperatura inadequada de conservação da proteína (25°C), tendo em vista que idealmente esta deveria ser mantida a -20°C com o objetivo de evitar a degradação dos fatores ativos da matriz. Entretanto, no presente estudo, esta interferência pode ser descartada, uma vez que o material foi mantido em freezer a -20°C até o momento de ser aplicado sobre o tecido pulpar.

Resultados insatisfatórios também foram relatados por Stroppa (2003), que utilizou um *pool* de BMPs associadas à hidroxiapatita, após pulpotomia em dentes decíduos de cães. Decorridos 45 dias, foi observada necrose do tecido pulpar em todos os espécimes, presença de infiltrado inflamatório crônico e células clásticas, sendo estes resultados divergentes com relação àqueles existentes na literatura. Nakashima, em 1990, observou presença de ponte de dentina 8 semanas após pulpotomia e utilização da proteína óssea morfogenética em dentes de cães. A autora relatou que o tecido mineralizado neoformado era composto por osteodentina e dentina tubular com células alinhadas semelhantes a odontoblastos e processos citoplasmáticos se estendendo para o interior dos túbulos dentinários. Lianjia et al. (1993) observaram ausência de inflamação no tecido pulpar e deposição de tecido mineralizado obliterando a exposição pulpar, duas semanas após pulpotomia e utilização da proteína óssea morfogenética em dentes de cães. Resultados semelhantes foram obtidos por Nakashima (1994), Gao et al. (1995), Jepsen et al. (1997), Rutherford et al. (1993), Rutherford e Gu (2000) e Six et al. (2002).

As diferenças nos resultados obtidos no presente estudo, quando comparados com a literatura, possivelmente estão relacionadas ao carreador utilizado, ou seja, ao Colágeno Recombinante Humano, o qual pode ter influenciado na biocompatibilidade da Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7. Este material não se mostrou biocompatível quando utilizado isoladamente (Grupos II e VI), tendo em vista que nos espécimes protegidos com o colágeno observou-se uma resposta inflamatória severa no tecido pulpar, no período de 7 dias e áreas extensas de necrose, dissociação fibrilar e ausência quase total de células no período de 70 dias.

É importante ressaltar que provavelmente as respostas pulpar e periapical obtidas nos períodos de 7 e 70 dias não foram influenciadas pela presença de microrganismos, uma vez que lâminas intermediárias de cada série foram coradas pelo método de Brown & Brenn, não sendo evidenciados microrganismos em nenhum espécime.

5.3.2 Colágeno Recombinante Humano (rHuCollagen) – Grupos II e VI

O colágeno é um biomaterial amplamente utilizado em Odontologia, uma vez que tem mostrado propriedades interessantes, quando empregado para confecção de membranas periodontais reabsorvíveis e na recuperação de defeitos ósseos (Cirelli et al., 1997; Gabrielli et al., 2001). Os diferentes tipos de colágeno existentes apresentam propriedades como biocompatibilidade, interação progressiva com os tecidos, baixa resposta inflamatória, biodegradabilidade controlada, disponibilidade, abundância na natureza e capacidade hemostática (Cirelli et al., 1997; Rocha et al., 2002; Geiger et al., 2003).

O colágeno tem sido proposto também com o objetivo de estimular a formação de ponte de dentina após proteção pulpar direta ou pulpotomia (Dick e Carmichael, 1980; Nevins et al., 1980; Bimstein e Shoshan, 1981). No tecido pulpar, teoricamente, a porosidade do colágeno permitiria a infiltração de células pulpares mesenquimais e, posteriormente, a mineralização. A armação colagênica em três dimensões formada seria reconhecida pelas células e utilizada como um arcabouço para início ao processo de reparo (Dick e Carmichael, 1980; Gabrielli et al., 2001).

Por outro lado, alguns autores consideram que embora o colágeno seja um excelente arcabouço natural para proteínas não-colagênicas, se a matriz de colágeno for utilizada isoladamente, a mesma não seria capaz de induzir mineralização (Rutherford et al., 1993; Nakashima, 1994; Goldberg et al., 2001, 2003). Dessa maneira, o material tem sido utilizado como veículo para as proteínas ósseas morfogenéticas (Rutherford et al., 1993, 1994; Jepsen et al., 1997; Six et al., 2002), possibilitando a liberação lenta e controlada da BMP (Geiger et al., 2003; Nakashima e Reddi, 2003).

Acreditamos que a falta de padronização dos materiais utilizados nos diferentes estudos, quanto à composição e processamento do colágeno, tem levado a esses resultados conflitantes, uma vez que na literatura específica observa-se relatos incluindo desde necrose do tecido pulpar (Six et al., 2002; Silva et al., 2006) até a formação de ponte de dentina (Dick e Carmichael, 1980; Nevins et al., 1980; Bimstein e Shoshan, 1981). Uma real comparação entre os resultados do presente estudo (Grupos II e VI), com outros da literatura específica torna-se impossibilitada, tendo em vista que utilizamos um colágeno recombinante humano puro, enquanto que os outros estudos utilizaram colágeno de pericárdio bovino (Silva et al., 2006) ou colágeno enriquecido com nutrientes celulares (Bimstein e Shoshan, 1981), glutaraldeído (Dick e Carmichael, 1980) ou fosfato de cálcio (Nevins et al., 1980).

Em nosso estudo, no período de 7 dias, após pulpotomia e utilização do Colágeno Recombinante Humano, o tecido pulpar apresentava sinais de inflamação severa e ausência de ponte de dentina. À distância do material, foi observada intensa proliferação vascular, hemorragia severa e áreas de necrose nessa região. A resposta inflamatória foi semelhante à relatada por Six et al. (2002), que observaram que as polpas protegidas com colágeno apresentavam infiltrado inflamatório variando de leve a severo, formação de abscesso e, próximo à região da exposição, havia a presença de vasos sanguíneos dilatados.

No período experimental de 70 dias, nossos resultados evidenciaram ausência de ponte de dentina, com o remanescente pulpar desintegrado ou ausente e com áreas extensas de necrose. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Six et al. (2002), que observaram infiltrado inflamatório de moderado a severo, com formação de abscesso e ausência de bactérias 28 dias após proteção pulpar direta com colágeno. Rutherford et al. (1993), Rutherford et al. (1994) e Rutherford e Gu (2000) também observaram presença de necrose pulpar, em dentes capeados com colágeno de origem bovina.

Radiograficamente foi observada ausência de integridade da lâmina dura e áreas de rarefação óssea periapical em todos os espécimes do Grupo VI, sendo estas lesões extensas e estatisticamente maiores que aquelas presentes nos Grupos V (Proteína Óssea Morfogenética 7 Recombinante Humana associada ao Colágeno Recombinante Humano) e VIII (Óxido de Zinco e Eugenol) ($p < 0,05$). Embora tenha sido detectado radiograficamente presença de reabsorção externa em 60% dos casos, na avaliação histopatológica foi observada presença de reabsorção de cimento e osso alveolar em todos os espécimes.

Junto ao ápice radicular foi observada a presença de reação periapical, com grande quantidade de células inflamatórias e áreas de reabsorção não reparadas na superfície do cimento e osso alveolar. Silva et al. (2006) também observaram necrose pulpar e presença

de reação periapical em dentes de cães, após pulpotomia e proteção do remanescente pulpar com colágeno bovino aniônico liofilizado associado ou não à hidroxiapatita.

Dessa maneira, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o Colágeno Recombinante Humano não se mostrou um material satisfatório para ser empregado sobre o tecido pulpar exposto.

5.3.3 Hidróxido de Cálcio

Embora a primeira tentativa de capeamento pulpar tenha sido efetuada por Phillip Pfaff em 1756, quando colocou uma pequena lâmina de ouro, cuidadosamente adaptada sobre a exposição pulpar, foi com a introdução por Hermann em 1920, de uma formulação contendo hidróxido de cálcio chamada *Calxyl*, que o sucesso dos capeamentos pulparez tornou-se realidade. Desde então, este tem sido o material mais aceito para esta finalidade (Glass e Zander, 1949; Andreasen e Andreasen, 2001; Hörsted-Bindslev et al., 2003; Accorinte et al., 2005; Assed et al., 2005; Farhad e Mohammadi, 2005; Queiroz et al., 2005; Silva et al., 2006).

Em função de suas propriedades biológicas satisfatórias, o hidróxido de cálcio tem sido utilizado em diversos procedimentos clínicos, incluindo proteções pulparez (Aeinehchi et al., 2003; Mestrener et al., 2003; Accorinte et al., 2005; Queiroz et al., 2005), pulpotomias de dentes permanentes (Assed et al., 1997; Nosrat e Nosrat, 1998) ou decíduos (Rangel et al., 1998; Ranly e Garcia-Godoy, 2000; Carrote, 2005), tratamento endodôntico de dentes permanentes com rizogênese incompleta (Leonardo et al., 1993; Silva et al., 2005), como cimento obturador de canais radiculares (Leonardo et al., 1997; Silva et al., 1997), em casos de reabsorções dentárias (Andreasen e Andreasen, 2001) e como curativo de demora entre sessões (Leonardo, 2005).

No presente estudo foi utilizada uma pasta de hidróxido de cálcio p.a. veiculado em soro fisiológico sobre o remanescente pulpar, após a realização da pulpotomia. Optamos por utilizar o hidróxido de cálcio p.a. em solução aquosa pois, de acordo com a literatura, pastas à base de hidróxido de cálcio solúveis em água promovem maior índice de formação barreira de tecido mineralizado (Holland et al., 1980; Holland et al., 1981).

No período de 7 dias, o tecido pulpar adjacente ao material apresentava um infiltrado inflamatório leve e aumento no número de vasos. Estes resultados também foram obtidos por Six et al. (2002) que observaram infiltrado inflamatório suave a moderado em contato com o material e a presença de células polarizadas, dispostas em paliçada, envolvidas na deposição de matriz e formação de uma ponte de dentina fina no estágio inicial.

No período de 70 dias, foi observada ponte de dentina obliterando a exposição pulpar em todos os espécimes, estando a camada odontoblástica e tecido conjuntivo íntegros. Nas regiões apical e periapical o cimento era regular, o ligamento periodontal apresentava tecido conjuntivo denso, ausência de células inflamatórias e intensa presença de fibras colágenas e o osso alveolar apresentava elevada presença de osteoblastos em sua superfície.

Esses resultados estão de acordo com vários trabalhos descritos na literatura que utilizaram o hidróxido de cálcio como material de escolha para proteção pulpar e pulpotomia, e observaram padrão de normalidade após o procedimento (Holland et al., 1979; Holland et al., 1980; Holland et al., 1981; Sübay et al., 1993; Nosrat e Nosrat, 1998; Accorinte et al., 2005; Queiroz et al., 2005; Silva et al., 2006).

Os resultados favoráveis obtidos com a aplicação do hidróxido de cálcio sobre o tecido pulpar se devem às inúmeras propriedades satisfatórias desse material, amplamente descritas na literatura, dentre elas a biocompatibilidade (Queiroz et al., 2005), atividade antibacteriana (Foreman e Barnes, 1990; Leonardo et al., 1999) e propriedade higroscópica (Leonardo, 2005).

A formação de ponte de dentina é considerada um dos principais indicadores de sucesso após pulpotomia e o mecanismo pelo qual esta se forma tem sido motivo de pesquisa por vários anos (Glass e Zander, 1949; Schröder e Granath, 1971; Schröder, 1985; Oguntebi et al., 1993; Andreasen e Andreasen, 2001).

Assim, a camada de necrose funciona, então, como uma superfície na qual as células pulpares se aderem e, subsequente, polarizam-se. Essas células sofrem diferenciação, passando a expressar marcadores intra-celulares próprios da diferenciação odontoblástica (Seux et al., 1991).

As reações pulpares observadas após a proteção com hidróxido de cálcio iniciam-se com alterações inflamatórias em nível vascular e celular, seguidas pela ocorrência do processo de reparo, que inclui a migração e proliferação de células mesenquimais e endoteliais e a formação de colágeno. Inicia-se então, a mineralização do colágeno recém formado, sendo importante a presença de íons cálcio, proveniente do material para o início do processo, tendo em vista que esses íons combinam-se com o gás carbônico do tecido, originando a camada de carbonato de cálcio. Esse carbonato de cálcio precipitado na área lesada forma uma camada de granulações cálcicas, que estimula a produção de tecido pulpar subjacente, de granulações mais finas de sais de cálcio (provenientes do organismo), as quais atuam "rejuntando" as granulações de carbonato de cálcio precipitadas. Essa barreira de granulações induz a diferenciação das células mesenquimais do tecido pulpar em odontoblastos, que passam a depositar dentina (Schröder, 1985).

Schröder e Granath, em 1971, demonstraram que após a aplicação do hidróxido de cálcio sobre o tecido pulpar exposto, ocorre formação de uma área definida de necrose superficial, auto-limitante, considerada benéfica por causar uma leve irritação, a qual estimula a polpa à defesa e reparo, tendo em vista que quando um material, tal como o Teflon, é colocado em contato com o tecido pulpar, não se observa formação de tecido mineralizado. Além disso, essa zona de necrose separa o material do remanescente pulpar vital, evitando a extensão da lesão tecidual.

No presente estudo, embora a formação de ponte de dentina tenha sido detectada radiograficamente em 60% dos casos, na avaliação histopatológica estava presente em todos os espécimes. Essa diferença ocorre em função das limitações do exame radiográfico, principalmente em dentes superiores, para confirmar a presença de ponte da dentina. Outro fator a ser considerado é que algumas vezes a barreira existe, porém sem espessura e densidade suficientes para a constatação radiográfica (Assed et al., 2005).

Os resultados por nós obtidos, do ponto de vista histopatológico e radiográfico, confirmam as excelentes propriedades biológicas do hidróxido de cálcio, quando utilizado após pulpotomia.

5.3.4 Óxido de Zinco e Eugenol

Embora o eugenol venha sendo amplamente utilizado em Odontologia, incorporado a diversos materiais, essa substância pode ocasionar danos aos tecidos em função de sua citotoxicidade, a qual desencadeia a degeneração do tecido mucoso e morte de fibroblastos, além de dermatite de contato e reação alérgica (Barkin et al., 1984; Sarraimi et al., 2002). O eugenol, na dependência da concentração empregada, é capaz de inibir a respiração, divisão celular e até causar a morte das células (Hume, 1986; Markowitz et al., 1992).

Utilizamos o óxido de zinco e eugenol como controle positivo neste estudo, uma vez que de acordo com a literatura consultada e as recomendações da ISO 7405:1997, este material em contato com o tecido pulpar ocasiona histologicamente reação inflamatória variando de crônica a pulpíte supurativa aguda, com presença de linfócitos e polimorfonucleares (Zander et al., 1949; Berger, 1965; Watts e Paterson, 1987; Holland et al., 1981; Fadavi e Anderson, 1996; Silva et al., 2006).

De forma global, os resultados insatisfatórios obtidos com o óxido de zinco e eugenol no período de 70 dias, em nosso trabalho, estão de acordo com a literatura (Holland et al., 1981; Watts e Paterson, 1987; Fadavi e Anderson, 1996; Silva et al., 2006), uma vez que foi evidenciada ausência de formação de ponte de dentina, infiltrado inflamatório moderado no

tecido pulpar, espessura do ligamento periodontal moderadamente ampliada e reabsorção do cimento e tecido ósseo.

Fadavi e Anderson (1996) observaram, 6 semanas após pulpotomia e utilização do óxido de zinco e eugenol, a presença de necrose total do tecido pulpar em quase todos os espécimes. Nos dentes com necrose parcial, havia a presença de um infiltrado inflamatório severo, interrupção da camada odontoblástica e ausência de formação de ponte de dentina. Radiograficamente os autores observaram áreas radiolúcidas sugestivas de lesão periapical crônica em 66,6% dos casos, resultado semelhante ao obtido no presente estudo, uma vez que encontramos áreas de rarefação óssea periapical em 60% dos casos.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e considerando os resultados obtidos pela análise histopatológica e radiográfica, pôde-se concluir que, para capeamento pulpar após pulpotomia:

1. A Proteína Óssea Morfogenética Recombinante Humana 7 (rHuBMP-7) associada ao Colágeno Recombinante Humano não mostrou resposta tecidual satisfatória e capacidade dentinogênica.
2. Dentre os materiais avaliados, o hidróxido de cálcio foi o único que apresentou resposta tecidual favorável.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

AAPD. Reference Manual 2000-2001. Guidelines for pulp therapy for primary and young permanent teeth. *Pediatr Dent* 2000;22:67-70.

Accorinte MLR, Loguercio AD, Reis A, Muench A, Araújo VC. Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system. *Dent Mater* 2005;21:599-607.

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

Andelin WE, Shabahang S, Wright K, Torabinejad M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. *J Endod* 2003;29:646-50.

Andreasen JO, Andreasen FM. Texto e atlas colorido de traumatismo dental. 3 ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2001.

Assed S, Leonardo MR, Silva LAB, Nelson-Filho P, Pinto DMG. Calcium hydroxide pulpotomy in young permanent teeth with periapical involvement. *Braz Endod J* 1997;2:38-42.

Assed S, Silva LAB, Nelson-Filho P. Pulpotomia em dentes decíduos e permanentes jovens. In: Assed S. *Odontopediatria: bases científicas para a prática clínica*. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p.571-612.

Barker BC, Lockett BC. Utilization of the mandibular premolars of the dog for endodontic research. *Aust Dent J* 1971;16:280-6.

Barkin ME, Bloyd J, Cohen S. Acute allergic reaction to eugenol. *Oral Surg* 1984;57:441-2.

* *Normas internas do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP-USP (2003), de acordo com o International Comittee of Medicals Journals Editors. Uniform Requirements for manuscripts submitted to Medical Journal, 1997. Disponível em: <http://www.mja.com.au/public/information/uniform.html>. Acesso em 2 de outubro de 2005.*

- Berger JE. Pulp tissue reaction to formocresol and zinc oxide-eugenol. *J Dent Child* 1965;32:13-28.
- Bimstein E, Shoshan S. Enhanced healing of tooth-pulp wounds in the dog by enriched collagen solution as a capping agent. *Arch Oral Biol* 1981;26:97-101.
- Britto LR, Jiang J, Vertucci FJ. The role of biological modulators in endodontic therapy. *Rev Fac Odontol Bauru* 2002;10:201-8.
- Browne RM. The vitro assessment of the citotoxicity and dental materials – does it have a role? *Int Endod J* 1994;21:50-8.
- Carmichael DJ, Dick HM, Dodd CM. Histologic effects of antigenically altered collagen as a heterograft for mammalian pulp exposures. *Archs Oral Biol* 1974;19:1121-6.
- Carrotte P. Endodontic treatment for children. *Br Dent J* 2005;198:9-15.
- Carvalho LR, Silva MF. Proteínas ósseas morfogenéticas: aplicação no processo de reparação do complexo dentina polpa. *UFES Rev Odontol* 2004;6:34-40.
- Caúla AL, Machado F, Barboza E. O potencial da proteína óssea morfogenética humana recombinante-2 (rhBMP-2) na regeneração óssea. *RBO* 1999;56:185-91.
- Cirelli JA, Marcantonio-Júnior E, Marcantonio RAC, LIA RCC, Goissis G, Rossa-Júnior C. Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of Class II furcation lesions: an histometric analysis in dogs. *Biomaterials* 1997;18:1227-34.
- Citrome GP, Kaminsky EJ, Heuer MA. A comparative study of tooth apexification in the dog. *J Endod* 1979;5:207-9.
- Cordeiro RCL, Leonardo MR, Silva LAB, Cerri PS. Desenvolvimento de um dispositivo para padronização de tomadas radiográficas em cães. *RPG* 1995;2:138-40.
- Cvek M. A clinical report on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. *J Endod* 1978;4:232-7.

- Dick HM, Carmichael DJ. Reconstituted antigen-poor collagen preparations as potential pulp-capping agents. *J Endod* 1980;6:641-4.
- Evans HE, Christensen G. The digestive apparatus and abdomen. In: Miller's anatomy of the dog. Philadelphia: Saunders; 1979. p. 411-506.
- Fadavi S, Anderson AW. A comparison of the pulpal response to freeze-dried bone, calcium hydroxide, and zinc oxide-eugenol in primary teeth in two cynomolgus monkeys. *Pediatr Dent* 1996;18:52-6.
- Faraco-Junior IM, Holland R. Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* 2004;15:104-8.
- Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J* 2005;55:293-301.
- Foreman PC, Barnes IE. A review of calcium hydroxide. *Int Endod J* 1990;23:283-97.
- Fuks AB, Jones PC, Michaeli Y, Bimstein E. Pulp response to collagen and glutaraldehyde in pulp-tomized primary teeth of baboons. *Pediatr Dent* 1991;13:142-50.
- Gabrielli MAC, Marcantonio-Júnior E, Góssis G, Okamoto T, Gabrielli MFR, Vieira EH. Hydroxylapatite implants with or without collagen in the zygomatic arch of rats: histological study. *Braz Dent J* 2001;12:9-15.
- Gao Y, Fang R, Suwa F, Yoshida S, Yang L, Tanaka A. Induction of reparative dentin formation in dogs by bovine bone morphogenetic protein bound to ceramic dentin. *J Osaka Dent Univ* 1995;29:29-38.
- Geiger M, Li RH, Friess W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1613-29.
- Glass RL, Zander HA. Pulp healing. *J Dent Res* 1949;28:97-107.
- Goldberg M, Six N, Decup F, Buch D, Soheili-Majd E, Lasfargues JJ, Salih E, Stanislawski L. Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res* 2001;15:91-5.

Goldberg M, Six N, Decup F, Lasfargues JJ, Salih E, Tompkins K, Veis A. Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *Am J Dent* 2003;16:66-76.

Gonçalves EAL, Catanzaro-Guimarães SA, Garcia RB. Proteína morfogenética óssea: terapêutica molecular no processo de reparo tecidual. *Rev Odontol Univ São Paulo* 1998;12:299-304.

Gonçalves EAL, Pavan AJ, Tavano O, Guimarães SAC. Atividade morfogenética da matriz dentinária desmineralizada: estudo em cães. *Rev Fac Odontol Bauru*;2002;10:51-6.

Gu K, Smoke Rh, Rutherford RB. Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1996;41:919-23.

Hermann BW. Dentinobliteration der Wurzelkanäle nach Behandlung mit Calzium. *Zahnärztl Rundschau* 1930;39:888-98.

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

Holland R, Souza V, Mello W, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni-Filho JA. Healing process of dogs' dental pulp after pulpotomy and protection with calcium hydroxide or Dycal®. *Rev Fac Odont UNESP* 1980;9:67-70.

Holland R, Souza V, Mello W, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni-Filho JA. The influence of the sealing material in the healing process of inflamed pulps capped with calcium hydroxide or zinc oxide-eugenol cement. *Acta Odontol Pediatr* 1981;2:5-9.

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

Holland R, Takayama S, Komatsu J, Russo M, Sakaki T, Holland-Junior C. Pulpal response to high speed cavity preparation using water or air spray as coolants. *J Nihon Univ Sch Dent* 1972;14:16-21.

Horsted-Bindslev P, Vilkinis V, Sidlauskas A. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:591-600.

Hotz G, Herr G. Bone substitute with osteoinductive biomaterials - current and future clinical applications. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994;23:413-7.

Hu CC, Zhavg C, Qian G, Tatum N. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod* 1998;24:744-51.

Hu K, Lv Q, Cui FZ, Feng QL, Kong XD. Biocompatible fibrin blended films with recombinant human like collagen for hepatic tissue engineering. *J Bioactive Compatible Polymers* 2006;21:23-37.

Hume WR. The pharmacologic and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. *J Am Dent Assoc* 1986;113:789-91.

International Organization for Standardization (ISO). ISO 7405: Dentistry – Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – Test methods for dental materials. Switzerland; 1997.

Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakashima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res* 2004;83:590-5.

Jepsen S, Albers HK, Fleiner B, Tucker M, Rueger D. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. *J Endod* 1997;23:378-82.

Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. *J Endod* 1999;25:364-8.

Kimura Y, Yonaga K, Yokoyama K, Watanabe H, Wang X, Matsumoto K. Histopathological changes in dental pulp irradiated by Er:YAG laser: a preliminary report on laser pulpotomy. *J Clin Laser Med Surg* 2003;21:345-50.

Leonardo MR, Silva LAB, Leonardo RT, Utrilla LS, Assed S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod* 1993;19:348–52.

Leonardo MR, Silva LAB, Leonardo RT. Devemos usar medicação intracanal no tratamento de dentes com necrose pulpar? In: *Odontologia Integrada – Atualização multidisciplinar para o clínico e o especialista*. Rio de Janeiro: Editora Pedro Primeiro Ltda; 1999. p.179-95.

Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS, Assed S, Ether SS. Calcium hydroxide root canal sealers: histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *J Endod* 1997;23:428-32.

Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares. Princípios técnicos e biológicos*. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

Lianja Y, Yuhao G, White FH. Bovine bone morphogenetic protein-induced dentinogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 1993;295:305-12.

Maia-Campos G. Programa GMC: pesquisa biológica. Versão 2002. Disponível em <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.html>. Acesso em 5 de janeiro de 2006.

Markowitz K, Moynihan M, Liu M, Kim S. Biologic properties of eugenol and zinc-oxide eugenol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73:729-37.

Mestrener SR, Holland R, Dezan-Junior E. Influence of age on the behavior of dental pulp of dog teeth after capping with an adhesive system or calcium hydroxide. *Dent Traumatol* 2003;19:255-61.

Missana L, Noriyuki N, Kuboki Y. Comparative histological studies of bone and cartilage formations induced by various BMP-carrier composites. *Jpn J Oral Biol* 1994;36:9-19.

Mjör IA. Biological assessment of dental materials in Europe 1993 - recommendations and regulations. *J Dent* 1994;22:3-5.

Nakamura Y, Slaby I, Matsumoto K, Ritchie HH, Lyngstadaas SP. Immunohistochemical characterization of rapid dentin formation induced by enamel matrix derivative. *Calcif Tissue Int* 2004;75:243-52.

Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nature Biotechnology* 2003;21:1025-32.

Nakashima M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine Growth Factor Review* 2005;16:369-76.

Nakashima M. Dentin induction by implants of autolyzed antigen-extracted allogeneic dentin on amputated pulps of dogs. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:279-86.

Nakashima M. Induction of dentine formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic protein (BMP) -2 and -4. *J Dent Res* 1994;73:1515-22.

Nakashima M. Mitogenic and dentin-induction effects of crude bone morphogenetic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73:484-9.

Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. *Arch Oral Biol* 1990;35:493-7.

Nevins AJ, La-Porta RF, Borden BG, Spangberg LS. Pulpotomy and partial pulpectomy procedures in monkey teeth using cross-linked collagen-calcium phosphate gel. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;49:360-5.

Nosrat IV, Nosrat CA. Reparative hard tissue formation following calcium hydroxide application after partial pulpotomy in cariously exposed pulps of permanent teeth. *Int Endod J* 1998;31:221-6.

Oguntebi B, Clark A, Wilson J. Pulp capping with Bioglass® and autologous demineralized dentin in miniature swine. *J Dent Res* 1993;72:484-9.

Oliveira MF. Resposta de polpas capeadas com proteínas bioativas ou hidróxido de cálcio submetidas ou não, à ação do laser. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP; 2004.

Olsson H, Davies JR, Holst KE, Schröer U, Petersson K. Dental pulp capping: effect of Endogain Gel on experimentally exposed human pulps. *Int Endod J* 2005;38:186-94.

Queiroz AM, Assed S, Leonardo MR, Nelson-Filho P, Silva LAB. MTA and calcium hydroxide for pulp capping. *J Appl Oral Sci* 2005;13:126-30.

Rangel SR, Leonardo MR, Silva LAB, Assed S, Nelson-Filho P. Evaluación clínica y radiográfica de dientes deciduos sometidos a la técnica de pulpotomia con hidróxido de calcio. *Vida y Salud* 1998;5:18-21.

Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent* 2000;28:153-161.

Ranly DM. Pulpotomy therapy in primary teeth: modalities for old rationales. *Pediatr Dent* 1994;16:403-9.

Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials* 2002;23:449-56.

Rowe AH. Problems of intracanal testing of endodontic materials. *Int Endod J* 1980;13:96-103.

Russo MC. Terapia pulpar de dentes decíduos posteriores. In: 6º Livro Anual do Grupo Brasileiro de Professores de Ortodontia e Odontopediatria. São Paulo: Image; 1997. p.203-8.

Rutherford RB, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7. *Eur J Oral Sci* 2000;108:202-6.

Rutherford RB, Spangberg L, Tucker M, Rueger D, Charette M. The time-course of the induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 1994;39:833-8.

Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 1993;38:571-6.

Rutherford RB. BMP-7 gene transfer to inflamed ferret dental pulps. *Eur J Oral Sci* 2001;109:422-4.

Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod* 2004;30:205-8.

Salako N, Joseph B, Ritwik P, Salonen J, John P, Junaid TA. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. *Dent Traumatol* 2003;19:314-20.

Sarrami N, Pemberton MN, Thronhil MH, Theaker ED. Adverse reactions associated with the use of eugenol in Dentistry. *Br Dent J* 2002;193:257-9.

Sasaki H, Ogawa T, Koreeda M, Ozaki T, Sobue S, Ooshima T. Electrocoagulation extends the indication of calcium hydroxide pulpotomy in the primary dentition. *J Clin Pediatr Dent* 2002;26:275-7.

Sato K, Urist MR. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. *Clin Orthop Relat Res* 1985;197:301-11.

Schröder U, Granath LE. Early reaction of intact human teeth to calcium hydroxide following experimental pulpotomy and its significance to the development of hard tissue barrier. *Odont Revy* 1971;22:379-96.

Schröder U. Effects of an extra-pulpal blood clot on healing following experimental pulpotomy and capping with calcium hydroxide. *Odont Revy* 1973;24:257-69.

Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing-pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. *J Dent Res* 1985;64:541-8.

Seux D, Couble ML, Hartmann JP, Gauthier JP, Magloire H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol* 1991;36:117-28.

Silva JJ, Pereira BCCF, Barros-Neta MAC. Contribuição ao estudo da proteína óssea morfogenética. *Rev Fac Odontol Porto Alegre* 2002;43:23-6.

Silva LAB, Assed S, Silva FWGP. Rizogênese incompleta. In: Assed S. *Odontopediatria: bases científicas para a prática clínica*. Artes Médicas: São Paulo; 2005. p.741-68.

Silva LAB, Leonardo MR, Faccioli LH, Figueredo F. Inflammatory response to calcium hydroxide based root canal sealers. *J Endod* 1997;23:86-90.

Silva LAB, Leonardo MR, Nelson-Filho P, Medeiros AS, Rossi MA. Pulp response of anionic lyophilized collagen matrix with or without hydroxyapatite after pulpotomy in dog's teeth. *Mat Res* 2006. In Press.

Six N, Lasfargues JJ, 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). *Arch Oral Biol* 2002;47:177-87.

Sorensen RG, Polimeni G, Kinoshita A, Wozney JM, Wikesjö UME. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-12 (rhBMP-12) on regeneration of periodontal attachment following tooth replantation in dogs. A pilot study. *J Clin Periodontol* 2004;31:654-661.

Souza-Gugelmin MCM, Lima SNM, Lima CDL, Jacobovitz M, Ito IY. Biossegurança: controle de infecção na Odontologia. In: Leonardo MR. *Endodontia: tratamento de canais radiculares: princípios técnicos e biológicos*. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p.365-406.

Stanley HR. Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping studies. *J Am Dent Assoc* 1998;11:17-34.

Stroppa SC. Análise microscópica da resposta do complexo dentino-pulpar em pulpotomia de dentes decíduos de cães com o uso da proteína morfogenética óssea (BMP). Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru – USP; 2003.

Sübay RK, Asci S. Human pulp response to hydroxyapatite and a calcium hydroxide material as direct capping agents. *Oral Med Oral Pathol* 1993;80:330-7.

Torneck CO, Smith JS, Grindall P. Biologic effects of endodontics procedures on developing incisor teeth. IV: Effect of debridement procedures and calcium hydroxide - camphorated parachlorophenol paste in the treatment of experimentally induced pulp and periapical disease. *Oral Surg* 1973;35:541-54.

Tziafas D, Belibasakis G, Veis A, Papadimitriou S. Dentin regeneration in vital pulp therapy: design principles. *Adv Dent Res* 2001;15:96-100.

Urist M. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965;150:893-9.

Valois CRA. Proteína óssea morfogenética: uma nova tendência para o tratamento conservador pulpar. *Rev ABO* 2004;12:32-7.

Watts A, Paterson RC. Pulpal response to a zinc oxide-eugenol cement. *Int Endod J* 1987;20:82-6.

Watts A, Paterson RC. Usage testing of root canal sealing materials - a personal view. *Dent* 1992;20:266-71.

Zander HA, Glass RL, Boston DMO. The healing of phenolized pulp exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1949;2:803-10.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 04.1.402.53.8), intitulado: "Resposta Pulpar e Periapical de Dentes de Cães após Pulpotomia e Utilização de Proteína Óssea Morfogênica (rhBMP-7)", de autoria de **Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, foi aprovado em reunião da CEUA de 19.08.2004.

Ribeirão Preto, 30 de agosto de 2004

Presidente da CEUA
Prof. Dr. José Clóvis do Prado Junior

Secretária da CEUA
Maria Angélica S. Depiro

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social
Avenida do Café, s/n. CEP 14040-904
Ribeirão Preto. Fevereiro de 2006
e-mail: franciscogarcia@forp.usp.br