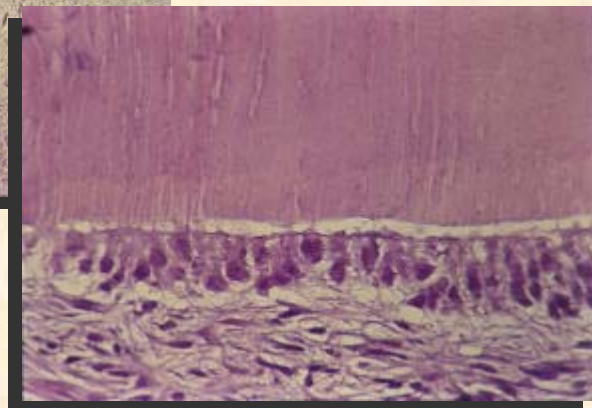
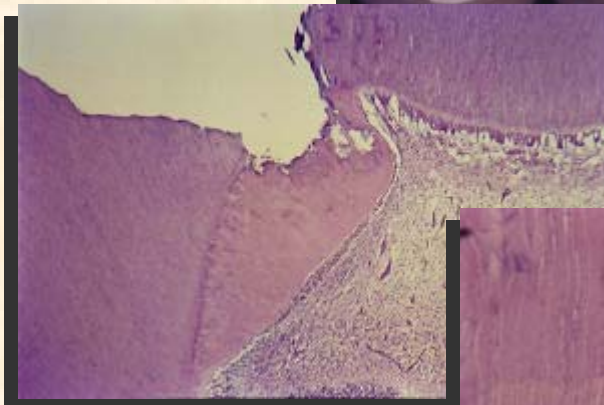
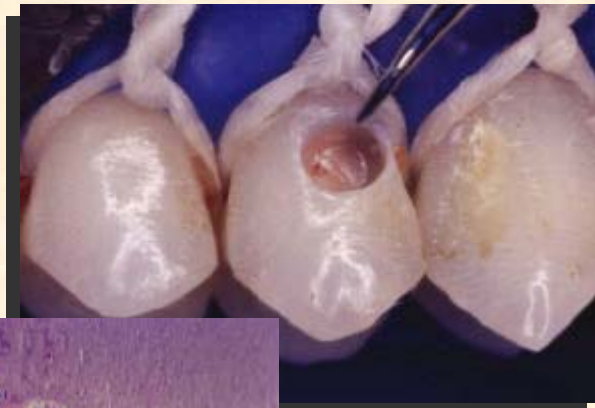


Faculdade de Odontologia de Araraquara  
Universidade Estadual Paulista  
UNESP

**RESPOSTA DE POLPAS CAPEADAS COM PROTEÍNAS  
BIOATIVAS OU HIDRÓXIDO DE CÁLCIO  
SUBMETIDAS OU NÃO, À AÇÃO DO LASER**



MARCIA DE FREITAS OLIVEIRA

ARARAQUARA - 2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Campus de Araraquara

**MARCIA DE FREITAS OLIVEIRA**

**RESPOSTA DE POLPAS CAPEADAS COM PROTEÍNAS BIOATIVAS OU  
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO SUBMETIDAS OU NÃO, À AÇÃO DO LASER**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Odontopediatria.

Orientadora: Profa. Dra. *Elisa Maria Aparecida Giro*

Co-orientador: Prof. Dr. *Carlos Alberto de Souza Costa*

**ARARAQUARA – SP**

**2004**

Oliveira, Marcia de Freitas

Resposta de polpas capeadas com proteínas bioativas ou hidróxido de cálcio submetidas ou não, à ação do laser / Marcia de Freitas Oliveira. – Araraquara: [s.n.], 2004.

198 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia.

Orientadora : Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro.

1. Polpa dentária 2. Lasers 3. Hidróxido de cálcio  
4. Proteínas bioativas I. Título.

## *Dados curriculares*

### *Marcia de Freitas Oliveira*

Nascimento	23.10.1971 – São Paulo – SP
Filiação	Luiz Gonzaga Rodrigues de Oliveira Maria Angélica de Freitas Oliveira
1992/1995	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
1997	Curso de Especialização em Saúde Pública pelas Faculdades de Farmácia-Bioquímica e Odontologia do Campus de Araraquara – UNESP
1998/2000	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2001/2004	Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

## *Dedico este trabalho:*

*À Deus:*

Que com o seu Amor comanda a minha vida, dando-me todos os dias uma oportunidade de renascimento, renovando minhas experiências e sentimentos, podendo assim ir tornando-me uma pessoa mais grata à benção da vida.

*Aos meus pais, Luiz Gonzaga e Maria Angélica:*

Que compartilharam meus ideais e os alimentaram, ao amor incondicional que sempre me deram, minha eterna gratidão e sempre o meu amor.

*À minha querida irmã Railda, sempre presente em todos os momentos da minha vida*

# ***AGRADECIMENTOS ESPECIAIS***

***À Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro:***

Muito obrigada por tudo o que me proporcionou com sua atenção, carinho, amizade e valiosa orientação. Seus gestos, atitudes e sabedoria formaram uma discípula e admiradora. Quero agradecer de coração por tudo que você me ajudou a realizar. Obrigada por ter sido minha mestre, orientadora e amiga. Que Deus pague tudo isso, pois com certeza nunca poderei pagar tanta gentileza. Obrigada por tudo.

***Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa:***

Muito obrigada pela consideração com que sempre me atendeu, pela amizade, pelos conselhos, sugestões oportunas, pela grande orientação e incentivo durante as diversas fases deste trabalho.

# AGRADECIMENTOS

À *Faculdade de Odontologia de Araraquara*, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, nas pessoas do *Exmo. Diretor, Prof. Dr. Ricardo Samih Georges Abi Rached* (diretor) e *Prof. Dr. Roberto Miranda Esberard* (vice-diretor).

À *Faculdade de Odontologia de Araçatuba*, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, nas pessoas do *Exmo. Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin* (diretor) e *Prof. Dr. Célio Percinoto* (vice-diretor).

Ao *Núcleo de Procriação de Macacos Prego* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, especialmente ao coordenador *Prof. Dr. José Américo de Oliveira*, pelo exemplo de vida e pela dedicação à parte experimental deste trabalho, e ao funcionário *José Ari Gualberto Junqueira*.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria*, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas da *Profa. Dra. Rita de Cássia Loiola Cordeiro* (cordenadora) e da *Profa. Dra. Josimeri Hebling* (vice-cordenadora).

Ao *Departamento de Clínica Infantil* da Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas do *Prof. Dr. Luís Gandini Júnior* (chefe) e da *Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon* (vice-chefe).

Aos *Professores da Disciplina de Odontopediatria: Profa. Dra. Angela Cristina Cilense Zuanon, Prof. Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Profa. Dra. Elisa Maria Aparecida Giro, Prof. Dr. Fábio César Braga Abreu e Lima, Profa. Dra. Josimeri Hebling, Profa. Dra. Lourdes Ap. Martins dos Santos-Pinto, Profa. Dra. Rita de Cássia Loyola Cordeiro*, meus sinceros agradecimentos a vocês que conduzem apaixonadamente o

mundo da Odontopediatria. Muito obrigada por tudo o que me ensinaram, guardo em mim todo o amor e profissionalismo que esta disciplina transmite.

À **Profa. Dra. Josimeri Hebling**, meu respeito pelo companherismo, amizade e atenção que sempre me dedicou e pela valiosa contribuição a este trabalho.

Ao **Departamento de Fisiologia e Patologia**, da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, especialmente ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa** pela co-orientação e pelo auxílio na parte histológica, fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Às amigas do Curso de Pós-Graduação: **Marcela, Tetê e Cláudia** pelos momentos divididos e convívio prazeroso.

À amigas do Curso de Pós-Graduação **Cristiane e Andreza** pelo auxílio e agradável convívio durante a fase experimental desta pesquisa.

À funcionária **Maria da Glória Vieira Celli** pela amizade e profissionalismo demonstrados durante toda a tramitação laboratorial das peças, para análise histológica.

Aos funcionários do **Setor de Pós-Graduação**, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, especialmente à **Mara, Rosângela, Vera e Silvia** pela disponibilidade.

Aos funcionários da **Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Araraquara em especial à **Maria Helena, Odete, Maria José e Ceres**.

Aos funcionários do **Departamento de Clínica Infantil** da Faculdade de Odontologia de Araraquara, **Célia, Sônia, Tânia, Dulce, Silvia, D. Odete, Isabel, Cristina, Toninho, Edson e Regina** pela amizade e convivência.

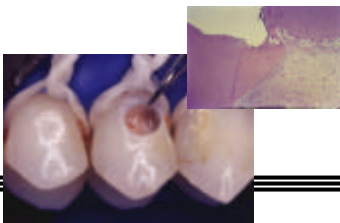
À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da Bolsa de Estudos.

# *AOS ANIMAIS*

Gostaria também de manifestar meu profundo respeito aos macacos utilizados nesta pesquisa. O contato com eles, por si só, já tem o poder de transformar o pesquisador em um ser humano mais sensível.

# SUMÁRIO

1. Introdução .....	10
2. Revisão da literatura .....	15
3. Proposição.....	100
4. Material e método .....	102
5. Resultado .....	114
5.1. Descrição dos eventos histopatológicos.....	115
5.2. Análise Estatística .....	132
6. Discussão .....	145
7. Conclusão .....	168
8. Referências bibliográficas .....	170
9. RESUMO .....	187
10. ABSTRACT .....	190
11. Anexos .....	193
Aprovação do Comitê de Ética em Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba .....	194
Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara .....	195
Distribuição dos tratamentos realizados nos dentes dos animais.....	196
Medidas do diâmetro da exposição pulpar .....	198



## *1. Introdução*

---

---

---

# 1. Introdução

O material de eleição para tratamento de polpas acidentalmente expostas é o hidróxido de cálcio, utilizado desde 1920, quando Herman<sup>36</sup> o empregou na obturação de canais radiculares obtendo elevados índices de reparação.

No entanto, o hidróxido de cálcio por apresentar pH altamente alcalino, quando utilizado diretamente sobre o tecido pulpar, provoca uma extensa área de necrose de coagulação, que ocasiona perda significativa de células pulpares e formação de barreira mineralizada à distância do material capeador<sup>4,16,21,30,31,32,35,37,39,40,48,89,107,109,110,123,124</sup>.

Com a finalidade de solucionar este problema, muitos materiais têm sido estudados para o capeamento de polpas expostas. Avanços na área de biologia molecular têm oferecido conhecimento sobre proteínas bioativas que induzem à formação de osso e dentina<sup>80</sup>.

As propriedades destas proteínas bioativas foram primeiramente descritas por Urist<sup>121</sup> (1971), que verificou que a matriz de dentina desmineralizada podia estimular formação óssea quando implantada em locais ectópicos, tal como músculo. Neste trabalho, o autor constatou que a matriz dentinária contém fatores capazes de autoindução, e nomeou-os de proteínas ósseas morfogenéticas.

Na década de 70, alguns pesquisadores, tais como Jones e Leaver<sup>47</sup> (1974), Leaver et al.<sup>53</sup> (1975), Thomas e Leaver<sup>108</sup> (1975), Leaver et al.<sup>52</sup> (1978) e Smith e Leaver<sup>99</sup> (1979) isolaram e fracionaram a matriz de dentina com a finalidade de obter informações sobre a sua natureza.

Em 1990, Smith et al.<sup>101</sup> extraíram, em EDTA, as proteínas da matriz de dentina de incisivos de coelhos, as quais foram aplicadas sobre polpas expostas de animais

jovens. Os autores demonstraram que houve formação de dentina reparadora semelhante à dentina tubular primária, com células odontoblastóides imediatamente abaixo da superfície do material experimental.

Embora os mecanismos de formação de dentina reparadora não estejam ainda completamente elucidados, o processo parece se iniciar com a neovascularização, proliferação, migração e diferenciação das células pulpares precursoras em odontoblastos ou odontoblastóides<sup>111,112</sup>. Muitos fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular normalmente secretadas durante a dentinogênese primária participam do processo de reparo<sup>65,66,67</sup>. Entre estas moléculas estão as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), o fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e seus derivados, os quais estão sendo amplamente estudados<sup>85,86,94</sup>.

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) ou osteogênicas são um subgrupo de uma grande família de proteínas conhecida como superfamília do fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). As proteínas desta família estão relacionadas com diversas atividades biológicas envolvendo diferenciação celular, morfogênese do tecido, regeneração e reparo<sup>80,86,117</sup>.

A capacidade das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) em induzir a formação de dentina reparadora em capeamentos pulpares, tem direcionado pesquisas com o objetivo de desenvolver uma nova geração de biomateriais<sup>117</sup>.

Tziafas e Kolokuris<sup>113</sup> (1990) investigaram os efeitos de implantes autógenos de dentina desmineralizada e de matriz óssea nas células ectomesenquimais de dentes de cães e observaram a organização odontoblástica e deposição de matriz dentinária em todos os casos de implante de dentina. Por outro lado, em contato com os implantes ósseos foi observada a deposição de osteodentina, seguida da formação de dentina tubular em algumas áreas.

Além dos avanços na área da biologia molecular, a física têm fornecido conhecimentos que permitem uma ampla aplicação no campo médico e odontológico. Tem sido observado na literatura, um crescente volume de trabalhos avaliando a aplicação do laser como recurso principal ou coadjuvante em várias modalidades terapêuticas.

Pode-se dividir as principais fontes emissoras de laser em duas categorias: o laser de baixa potência, cujo comprimento de onda enquadra-se na faixa de 400 a 750nm e cujos efeitos principais são o antiinflamatório, a bioestimulação e a analgesia e, o laser de alta potência, cujo comprimento de onda encontra-se acima de 1000 nm de espectro eletromagnético e, aplica-se principalmente a procedimentos cirúrgicos<sup>10</sup>.

Entretanto, o uso do laser na Odontologia é relativamente novo. Como a polpa dentária encontra-se circundada por paredes inextensíveis, a redução da resposta inflamatória obtida através do uso do laser de baixa potência, seria de interesse para direcionar e acelerar o processo de reparação do tecido pulpar, submetido a diferentes procedimentos terapêuticos conservadores.

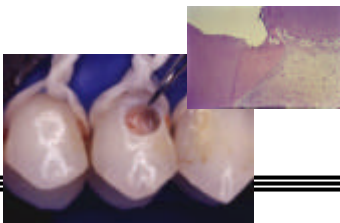
Muitos trabalhos com laser de baixa potência têm sido realizados com a finalidade de avaliar o processo de reparo em feridas do tecido subcutâneo de ratos e coelhos<sup>3,7,28,33,57,74,79</sup>. No entanto, poucos estudos avaliaram o seu uso em polpas dentais<sup>18,81</sup>.

Numa avaliação histológica em dentes decíduos pulpotomizados de cães, Ribeiro et al.<sup>81</sup> (2000) concluíram que nenhum benefício foi acrescentado ao tecido pulpar submetido à irradiação com o laser de baixa potência.

No entanto, Crisci<sup>18</sup> (2002) observou os melhores resultados com resposta inflamatória discreta no período curto de observação (7 dias) e, formação de barreira

dentinária aos 30 dias, quando o capeamento pulpar direto com hidróxido de cálcio foi associado à aplicação do laser de baixa potência.

Assim, é de grande importância a associação dos conhecimentos de biologia molecular com àqueles adquiridos na área da física, na tentativa de se estabelecer uma terapia de baixa agressividade, com o objetivo não apenas de permitir, mas também estimular e acelerar o processo de reparação de polpas expostas com a menor perda tecidual possível.



## *2. Revisão da Literatura*

---

---

---

## 2. Revisão da literatura

### *Hidróxido de cálcio*

O hidróxido de cálcio tem sido o material de eleição como agente indutor da reparação do tecido pulpar, sendo seus efeitos benéficos conhecidos desde 1920, quando Herman<sup>36</sup> demonstrou cientificamente a eficiência do Calxyl, uma pasta à base de hidróxido de cálcio com excelente propriedade bactericida, que revelou boa tolerância tecidual apesar de apresentar pH altamente alcalino.

Teuscher e Zander<sup>107</sup>, em 1938, foram os pioneiros na utilização da pasta de hidróxido de cálcio (mistura do pó de hidróxido de cálcio em água) no tratamento de polpas expostas de dentes decíduos e permanentes humanos. Após quatro semanas da realização de pulpotomias, não foi observado, histologicamente, inflamação pulpar, e houve uma reorganização da camada odontoblástica com formação de dentina terciária.

Em 1949, Glass e Zander<sup>31</sup> avaliaram, histologicamente, o processo de reparo de polpas expostas de 40 pré-molares humanos íntegros, recobertas com pasta de óxido de zinco e eugenol ou pasta de hidróxido de cálcio em água. As cavidades foram seladas com cimento de óxido de zinco e eugenol. Os dentes foram extraídos em intervalos de 24 horas, 2, 4, 6, 8 e 12 semanas após a realização do capeamento. No período de 24 horas, foi observado nas polpas capeadas com hidróxido de cálcio, uma camada de necrose superficial com poucas células inflamatórias no tecido subjacente. Após 2 semanas, iniciou-se o processo de reparo e, na 4ª semana, uma zona bem definida de nova dentina tinha se formado, a qual apresentava em 12 semanas, maior espessura e

regularidade. Já nas exposições pulpares capeadas com óxido de zinco e eugenol, a inflamação persistiu, não sendo observada cura completa, embora as polpas tenham se mantido vitais.

Em 1958, Berman e Massler<sup>4</sup> realizaram pulpotomias em molares de ratos e utilizaram o hidróxido de cálcio na forma de pó ou o óxido de zinco e eugenol como capeadores do remanescente pulpar. Após os períodos pós-operatórios de 7, 14, 21 e 28 dias foi observado, histologicamente, que a formação de barreira mineralizada era mais rápida com o uso do hidróxido de cálcio. Os autores concluíram que os bons resultados observados ocorreram devido ao pH altamente alcalino e à ação hemostática do hidróxido de cálcio, propriedades estas que pareciam ser mais importantes para a reparação pulpar do que a própria presença do cálcio em sua fórmula.

Kalnins e Frisbie<sup>48</sup> (1960) estudaram a influência de fragmentos de dentina no processo de reparo de polpas expostas de dentes decíduos e permanentes humanos, capeadas com pasta de hidróxido de cálcio. Observaram, após um período de 1 a 14 meses, a presença de inflamação em diversos graus, bem como reações do tipo corpo estranho e pulpites difusas ou abscessos. Os autores concluíram que a presença de fragmentos de dentina interferiu negativamente no processo de reparo pulpar provocando distúrbios ou ausência de formação de barreira dentinária.

Sciaky e Pisanti<sup>91</sup> (1960) utilizaram o hidróxido de cálcio com cálcio radioativo em pulpotomias de dentes permanentes de cães com o objetivo de explicar o mecanismo de formação da barreira mineralizada. Para o estudo foram tratados 42 dentes de 2 cães machos, com idade aproximada de 2 anos e meio. Demonstraram, histologicamente, em

intervalos de 2 a 8 semanas, a existência de área de tecido necrótico, fibrose, zona de calcificação distrófica e a formação de barreira dentinária regular. Também foi observado, auto-radiograficamente, que o cálcio radioativo estava presente apenas na superfície da barreira mineralizada, sugerindo que o cálcio contido no seu interior era fornecido pela polpa através da corrente sanguínea.

Eda<sup>23</sup>, em 1961, também estudou o mecanismo de formação de barreira dentinária através de análises histoquímicas em dentes permanentes de cães, cujas polpas foram expostas experimentalmente e então protegidas com pasta de hidróxido de cálcio. Após trinta minutos da aplicação do medicamento, foi observado o aparecimento de uma área de necrose com deposição de carbonato de cálcio diretamente relacionada com a formação de dentina. Partículas pequenas que reagiram positivamente à coloração de Von-Kossa foram vistas em grande quantidade, em toda a extensão do tecido pulpar. Observou, ainda, que 5 dias após o capeamento pulpar, iniciou-se a organização celular na área de exposição, sendo que aos 10 dias, as células adquiriram forma alongada, semelhante à odontoblastos. Após 15 dias de realização do capeamento pulpar, foi possível demonstrar a presença de uma pequena quantidade de matriz de dentina abaixo da área de necrose.

Pisanti e Sciaky<sup>77</sup> (1964) realizaram uma pesquisa com o objetivo de reavaliar a origem do cálcio da barreira mineralizada. Dezesesseis dentes de um cão, de 2 anos de idade, tiveram suas polpas expostas com brocas esféricas diamantadas, as quais foram cuidadosamente recobertas com pasta de hidróxido de cálcio em água destilada. As cavidades foram seladas com cimento de óxido de zinco e eugenol. Durante as três semanas seguintes, o cão foi submetido a injeções intravenosas de uma solução

contendo hidróxido de cálcio radioativo ( $\text{Ca}^{45}$ ). A análise histológica evidenciou a formação de barreira mineralizada de forma côncava, cuja espessura variava entre 250 e 350  $\mu\text{m}$ . Os dados obtidos através da avaliação auto-radiográfica dos espécimes confirmaram que o cálcio presente na barreira formada era originário da corrente sanguínea.

Weiss e Bjorvatn<sup>123</sup> (1970) estudaram, comparativamente, a ação do Dycal, da pasta aquosa de hidróxido de cálcio, de um cimento de óxido de zinco e eugenol e do hidróxido de cálcio com cresatina, após capeamento direto de 31 dentes decíduos e permanentes de quatro macacos. Dentes que não receberam o tratamento foram utilizados como controle. Os animais foram sacrificados 1 a 5 semanas após o tratamento. Os resultados mostraram que não houve diferenças nas reações pulpare de dentes decíduos e permanentes. A pasta de hidróxido de cálcio em água destilada e o Dycal determinaram, histologicamente, respostas semelhantes. Estas foram caracterizadas por ampla área de necrose entre o medicamento e a polpa vital e formação de barreira, variando de uma fina camada fibrosa até uma área calcificada amorfa. Após uma semana, o hidróxido de cálcio com cresatina produziu uma pequena área de necrose sob o material e início de formação de dentina. No período de 5 semanas estava formada uma barreira mineralizada completa cobrindo a exposição pulpar. O óxido de zinco e eugenol, por sua vez, foi bem tolerado pelo tecido vital, contudo estimulou, de maneira discreta, a formação de barreira mineralizada.

Com o objetivo de avaliar, histológica e histoquimicamente, o processo de reparo da polpa, Holland<sup>39</sup> (1971) realizou pulpotomia e proteção do tecido conjuntivo remanescente com hidróxido de cálcio em 48 dentes permanentes de 12 cães machos

com idade entre 1 e 2 anos. Os períodos de observação foram de 2, 5, 12, 24 e 48 horas e 7, 15, 30 e 60 dias. Dentes íntegros foram utilizados como grupo controle. Durante o processo de reparo, foram observadas 5 zonas distintas abaixo do material capeador: 1 - necrose, 2 - granulosa superficial, 3 - granulosa profunda, 4 - proliferação celular e 5 - tecido pulpar remanescente com características de normalidade. Também foi verificado que durante o processo de reparo ocorreu, na zona granulosa profunda, um aumento progressivo na deposição de compostos de cálcio e, na zona de proliferação celular, formação de dentina pelos novos odontoblastos diferenciados.

Schröder e Granath<sup>89</sup> (1971) analisaram histologicamente, o processo de reparo e as alterações teciduais após pulpotomia e capeamento da polpa remanescente com pasta de hidróxido de cálcio. Onze pré-molares humanos hígidos foram utilizados para o experimento. Os dentes foram extraídos nos períodos experimentais de 10 minutos, 1, 3, 6, 12 e 24 horas, e 4, 7, 14, 28 e 90 dias. Os resultados sugeriram que a alta alcalinidade do hidróxido de cálcio provocou, após 24 horas, o aparecimento de necrose com múltiplas camadas, acompanhada pela irritação da polpa subjacente. Após 4 dias, foi observada a deposição de matriz de dentina, a qual após 7 dias já havia iniciado sua mineralização, caracterizando uma barreira inicialmente irregular que nos períodos mais longos assemelhava-se à dentina.

Schröder e Sundstrom<sup>90</sup> (1974) estudaram, por meio de análise em microscopia eletrônica de transmissão, as alterações teciduais que ocorrem após pulpotomia e capeamento dos remanescentes pulpares de dentes permanentes jovens humanos íntegros utilizando hidróxido de cálcio. No período inicial de avaliação (7 dias) foi observado a formação de uma barreira de colágeno sob a zona de necrose de

coagulação; aos 30 dias esta se apresentava com aspecto ósseo e pequena quantidade de dentina havia se formado. O tecido subjacente apresentava células que lembravam odontoblastos. Após 3 meses, a barreira consistia de duas camadas distintas, uma de tecido semelhante ao osso, e outra semelhante à dentina. Também foi observado que a calcificação da matriz de colágeno iniciou-se através de corpos esféricos na zona de necrose.

Tronstad<sup>109</sup> (1974) realizou capeamento direto em dentes de macacos jovens utilizando Dycal ou pasta de hidróxido de cálcio. Cavidades classe I e V foram preparadas e as polpas expostas foram submetidas ao capeamento com os materiais experimentais. Decorridos os períodos de observação de 48 horas, 8, 14, 30 e 82 dias, os animais foram sacrificados e os dentes preparados para análise histológica. Nos dentes tratados com a pasta de hidróxido de cálcio, houve formação de uma zona de necrose superficial seguida por reação inflamatória de grau moderado. Por outro lado, os dentes tratados com Dycal apresentaram somente um infiltrado de macrófagos e células gigantes, com ausência de camada de necrose. Após 30 dias, o tecido pulpar mostrou-se reorganizado. Os dois materiais permitiram formação de ponte de dentina, sendo que para a pasta de hidróxido de cálcio esta se formou à distância do material. Quando o tecido pulpar foi capeado com Dycal, ocorreu a formação de ponte dentinária imediatamente adjacente ao material experimental.

Isaia e Catanzaro-Guimarães<sup>44</sup>, em 1975, com o objetivo de analisar morfológicamente o comportamento da polpa de dentes permanentes de cães ao capeamento com hidróxido de cálcio, Formagen, óxido de zinco e eugenol ou platina (controle), confeccionaram cavidades classe V nos dentes anteriores e classe I nos

posteriores dos animais. Após a realização do capeamento, os animais foram sacrificados nos períodos pós-operatórios de 6 a 15 dias, 2, 4 e 6 meses. O tecido pulpar capeado com hidróxido de cálcio e Formagen, exibiram resposta biológica favorável, apresentando estratificação nítida, caracterizada por 5 zonas distintas: 1- zona de necrose de coagulação rápida, 2- zona granulosa, 3- zona de necrose de coagulação lenta, 4- zona de reparação e 5- tecido pulpar normal. Aos 15 dias, os autores observaram completa cicatrização na zona da exposição pulpar, sendo que no período de 6 meses ocorreu formação de uma ponte de dentina reparadora espessa e ausência de reação inflamatória no tecido pulpar. O cimento de óxido de zinco e eugenol preparado com consistência espessa permitiu cicatrização incompleta do tecido pulpar, sendo observado algumas evidências de reabsorção interna aos 6 meses. O tecido pulpar em contato com platina exibia formação de uma zona hemorrágica com massas de fibrina envoltas por um exsudato linfo-histio-plasmocitário difuso, sendo que, aos 6 meses de pós-operatório, observou-se a ocorrência de degeneração fibrinóide e reticular à distância do local do capeamento.

Holland et al.<sup>40</sup> (1979/1980) compararam o cimento Dycal<sup>®</sup> e pasta de hidróxido de cálcio como agentes capeadores após pulpotomia. Foram utilizados 40 dentes unirradiculares de cães para cada um dos grupos, os quais após o capeamento tiveram suas cavidades seladas com cimento de óxido de zinco e eugenol. Os animais foram sacrificados 24 horas e 30 dias após o tratamento. A análise histológica mostrou que no período de 24 horas, todos os dentes protegidos com a pasta de hidróxido de cálcio em água destilada exibiram necrose superficial de contato, enquanto somente 9 dentes exibiram este tipo de necrose no grupo Dycal. Aos 30 dias, 18 espécimes do grupo hidróxido de cálcio em água destilada exibiram formação de barreira mineralizada

completa que protegia o remanescente pulpar livre de processo inflamatório. Nos dentes tratados com Dycal<sup>®</sup> houve formação completa de barreira em apenas 10 dos 20 espécimes capeados. Os 10 espécimes restantes apresentaram significativa reação inflamatória crônica. Os autores concluíram que o mecanismo de cura do tecido pulpar para o Dycal e para o hidróxido de cálcio em água destilada é semelhante. No entanto, no período de 30 dias verificaram o melhor efeito da pasta de hidróxido de cálcio em água destilada.

Pereira et al.<sup>76</sup> (1980) analisaram radiografica e histologicamente polpas de dentes permanentes de cães expostas e capeadas com hidróxido de cálcio em pó ou em pasta com água destilada. Foram confeccionadas cavidades classe V em 77 dentes e as polpas foram expostas com fresa número 1 em alta rotação. Os materiais experimentais foram aplicados sobre as polpas e as cavidades foram seladas com amálgama. Após os períodos de 2, 30, 70 e 120 dias, os animais foram sacrificados e os dentes preparados para análise histológica. As características e a evolução da resposta pulpar foi semelhante para os dois grupos. Radiograficamente, 51 dentes exibiram uma linha radiopaca, característica de formação de barreira mineralizada na área. Histologicamente, somente no período pós-operatório de 120 dias foi observada a presença de ponte de dentina irregular e incompleta na maioria dos casos, para ambos os grupos.

Sela et al.<sup>92</sup> (1981) avaliaram o hidróxido de cálcio (Calxyl) como agente capeador após exposição pulpar experimental em dentes de ratos. Para realização do estudo foram confeccionadas cavidades em primeiros molares superiores de 10 ratos, sendo que as polpas foram expostas com sonda exploradora e capeada com hidróxido de

cálcio. Um grupo foi mantido como controle sem tratamento. Após o período de 10 dias, os animais foram sacrificados e os dentes preparados para análise histológica. A avaliação dos espécimes em microscópio eletrônico de transmissão mostrou a presença de células odontoblásticas e matriz de colágeno, com focos de calcificação compostos por cristais de hidroxiapatita. Numerosas vesículas de matriz extracelular estavam espalhadas entre as células formadoras e os focos de calcificação. Os autores concluíram que as vesículas da matriz de calcificação podem ser resultado de alterações no estado metabólico dos tecidos, as quais podem ser induzidas cirúrgica ou quimicamente.

Hirschfeld et al.<sup>38</sup>, em 1982, avaliaram a formação de dentina reparadora em polpas de molares de ratos capeadas diretamente com Calxyl (hidróxido de cálcio). Foram utilizados 15 ratos, sendo que em 10 deles foram preparadas cavidades oclusais, as polpas foram expostas com sonda exploradora e sobre elas foi aplicado o material experimental. As cavidades tiveram como base um cimento de óxido de zinco e eugenol e foram restauradas com amálgama. Os outros 5 ratos serviram como controle negativo. Os animais foram sacrificados aos 21 e 35 dias de pós-operatório. A análise em microscopia eletrônica de varredura revelou que o processo de reparação que resultou na formação de barreira dentinária foi caracterizado por deposição de apatita e ocorrência de nódulos de calcificação na matriz. A persistência de características de mineralização primária durante o período experimental foi associada às mudanças no estado metabólico do tecido pulpar, provocadas pelo contato com o hidróxido de cálcio.

Alle et al.<sup>1</sup> (1984) realizaram capeamento pulpar direto em dentes de cães com cimentos à base de hidróxido de cálcio (Dycal, Life e Renew) e com hidróxido de cálcio

puro na forma de pó. Para realização do estudo, foram confeccionadas cavidades classe V em 40 dentes de 5 cães. Exposições pulpares foram realizadas com sonda exploradora, e capeadas com os diferentes materiais. As cavidades foram restauradas com IRM. Após os períodos de 15 e 60 dias os animais foram sacrificados, os dentes foram extraídos e submetidos ao processamento histológico para análise do processo de reparo. Os cimentos de hidróxido de cálcio mostraram, em ambos os períodos, menor poder indutor na formação de barreira mineralizada do que o hidróxido de cálcio puro. Quando estes cimentos foram utilizados, a barreira possuía dimensões bem reduzidas e, na maioria das vezes era descontínua. Nos espécimes em que foi usado o hidróxido de cálcio puro, houve rápida formação de tecido mineralizado, evidenciado já no período de 15 dias. No período de 60 dias, as barreiras eram espessas e contínuas, obliterando totalmente as exposições realizadas. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio puro apresentou os melhores efeitos e causou menor injúria à polpa, em ambos os períodos estudados.

Franz et al.<sup>25</sup> (1984) avaliaram a estrutura de pontes de dentina formadas após o capeamento pulpar de 20 pré-molares e terceiros molares humanos com uma pasta de hidróxido de cálcio (Pulpdent). Quatro a 15 semanas após a realização do capeamento, os dentes foram extraídos. As observações realizadas com o auxílio de microscópio eletrônico de varredura sugeriram a completa formação da ponte dentinária, que aumentava em espessura com o decorrer dos períodos. Após 6 semanas, a ponte de dentina apresentava diferentes camadas, sendo a superficial constituída por restos teciduais e hidróxido de cálcio, a média por uma dentina sem túbulos dentinários e a interna por uma dentina tubular.

Gonzalez Vono et al.<sup>32</sup>, em 1984, analisaram as reações pulpares frente a três diferentes materiais: hidróxido de cálcio puro em água destilada, MPC e Hypo-cal. Para a realização do experimento, foram utilizados 45 pré-molares hígidos de pacientes com idade entre 9 e 13 anos, indicados para extração por finalidade ortodôntica. As polpas foram expostas pela face oclusal e capeadas com os três diferentes materiais. Sobre o material capeador foi colocado cimento de fosfato de zinco, e as cavidades restauradas com amálgama de prata. Os dentes foram extraídos aos 10, 21, 40, 60 e 90 dias de pós-operatório e foram preparados para análise histológica. Os resultados variaram para os materiais testados, sendo observada a presença de barreira mineralizada para o hidróxido de cálcio puro, a não formação de barreira mineralizada para o MPC e a formação de uma barreira aparentemente mineralizada para o Hypo-Cal.

Cox et al.<sup>17</sup>, em 1985, avaliaram a capacidade de reparo de polpas expostas de dentes de macacos quando submetidas a capeamento direto. Foram confeccionadas cavidades classe V em 120 dentes. Vinte e um deles não tiveram suas polpas expostas e serviram como controle, e 91 dentes tiveram as polpas expostas ao meio bucal por três diferentes períodos, zero, 24 horas e 7 dias. Todos os dentes tiveram o tecido pulpar exposto capeado com hidróxido de cálcio e as cavidades restauradas com amálgama. Após um e dois anos de observação, das 91 polpas expostas, 45 tiveram reparo completo, 25 mostraram inflamação variando de aguda à crônica, 12 apresentaram severo colapso pulpar e formação de abscesso e 9 necrosaram. A exposição da polpa ao meio bucal por 24h e 7 dias não provocou alteração no processo de reparo quando comparada à polpa não exposta ao meio bucal. Este estudo demonstrou que a inflamação pulpar observada 1 e 2 anos após o capeamento pulpar direto estava associada com a contaminação bacteriana.

Segundo Schröder<sup>88</sup> (1985) o hidróxido de cálcio aplicado sobre a polpa exposta provoca, inicialmente, necrose superficial que causa irritação suave e estimula a defesa e o reparo pulpar. A seqüência de reações teciduais observada é a mesma que ocorre no tecido conjuntivo ferido. Primeiro observa-se aumento da vascularização, proliferação e migração de células inflamatórias para controlar e eliminar o agente irritante. Em seguida, o processo de reparo ocorre com a proliferação e migração de células mesenquimais e endoteliais da polpa e formação de colágeno, diferenciação de novos odontoblastos e formação de tecido mineralizado com características semelhantes à dentina tubular, caracterizando a normalização da função do tecido pulpar.

Cox e Bergenholtz<sup>16</sup>, em 1986, confeccionaram 35 cavidades classe V em dentes de macacos e expuseram as polpas mecanicamente com fresa de baixa rotação. Estas foram deixadas expostas ao meio bucal por 24 horas e, em seguida, receberam o curativo de hidróxido de cálcio (Life) por 3, 5, 10 ou 14 dias e foram restauradas com amálgama. Sete dentes não receberam o curativo e foram observados pelos mesmos períodos, servindo como controle. As polpas capeadas pelo período de 3 dias exibiram infiltrado de leucócitos polimorfonucleares no local da exposição. Aos cinco dias, os dentes capeados exibiam coágulo, áreas de necrose e desintegração dos leucócitos polimorfonucleares. Algumas polpas apresentaram reorganização e estratificação dos fibroblastos adjacentes na interface do agente capeador. No período de 10 dias, foi observada mineralização da matriz de dentina abaixo do material capeador. No período de 14 dias, foi possível observar uma completa reorganização do tecido conjuntivo e formação de tecido duro. Os autores concluíram que a reparação pulpar completa e o início de deposição de novo tecido duro ocorre num período de 14 dias, nos dentes

capeados com hidróxido de cálcio, sendo que a inflamação aguda induzida pela exposição da polpa ao meio bucal por 24h não inibiu ou retardou o processo de reparo.

Cvek et al.<sup>19</sup>, em 1987, realizaram pulpotomia em dentes permanentes de macacos com a finalidade de analisar as características morfológicas da barreira mineralizada. Os remanescentes pulparem foram capeados com os materiais: isobutil cianoacrilato (grupo I), hidróxido de cálcio por 10 e 60 min (Grupos II e III), hidróxido de cálcio como capeador definitivo (grupo IV), usado como controle positivo e, Teflon (grupo V), usado como controle negativo. Os animais foram sacrificados depois de 12 semanas. Histologicamente, houve um aumento na formação de barreira mineralizada do grupo I para o IV, o grupo V não apresentou formação de barreira mineralizada. Concluíram que uma irritação suave é responsável pela formação de tecido duro nas exposições pulpares.

Turner et al.<sup>110</sup> (1987) avaliaram a resposta pulpar de caninos decíduos humanos expostos e capeados com hidróxido de cálcio (Nu-Cap) e hidróxido de cálcio p.a. em solução salina. Foram preparadas cavidades classe V em 92 caninos decíduos, as polpas foram expostas com fresa número 4 na parte central do preparo, e foram capeadas com os dois diferentes materiais por um período de 7 e 63 dias. A formação de ponte de dentina foi observada em todas as exposições, tendo o hidróxido de cálcio misturado com solução salina proporcionado um maior grau de inflamação e a formação de uma ponte mais espessa. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio é um material capeador efetivo quando utilizado em polpas expostas não inflamadas.

Dias et al.<sup>21</sup> (1988) estudaram histologicamente, o comportamento de polpas de dentes de cães expostas experimentalmente e capeadas com produtos à base de hidróxido de cálcio (Life, Cavital e Renew), comparando-os com o hidróxido de cálcio p.a. Os períodos de avaliação pós-operatória foram de 30, 60 e 120 dias. Todos os materiais estudados caracterizaram-se como irritantes provocando resposta inflamatória do tecido pulpar. Esta diminuiu de intensidade com o decorrer do tempo, sendo evidente que o hidróxido de cálcio p.a. mostrou os melhores resultados. As diferenças quanto à inflamação não foram significativas entre os produtos Calvital, Life e Renew para o período de 120 dias. A atividade macrofágica foi característica em todos os grupos, evidenciando-se maior dispersão de partículas para os três produtos, quando comparados ao hidróxido de cálcio p.a.. Houve formação de barreira mineralizada, com variações de quantidade e qualidade, sendo que com o hidróxido de cálcio p.a. ela se apresentou completa e homogênea. O Calvital e o Renew mostraram resultados similares e um pouco inferiores aos do hidróxido de cálcio p.a. quanto à formação de barreira mineralizada, enquanto, para o Life as barreiras apresentaram-se, em alguns casos, incompletas, mesmo aos 120 dias.

Oliveira et al.<sup>72</sup>, em 1988, analisaram histologicamente, a reação da polpa de 120 molares de ratos, expostos com trépano de ponta afilada, ao hidróxido de cálcio + polietileno glicol 400, ao hidróxido de cálcio + iodofórmio + polietileno glicol e ao hidróxido de cálcio + óxido de zinco + polietileno glicol. Os animais foram sacrificados aos 3, 7, 15, 30 e 45 dias de pós-operatório. Os resultados mostraram que todas as pastas se caracterizaram como irritantes, porém permitiram a reparação nos períodos mais longos. Houve melhor comportamento em relação à intensidade e evolução da resposta inflamatória, bem como, em relação à formação de barreira mineralizada, nos grupos do

hidróxido de cálcio + polietileno glicol 400 e hidróxido de cálcio + óxido de zinco + polietileno glicol.

Tziafas e Molyvdas<sup>114</sup>, em 1988, avaliaram a resposta pulpar de 48 dentes de cães capeados com pasta de hidróxido de cálcio em solução salina. Foram confeccionadas cavidades classe V em incisivos e caninos de 4 cães jovens, as polpas foram expostas com fresa número 00 em baixa rotação e capeadas da forma usual ou forçando o material para dentro da polpa. Os resultados foram avaliados 2, 15 e 69 dias após o tratamento e mostraram que quando o hidróxido de cálcio foi forçado para o interior da polpa permitiu no período mais longo a formação de barreira mineralizada mais evidente, apesar de ter ocorrido maior índice de necrose com esta técnica.

Foreman e Barnes<sup>24</sup> (1990), numa revisão de literatura, tentaram explicar de forma resumida, a ação do hidróxido de cálcio aplicado diretamente sobre o tecido pulpar. Entre os fatores que iniciam o processo de mineralização, está a liberação dos íons hidroxila, pois o seu alto pH ativa a fosfatase alcalina, enzima que tem um importante papel na formação do tecido duro. A presença da alta concentração de íons cálcio pode aumentar a atividade da pirofosfatase cálcio dependente, que também tem um importante papel na mineralização. Diversos produtos têm sido formulados com diferentes ações terapêuticas, cujos efeitos dependem parcialmente do tecido sobre o qual são aplicados.

Heys et al.<sup>37</sup> (1990) observaram o reparo de polpas de 229 dentes de macacos expostas experimentalmente, frente a três diferentes materiais: Teflon, cimento de hidróxido de cálcio (Life) e hidróxido de cálcio misturado com soro fisiológico. Foram

preparadas cavidades classe V com alta rotação na face vestibular dos dentes, os quais tiveram suas polpas expostas com fresa ¼ em baixa rotação e capeadas com os materiais testados. Após os períodos de 3, 10 e 21 dias e 5 e 8 semanas, os animais foram sacrificados. Os resultados histológicos mostraram que quando os dentes foram capeados com o cimento de hidróxido de cálcio (Life) ou com o hidróxido de cálcio em soro fisiológico havia resolução da inflamação aos 10 dias de pós-operatório e formação de ponte de tecido duro aos 21 dias ou em períodos posteriores. Quando os dentes foram capeados com Teflon a formação de ponte de tecido duro foi pouco freqüente nos períodos menores e de somente 20% nos períodos mais longos.

Giro et al.<sup>30</sup>, em 1994, compararam mediante exame histológico, a reação do tecido pulpar de dentes permanentes jovens de cães, após pulpotomia e aplicação de diferentes pastas à base de hidróxido de cálcio: grupo I - hidróxido de cálcio + polietileno glicol, grupo II - hidróxido de cálcio + óxido de zinco + polietileno glicol, grupo III - hidróxido de cálcio + carboximetilcelulose, grupo IV - hidróxido de cálcio + óxido de zinco + carboximetilcelulose. Após os períodos de 45, 90 e 150 dias os animais foram sacrificados, e as peças sofreram tramitação laboratorial. Os autores verificaram que as pastas avaliadas apresentaram boa tolerância tecidual, possibilitando evolução reparativa. Ocorreu formação de barreira mineralizada completa, com melhores resultados no grupo II, seguido dos grupos I, IV e III.

Yoshida et al.<sup>124</sup> (1996) com o intuito de descobrirem o que induz a diferenciação dos odontoblastos quando o tecido pulpar é capeado com hidróxido de cálcio, estudaram a hipótese de que a fibronectina estaria envolvida no estágio inicial de diferenciação dos odontoblastos e formação de dentina reparadora. Foram

confeccionadas cavidades classe I em 20 dentes humanos, com indicação para extração por finalidade ortodôntica. As polpas foram expostas com fresa em baixa rotação e capeadas diretamente com hidróxido de cálcio. Dentes não tratados foram usados como controle. Após os períodos pós-operatórios de 1, 7, 14 e 28 dias, os dentes foram extraídos, sofreram tramitação laboratorial e foram submetidos a coloração para evidenciar a fibronectina. No primeiro dia após o capeamento foi observada, por meio de microscópio eletrônico de transmissão, a precipitação de estruturas cristalinas com resíduos celulares na interface entre a zona necrótica e o tecido pulpar subjacente. Esta camada de calcificação distrófica exibiu reação positiva para fibronectina, e as células pulpares pareceram estar mais intimamente próximas a esta camada no período de 7 e 10 dias de pós-operatório. Aos 14 dias, observaram um alinhamento de células, algumas das quais apresentavam-se alongadas. Células semelhantes a odontoblastos também foram observadas adjacentes à matriz irregular positiva para fibronectina. No período de 28 dias, a matriz fibrosa irregular foi seguida pela formação de matriz de dentina tubular margeada por células semelhantes a odontoblastos. Os autores concluíram que a fibronectina pode estar associada com a calcificação inicial, e ter um papel mediador na diferenciação das células em odontoblastos durante a formação de dentina reparadora, quando os dentes são submetidos ao capeamento pulpar com hidróxido de cálcio.

Kardos et al.<sup>49</sup> (1998) estudaram o processo de reparo pulpar que leva à formação de ponte mineralizada. Entre os assuntos discutidos eles se referiram à regulação precisa do íon cálcio livre no citosol. As células são capazes de utilizar ânions, tais como os fosfatos, para variadas atividades, como produção de energia (fosforilação oxidativa). Como os ânions são abundantes no citosol, os níveis intracelulares de íons cálcio são mantidos baixos, em magnitude muito menor do que na

matriz extracelular, conseqüentemente, as células são capazes de usar esses íons para regular muitos eventos celulares. Respostas às alterações celulares podem explicar o sucesso do hidróxido de cálcio em facilitar o reparo pulpar e a diferenciação dos odontoblastos.

Hebling et al.<sup>35</sup> (1999) analisaram as características clínicas, radiográficas e histológicas do complexo dentino-pulpar de dentes humanos após capeamento direto com sistema adesivo em comparação com a pasta de hidróxido de cálcio. Para a realização da pesquisa, foram utilizados 32 pré-molares humanos hígidos. Após as exposições pulpares, as polpas foram capeadas de acordo com os seguintes grupos: Grupo A (18 dentes) – após condicionamento ácido total com ácido fosfórico a 10% por 15 segundos, foi aplicado o sistema adesivo All Bond 2 (primer e adesivo); Grupo B (12 dentes) – antes do condicionamento ácido total e aplicação de sistema adesivo, a parede axial e a polpa exposta foram capeadas com pasta de hidróxido de cálcio em solução salina, seguida da aplicação de uma camada de Dycal<sup>®</sup>; Grupo C – dois dentes intactos foram usados como controle negativo. Todos os espécimes foram restaurados com resina composta híbrida Z-100<sup>®</sup>. Os resultados mostraram que para o grupo A, aos 7 dias, o capeamento pulpar estava associado com formação de abscesso (reação neutrofílica), alteração hialina da matriz extracelular e degeneração hidrópica das células pulpares. Nos períodos subsequentes (30 e 60 dias), a reação neutrofílica foi substituída por proliferação fibroblástica, com macrófagos e células gigantes envolvendo fragmentos de resina dispersos no tecido pulpar, sendo que a reação inflamatória persistente e a alteração hialina inibiram o completo reparo e a formação de ponte de dentina. Por outro lado, no Grupo B, aos 7 dias, células semelhantes a odontoblastos estavam presentes subjacentes à área de necrose de coagulação causada

pelo material e estavam associadas com pequeno infiltrado de células inflamatórias. O processo de reparo, com formação de ponte de dentina próxima à calcificação distrófica da necrose de coagulação, pôde ser observado iniciando aos 30 dias e se completando aos 60 dias.

Nascimento et al.<sup>68</sup> (2000) avaliaram a resposta de polpas dentais humanas após capeamento pulpar direto com pasta de hidróxido de cálcio em solução salina seguido de cimento de hidróxido de cálcio – Dycal (Grupo 1), e com um cimento de ionômero de vidro modificado por resina – Vitrebond (Grupo 2). Foram confeccionadas cavidades classe V na vestibular de 31 pré-molares de pacientes com 11-17 anos com indicação para extração por razões ortodônticas. A exposição pulpar foi realizada no centro do assoalho da cavidade com fresa 330 em alta rotação e capeada com um dos dois materiais. As cavidades foram restauradas com o sistema adesivo Clearfil Liner Bond 2 e resina Z-100. Os dentes foram extraídos após 5, 30 e 120 a 300 dias e preparados para avaliação histológica. Aos 5 dias, o hidróxido de cálcio causou uma zona de necrose de coagulação. Imediatamente abaixo foi observada reação inflamatória que foi de suave a moderada. O cimento de ionômero de vidro causou uma resposta pulpar inflamatória que variou de moderada a intensa com grande zona necrótica. Foi observado um aumento do número de capilares congestos associados com o extravasamento de plasma e infiltração neutrofílica. Nos períodos mais longos, somente o hidróxido de cálcio permitiu o reparo pulpar e a completa formação de ponte de dentina no local da exposição. Os componentes do CIV dispersaram para o interior da polpa provocando uma reação inflamatória persistente, associada com a ausência de formação de ponte de dentina. Os resultados sugerem que o CIV não é um material apropriado para ser usado em capeamento pulpar direto em polpas humanas mecanicamente expostas.

Oliveira<sup>73</sup>, em 2000, avaliou histologicamente a reação tecidual de polpas de dentes de ratos expostas, à pasta de hidróxido de cálcio em água destilada, precedida de curativo de corticosteróide (Decadron) ou corticosteróide/antibiótico (Otosporin) por 5 minutos ou 72 horas. A proteção pulpar com pasta de hidróxido de cálcio, sem curativo prévio, foi utilizada como grupo controle. Foram utilizados 60 ratos, os quais tiveram os primeiros molares superiores tratados. Decorridos os períodos pós-operatórios de 7, 14, 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados, as peças removidas, e preparadas para análise histológica. Foi observado, nos períodos iniciais, uma leve reação inflamatória quando os curativos de demora com corticosteróide (Decadron) ou corticosteróide/antibiótico (Otosporin) foram aplicados por 5 minutos ou 72 horas. A reação tecidual e a barreira formada sob ação do hidróxido de cálcio após o curativo de Otosporin por 5 minutos foi semelhante aquelas do grupo controle (hidróxido de cálcio sem curativo) nos períodos pós-operatórios de 30 e 60 dias. Os curativos de demora com corticosteróide (Decadron) por 5 minutos e 72 horas, e corticosteróide/antibiótico (Otosporin) por 72 horas promoveram um retardo no processo de reparação. Foi concluído que no tecido pulpar livre de inflamação e contaminação, a aplicação do curativo de demora com corticosteróide/antibiótico ou com corticosteróide antes da proteção com a pasta de hidróxido de cálcio em água destilada pode ser dispensada.

Pereira et al.<sup>75</sup> (2000) avaliaram clinicamente e microscopicamente a resposta da polpa dental humana quando capeada diretamente com um sistema adesivo ou hidróxido de cálcio em períodos experimentais curtos (9 -12 dias) e longos (53-240 dias). Foram utilizados 51 pré-molares hígidos indicados para extração por razões ortodônticas, nos quais foram preparadas cavidades classe I que se estenderam em direção ao corno pulpar vestibular para criar uma pequena exposição. Restos dentinários que

permaneceram sobre a ferida pulpar foram removidos por meio de irrigação com solução salina. As polpas foram capeadas com um sistema adesivo (Scotchbond Multi-Purpose plus) ou com pó de hidróxido de cálcio seguido de cimento de hidróxido de cálcio (Dycal). Após os períodos experimentais os dentes foram extraídos e processados para avaliação histológica. No período curto as polpas capeadas com o sistema adesivo exibiram vasos sanguíneos dilatados e congestos associados com moderada reação inflamatória e descoloração do núcleo das células pulpares. No período longo não houve evidência de reparo ou de formação de barreira mineralizada e uma resposta inflamatória suave estava presente. Microabscessos foram detectados em 3 casos associados com infiltração bacteriana. O hidróxido de cálcio estimulou o reparo pulpar precocemente e a formação de ponte de dentina em 80% dos casos no período mais longo, com ausência de inflamação do tecido pulpar subjacente.

Costa et al.<sup>15</sup> (2001) compararam a resposta pulpar de dentes humanos ao capeamento direto com adesivo auto-condicionante e com hidróxido de cálcio. Foram utilizados 33 pré-molares humanos íntegros, nos quais foram realizadas cavidades classe V na face vestibular e exposição pulpar com fresa 330 em baixa rotação. Água destilada estéril foi usada para controlar a hemorragia e o exsudato do local da exposição. As polpas foram capeadas com Clearfil Liner Bond 2 (CLB-2) ou com hidróxido de cálcio e as cavidades foram restauradas com resina composta (Z-100). Após 5, 30 e 120 a 300 dias os dentes foram extraídos e processados para análise histológica. No período curto, o CLB-2 induziu leve à moderada resposta inflamatória, com vasos sanguíneos dilatados e congestos adjacentes ao local da exposição pulpar. Com o tempo, a inflamação crônica desencadeada por fragmentos do agente adesivo deslocados para dentro do espaço pulpar não permitiu o reparo, interferindo na

formação de ponte de dentina. Por outro lado, as polpas capeadas com hidróxido de cálcio exibiram uma organização inicial com a presença de células pulpares alongadas abaixo da área de necrose de coagulação. O reparo pulpar e a formação de ponte de dentina completa foi observada numa avaliação a longo prazo. Os autores concluíram que o hidróxido de cálcio permanece como o agente capeador de escolha para polpa humanas mecanicamente expostas. O CLB-2 não permitiu o reparo completo do tecido conjuntivo adjacente ao local de exposição pulpar, conseqüentemente, este agente adesivo não deve ser recomendado para terapia pulpar de dentes com vitalidade pulpar.

Duarte<sup>22</sup>, em 2002, comparou a resposta de polpas de dentes de cães recobertas com diferentes agentes capeadores. A polpa coronária de 14 pré-molares de três cães jovens foram removidas cirurgicamente e, após a lavagem da ferida pulpar com solução salina esterilizada, os materiais MTA (Grupo I) ou pasta de hidróxido de cálcio (Grupo II) foram aplicados como agentes capeadores. As cavidades foram seladas com cimento de óxido de zinco e eugenol e amálgama. Os animais foram sacrificados 60 dias após os procedimentos clínicos, os maxilares foram seccionados em blocos, e preparados para avaliação histológica. O Grupo I apresentou de uma maneira geral, nenhuma ou discreta resposta inflamatória pulpar associada com a formação de nova camada de células odontoblastóides abaixo da matriz de dentina em calcificação. Dentina reacional depositada por odontoblastos primários foi observada na superfície interna das paredes dentinárias, em continuidade com a ponte de tecido duro depositada junto à ferida pulpar. Eventos histológicos semelhantes foram observados no Grupo II, contudo, a camada de calcificação distrófica foi mais espessa com o hidróxido de cálcio do que com MTA. Para ambos os grupos, a ponte de tecido duro se apresentava convexa, invadindo parte da polpa subjacente e, muitos defeitos em túnel preenchidos com vasos

sangüíneos foram observados. Desorganização tecidual associada com necrose pulpar e ausência de formação de ponte de dentina completa ocorreu somente quando bactérias foram evidenciadas sobre o sítio da exposição pulpar.

### *Proteínas bioativas*

A descoberta das proteínas bioativas deve-se aos achados preliminares de Urist<sup>121</sup> (1971) que observou formação de tecido ósseo quando uma matriz de dentina desmineralizada foi implantada em vários sítios em animais. A partir desta observação, muitos pesquisadores têm se empenhado em identificar os componentes da matriz óssea e da dentina e passaram a estudar, de maneira efetiva, a contribuição destes componentes isolados ou em associação, no mecanismo de reparação tecidual e indução de síntese de tecido duro.

Urist<sup>121</sup> (1971) avaliou a morfogênese e a histogênese óssea após implantes de esmalte e dentina desmineralizados em músculos, defeitos ósseos mandibulares e alvéolos dentários de cães, gatos, coelhos e ratos. Foram implantadas matrizes de esmalte de dentes recém-erupcionados de cães, desidratadas e desmineralizadas em solução de HCl 0,6 N a 2°C em músculos da parede anterior da cavidade abdominal de cães e gatos por 4 a 6 semanas. As células mesenquimais das áreas adjacentes ao implante de matriz de esmalte se deslocaram até a superfície deste e se diferenciaram, formando uma mistura de tecido duro acelular e celular, semelhante ao tecido ósseo de certos peixes. Quando o autor implantou matriz de dentina desmineralizada nos músculos destes animais, houve formação de tecido ósseo, osso lamelar e osso medular. A propriedade morfogenética de indução óssea da dentina foi perdida quando a matriz

foi exposta a solventes químicos que desnaturaram ou desorganizaram o modelo tridimensional das fibras protéicas. O padrão morfogenético na dentina foi mais estável do que na matriz óssea, quando as proteínas foram extraídas em EDTA, HCl e ácido láctico, enquanto foi altamente instável em soluções alcalinas. Nos defeitos ósseos mandibulares, as matrizes de dentina desmineralizadas foram reabsorvidas e induziram a formação mais lenta de tecido ósseo. Nos alvéolos dentários, a dentina desmineralizada foi responsável pela formação de uma massa de tecido ósseo no centro do defeito. Por meio dos resultados obtidos, o autor concluiu que matrizes desmineralizadas de esmalte e dentina alogênicas apresentam propriedade óssea morfogenética quando implantadas nos músculos, nos defeitos ósseos e no interior de alvéolos de animais. Sugeriu, também, que estas novas descobertas poderiam ser essenciais para o tratamento de defeitos ósseos ortopédicos e periodontais.

Em 1974, Jones e Leaver<sup>47</sup> isolaram e fracionaram a matriz não-colagenosa total da dentina humana, com a finalidade de obter informações sobre a natureza de seus componentes. Para isto, foi realizada a desmineralização da dentina com EDTA a 10%, pH 7,5 a 4°C durante oito dias, com trocas a cada 24 horas, seguida da digestão pela colagenase, ambos procedimentos realizados em recipientes para diálise. Uma amostra da matriz não colagenosa de osso humano foi obtida através dos mesmos procedimentos. As matrizes não-colagenosas do osso e da dentina ao serem submetidas à eletroforese gel e à focalização iso-elétrica por 16 horas a 100V, alterando-se o pH de 3 a 10, demonstraram conter cerca de 20 componentes distintos, sendo estes diferentes nos dois tecidos, característica comprovada pelo fracionamento através da cromatografia no DEAE-celulose. Foram isoladas da dentina humana duas

glicoproteínas aniônicas, uma contendo 2,5% de ácido siálico e a outra livre do ácido, e uma proteoglicana contendo condroitin sulfato.

Leaver et al.<sup>53</sup> (1975) estudaram os componentes das matrizes orgânicas de osso bovino e de dentina humana, as quais foram desmineralizadas e submetidas à extração com EDTA 10%, pH 7,5, seguido por extração com solução de uréia a 8M e citrato de sódio tamponado a 0,4M, pH 5,0. As matrizes insolúveis foram digeridas pela colagenase e as frações não colagenosas foram separadas pela cromatografia DEAE-celulose, seguida por filtração gel. Foi observado que as frações não colagenosas eram compostas, no osso, por 5,6% de hidroxiprolina, 1,4% de hexose e 0,04% de ácido siálico; enquanto na dentina, por 5,6% de hidroxiprolina, 2,5% de hexose e 0,04% de ácido siálico. A composição principal da fração liberada pela colagenase, do osso bovino, foi a sialoproteína (CRS) e um componente contendo mais de 90% de proteína (CRP). Já o material da dentina humana liberado pela colagenase continha, praticamente, uma única proteína semelhante ao CRP do osso bovino.

Thomas e Leaver<sup>108</sup> (1975) tiveram como finalidade identificar e quantificar, na dentina humana, a presença de proteínas do soro, tais como albumina, transferina e as imunoglobulinas IgG, IgA e IgM. Para a realização do experimento, foi isolada a matriz não colagenosa total da dentina através da extração por EDTA, seguida da digestão por colagenase. As proteínas foram identificadas através da técnica de difusão dupla e sua quantificação foi realizada através da técnica de imunodifusão radial. As imunoglobulinas foram, também, estudadas através da técnica de eletro-imunodifusão, entretanto os resultados não foram precisos para a quantificação exata. O método de imunodifusão radial foi capaz de identificar até as menores quantidades das proteínas,

sendo encontradas em um grama de matriz não colagenosa da dentina humana, 20 mg de albumina, 2,1 mg de transferrina, 4 mg de IgG e 0,24 mg de IgA e de IgM.

Butler et al.<sup>11</sup> (1977) tiveram como objetivo, remover todos os componentes solúveis da matriz de dentina de ratos sem prejudicar a atividade das BMPs e, caracterizar as proteínas não colagenosas remanescentes na matriz insolúvel. Incisivos superiores e inferiores de ratos foram extraídos, liofilizados e estocados até a preparação da dentina desmineralizada. A matriz de dentina insolúvel obtida através das etapas de desmineralização e lavagens sequenciais foi, finalmente, liofilizada e implantada em músculos da parede abdominal de ratos adultos. Após 2 e 4 semanas os implantes foram removidos, analisados radiografica e histologicamente para detecção de osso e cartilagem, sendo que as amostras tiveram seu peso seco determinado. As amostras da matriz de dentina também foram purificadas com colagenase bacteriana e as proteínas foram separadas por cromatografia de troca aniônica em DEAE-celulose. Os resultados mostraram que 2 semanas após a realização do implante, numerosos pontos de cartilagem e pequena quantidade de osso estava presente, sendo que no período de 4 semanas a quantidade era maior, o que levou os autores a concluir que a matriz orgânica de dentina de rato é uma fonte rica em BMPs. Três proteínas foram separadas por cromatografia de troca aniônica em DEAE-celulose. Duas das proteínas não colagenosas eram ricas em asparto, glutamato, glicina, serina e alanina, e exibiram composição similar às proteínas ácidas de outros tecidos conjuntivos. A terceira proteína não colagenosa mostrou pela composição de aminoácidos, ser o asparto, fosfoproteína rica em serina, que ocorre principalmente na forma solúvel na dentina de rato. Esta observação sustenta a hipótese de que a porção de fosfoproteína da dentina está firmemente aderida.

Leaver et al.<sup>52</sup> (1978) estudaram as frações da matriz orgânica da dentina humana insolúveis em colagenase. Para isso, realizaram a desmineralização da matriz dentinária com EDTA e a digestão pela colagenase, obtendo o material insolúvel que foi submetido a procedimentos de extração com solução de uréia a 8 M para a identificação de hidroxiprolina, hexose, ácido siálico, ácido urônico e hexosamina. Os resultados sugeriram que a fração insolúvel da dentina humana apresenta 10% de matriz orgânica colagenosa e sua análise pela cromatografia no DEAE-celulose demonstrou que esta consistiu, principalmente, de uma glicoproteína desconhecida.

Smith e Leaver<sup>99</sup> (1979) analisaram os componentes não colagenosos da matriz orgânica da dentina. Para isto, incisivos de coelhos albinos foram extraídos, tiveram as polpas removidas, as superfícies limpas com curetas, o esmalte removido e o restante triturado. O pó da dentina foi desmineralizado em EDTA 10% num pH 7,5 a 4°C. Os resíduos insolúveis foram removidos, o extrato de EDTA liofilizado e submetido ao focalizador isoelétrico. O extrato de EDTA ainda foi submetido à eletroforese com acetato de celulose e gel, ao fracionamento através do DEAE-celulose, fracionamento por filtragem gel e análise das frações através da coluna de cromatografia. Os resultados mostraram que os extratos de EDTA da dentina de incisivos de coelhos fracionados pela cromatografia DEAE-celulose resultaram em 5 frações, 2 das quais foram separadas pela filtragem gel em 3 outras frações. Oito de um total de 9 frações foram analisadas. Quatro eram glicoproteínas menos ácidas, semelhantes às frações correspondentes da dentina humana. Três frações eram glicoproteínas aniônicas com algumas similaridades à dentina humana, mas contendo pouco fósforo. A fração final da DEAE-celulose pareceu ser uma proteoglicana consistindo principalmente de condroitin-4-sulfato

associada a uma proteína menos ácida do que as frações correspondentes da dentina humana e do osso bovino.

Lesot et al.<sup>54</sup> (1986) analisaram os efeitos das proteínas não-colagenosas extraídas da dentina sobre culturas isoladas do órgão do esmalte e da papila dentária. Foram preparadas sete frações de proteínas não-colagenosas extraídas da dentina de incisivos de coelhos, as quais foram usadas como substrato para cobrir filtros de milipore, sobre os quais foram cultivados por 4 dias, os tecidos de germes de molares inferiores de ratos. No grupo controle, os filtros de milipore não foram recobertos pelas frações das proteínas. As análises histológica e citológica mostraram que apenas as frações 5 e 6 das proteínas influenciaram o comportamento das células epiteliais do órgão do esmalte, provocando ligeiro alongamento e o posicionamento dos seus núcleos no polo basal, em contato com o filtro. A interação das frações 2 e 6 com as células mesenquimais da papila dentária resultou em células alongadas, polarizadas e com alta atividade metabólica. Os resultados mostraram que as modificações na organização celular, implicando em mudanças na organização do citoesqueleto e/ou na atividade das células, não ocorrem espontaneamente ou na presença isolada de colágeno (tipos I a IV), laminina ou fibronectina.

Com o objetivo de avaliar o efeito da BMP na formação de dentina reparadora, Nakashima<sup>63</sup> (1990) realizou o capeamento do tecido pulpar remanescente após pulpotomia de 50 dentes de 5 cães com frações de BMP extraídas da matriz óssea de cães. No grupo controle, foi utilizada albumina extraída do soro de cães como material capeador. Os animais foram sacrificados nos períodos de 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório e os dentes foram desmineralizados e preparados para avaliação histológica.

A formação da dentina reparadora iniciou com resposta imune suave mediada por células inflamatórias, seguida por reabsorção das BMPs e proliferação de células mesenquimais fusiformes, juntamente com invasão vascular. Aos 30 dias de pós-operatório, foram observados osteodentinoblastos envoltos pela matriz em formação e/ou osteodentinócitos aprisionados em osteodentina em algumas partes da cavidade, estando as outras regiões preenchidas por tecido pulpar. Após 60 dias, os odontoblastos produziram dentina tubular próxima à osteodentina, enquanto no grupo controle, apenas a osteodentina estava presente. Os resultados sugeriram que as BMPs estimulam a mitose das células mesenquimais, podendo induzir a diferenciação de osteodentinoblastos que depositam a osteodentina, a qual pode apresentar um papel importante na diferenciação de odontoblastos. O autor acredita que as BMPs apresentam propriedades desejáveis como agente capeador pulpar, já que são capazes de produzir grandes quantidades de dentina reparadora em polpas amputadas, sem provocar alterações no tecido pulpar radicular.

Smith et al.<sup>101</sup> (1990) avaliaram a atividade das proteínas dentinárias morfogenéticas (DMPs) em polpas de dentes de “ferrets”. Foram confeccionadas cavidades de classe V na face vestibular dos caninos dos animais adultos jovens (4 meses) e velhos (3 anos), as quais tiveram a polpa exposta com o auxílio de uma sonda clínica. As polpas foram capeadas com 100 µg de proteínas da matriz extracelular não colagenosa da dentina de coelhos. Nos grupos controle foi utilizada ou não, sobre o tecido pulpar remanescente, a albumina de coelhos. As cavidades foram restauradas com discos de teflon e cimento de óxido de zinco e eugenol. Os animais foram sacrificados aos 14 e 28 dias de pós-operatório e as peças cirúrgicas foram preparadas para análise histológica. Para os animais adultos velhos, foi observado, no grupo

experimental, a deposição de osteodentina na interface dentina/polpa. Por outro lado, nos animais mais jovens, houve formação de uma dentina reparadora semelhante à estrutura da dentina tubular primária na interface dentina/polpa, ao longo das paredes da exposição e em alguns dentes, no assoalho da cavidade. Células odontoblastóides colunares e polarizadas foram encontradas lineando a matriz dentinária recém depositada, a qual foi caracterizada pela presença de túbulos dispostos perpendicularmente àqueles encontrados no assoalho da cavidade. Em ambos os grupos, a resposta pulpar observada aos 14 dias foi acentuada aos 28 dias. Os grupos controle não mostraram evidências de processo reparador. Apenas alguns dentes dos animais mais jovens apresentaram discretos sinais de reparação. Os resultados indicaram que as proteínas da matriz dentinária foram capazes de induzir a dentinogênese reparadora *in vivo*, demonstrando sua propriedade morfogenética.

Tziafas e Kolokuris<sup>113</sup> (1990) investigaram os efeitos de implantes autógenos de dentina desmineralizada e de matriz óssea nas células ectomesenquimais de dentes de cães. A dentina e a matriz óssea foram obtidas, respectivamente, das coroas de pré-molares decíduos e da cortical óssea vestibular da maxila de cães. Após desmineralização por 5 dias com ácido acético a 3% a uma temperatura de 2°C, estas foram implantadas na polpa ou em áreas da papila dos primeiros molares, quartos pré-molares e caninos em erupção, onde foram mantidas por duas ou três semanas. No tecido pulpar, a dentinogênese e a organização odontoblástica foram demonstrados em todos os casos de implante de dentina, enquanto que, em contato com os implantes ósseos, foi observada a deposição de osteodentina, seguida da formação de pré-dentina tubular em algumas áreas. Na papila dental, os implantes dentinários formaram tecido semelhante à matriz óssea e os implantes de matriz óssea foram encapsulados por tecido

conjuntivo fibroso com número reduzido de células. As interações das células pulpares com a matriz de dentina desmineralizada constituíram um modelo para indução experimental de dentinogênese secundária e diferenciação de células odontoblastóides.

Bessho et al.<sup>5</sup> (1991) analisaram a composição da BMP extraída da dentina humana e avaliaram sua atividade óssea morfogenética. Para realização do experimento extraíram a proteína morfogenética da matriz dentinária humana com 4 mol/L de ácido clorídrico-guanidina e a purificaram por cromatografia líquida. Para a avaliação da sua atividade “in vivo”, a BMP purificada extraída da dentina humana foi implantada nos músculos de panturrilhas de ratos. Num período de três semanas, a BMP da dentina induziu a formação óssea *in situ*, comprovando uma atividade semelhante àquela da BMP derivada da matriz óssea. Através de processos de eletroforese, os autores observaram a homogeneidade da BMP e seu peso molecular foi estimado em 20 kDa. A análise de aminoácidos mostrou que a BMP é uma proteína contendo 191 aminoácidos, sendo os 11 iniciais codificados como: Ala-(Leu ou Pro)-Gly-Leu-Gly-Asp-Ala-Pro-Lys-Ser-Thr-, o que sugeriu que a BMP derivada da matriz dentinária não é idêntica, mas similar a BMP derivada da matriz óssea.

Nakashima<sup>64</sup>, em 1992, examinou em cultura de células primárias de polpas de dentes permanentes bovinos, os efeitos das proteínas ósseas morfogenéticas derivadas das matrizes óssea e dentinária, na proliferação e produção de matriz extracelular, além de sua função biológica. Para a realização do experimento, as proteínas foram testadas sobre a cultura de células em 4 diferentes estágios: estágio de proliferação (células estreladas proliferando por volta do 13º dia), estágio estacionário (convergência celular dos 14 aos 39 dias), estágio de multi-camadas (células dispostas em camadas e

formação de nódulos entre os dias 21 e 34) e estágio de calcificação inicial (calcificação ao redor das células pré-odontoblastóides após 40 dias). As proteínas ósseas morfogenéticas derivadas das matrizes óssea e dentinária estimularam a incorporação do [<sup>125</sup>I] - deoxuridina na ausência de soro fetal bovino a 10% e aumentaram a incorporação de [<sup>35</sup>S] – sulfato, no estágio de proliferação. Nenhum efeito foi obtido no estágio estacionário da cultura. Tanto na cultura suplementada com 10% de soro fetal bovino, como naquela não suplementada, a atividade da fosfatase alcalina foi inibida nos estágios de proliferação, estacionário e de multi-camadas. Foi observado um aumento na síntese de osteocalcina na cultura tratada com BMP do 2º ao 10º dia. As BMPs, óssea e dentinária, estimularam a síntese de proteoglicanas no estágio de proliferação, mostrando que os efeitos foram dependentes do estágio de diferenciação das células. Os resultados desta pesquisa sugeriram que as BMPs podem ter uma atividade mitogênica e apresentar papel importante na regulação da diferenciação de células pulpares em odontoblastos.

Robson e Katz<sup>82</sup> (1992) com o intuito de avaliar a capacidade indutora de dentinogênese da matriz de dentina desmineralizada, realizaram exposições pulpares com fresas diamantadas em primeiros molares de 16 ratos e as capearam com partículas de dentina desmineralizada em ácido clorídrico ou partículas de dentina desmineralizada extraídas com guanidina. Em seguida, as cavidades foram restauradas com cimento de ionômero de vidro. Os animais foram sacrificados após período de duas semanas e as peças cirúrgicas removidas e preparadas para a análise histológica. Em ambos os grupos, foram observadas poucas células inflamatórias no tecido pulpar abaixo da área da exposição, presença de células odontoblastóides adjacentes às partículas dentinárias e, presença de ponte de dentina em processo de formação, contendo partículas

incorporadas. Os odontoblastos ao longo da parede interna da câmara pulpar adjacente ao local da exposição secretaram uma quantidade aumentada de pré-dentina em resposta à agressão. Portanto, o exame histológico sugeriu que as partículas de dentina desmineralizada provêm uma superfície adequada para a adesão de odontoblastos, estimulando a produção de osteodentina reparadora.

Tziafas et al.<sup>118</sup> (1992) investigaram as respostas iniciais das células ectomesenquimais da polpa dentária e determinaram as condições necessárias para a diferenciação de novos odontoblastos. Matriz dentinária desmineralizada ou não e pré-dentina, foram implantadas no tecido pulpar dos primeiros molares de 5 cães. As respostas pulpares foram analisadas histologicamente aos 3, 7 e 10 dias de pós-operatório, enquanto que as superfícies estruturais do novo tecido formado foram avaliadas aos 12 e 28 dias após os implantes. Foi observada a diferenciação de células odontoblastóides próximas aos implantes de pré-dentina e, em resposta aos implantes desmineralizados, grupos de células odontoblastóides diferenciadas foram observados em associação com uma zona de matriz de forma polar, com padrão semelhante a pré-dentina secretada por células colunares dispersas. A resposta das células pulpares à dentina não desmineralizada foi caracterizada pela formação de duas camadas de matriz, uma fibrosa e outra depositada de forma polar, antes do início da dentinogênese secundária. Os resultados da microscopia eletrônica de varredura das matrizes depositadas ao redor dos implantes sugeriram que a dentinogênese é iniciada pela indução direta de células odontoblastóides e pela síntese indireta da matriz que controla a polarização das células. Os autores concluíram que a organização odontoblástica e o início da dentinogênese secundária requerem a presença de uma matriz não

mineralizada de origem ectomesenquimal, sintetizada por odontoblastos primários ou por células do parênquima pulpar.

Lianjia et al.<sup>55</sup> (1993) avaliaram a capacidade da proteína óssea morfogenética extraída de osso bovino (BMP) induzir a diferenciação das células pulpares e formação de dentina reparadora. Para isto, os autores realizaram exame imunohistoquímico em culturas de tecido pulpar de embriões humanos e de células pulpares de dentes permanentes jovens humanos, utilizando anticorpo monoclonal contra BMP. A formação de dentina induzida pela BMP óssea também foi estudada em dentes de cães, os quais tiveram o tecido pulpar remanescente de incisivos, caninos e pré-molares pulpotomizados capeados com BMP ou hidróxido de cálcio. A incorporação do marcador fenotípico [<sup>3</sup>H] timidina e a atividade da fosfatase alcalina também foram analisadas. Através dos resultados, constataram a presença da BMP nos odontoblastos, pré-dentina, matriz de esmalte e principalmente nos ameloblastos. No grupo em que a BMP foi utilizada na cultura de células, observaram uma maior incorporação do marcador e da atividade da fosfatase alcalina. Nas culturas de tecido pulpar, a BMP induziu a diferenciação das células mesenquimais em células odontoblastóides e, quando utilizada como agente capeador em dentes de cães, induziu formação de osteodentina e dentina tubular. Estes resultados sugeriram que a BMP apresenta papel importante na diferenciação de odontoblastos e formação de dentina reparadora, podendo ser considerada uma boa alternativa como agente capeador direto de polpas expostas.

Rutherford et al.<sup>85</sup>, em 1993, tiveram como objetivo determinar se a quantidade de dentina reparadora estimulada pela hOP-1 está relacionada à quantidade de

proteína/matriz de colágeno utilizada no capeamento pulpar direto. Exposições pulpares recém confeccionadas em 30 molares e pré-molares de 4 macacos foram capeadas com várias quantidades do complexo hOP-1 e uma matriz carreadora de pó de colágeno bovino tipo 1 purificado misturado com solução salina. O grupo 1 consistiu de 2,5 µg de hOP-1 / mg de colágeno variando de 1,5; 3,0; 6,0 mg/dente; grupo 2 – hidróxido de cálcio (Dycal); grupo 3 – colágeno (3,0 mg/dente); e grupo 4, no qual nenhum material foi aplicado. As cavidades foram restauradas com Temp-Bond NE. Os animais foram sacrificados após 6 semanas, os dentes foram removidos, fixados, desmineralizados, incluídos em parafina, cortados seriadamente (5 µm) e corados com hematoxilina/eosina. Após serem capturadas as imagens com câmara de vídeo acoplada ao microscópio, foi feita a análise histomorfométrica. Foi observada a formação de dentina reparadora em todos os dentes tratados com hOP-1/matriz de colágeno que permaneceram selados durante as 6 semanas de pós-operatório. Uma maior quantidade de dentina recém-formada estava presente nos dentes tratados com hOP-1/matriz de colágeno do que naqueles tratados com o hidróxido de cálcio. A quantidade de dentina reparadora formada foi proporcional à quantidade de hOP-1/matriz de colágeno aplicada ( $p < 0,05$ ). Nenhuma dentina reparadora foi formada nos dentes capeados somente com a matriz de colágeno ou sem nenhum material capeador. A aparência do novo tecido sugeriu que muito do material hOP-1/matriz de colágeno foi substituído primeiramente por um tecido conjuntivo semelhante à polpa, o qual foi mineralizado para formar a dentina reparadora. Estes dados sugerem que a OP-1 pode ter um papel ativo na dentinogênese e quando combinada com a matriz de colágeno é clinicamente eficaz como agente capeador.

Tziafas et al.<sup>116</sup> (1993) avaliaram se a expressão do fenótipo das células odontoblastóides e a iniciação da histogênese dentinária poderiam ser, experimentalmente, induzidas em polpas maduras em resposta a fatores exógenos. Segundos pré-molares de cães foram extraídos e, a dentina coronária foi cortada em fatias longitudinais, sendo uma parte delas desmineralizada em ácido acético 0,5N por 6 a 7 dias, e a outra colocada em solução salina fosfatada tamponada (PBS). Após a completa desmineralização, as fatias foram cortadas em peças retangulares e as fatias não desmineralizadas foram quebradas em pequenas peças, contendo a superfície da pré-dentina e da dentina. Todas as peças foram tratadas em PBS contendo 3% de penicilina e estreptomicina. As polpas de pré-molares, primeiros molares e caninos de dois cães foram expostas e, implantes de dentina desmineralizada e de dentina não desmineralizada foram, delicadamente, introduzidos no tecido pulpar. Em seguida, os dentes foram selados com discos de Teflon e cimento de óxido de zinco e eugenol, e extraídos em períodos pós-operatórios de 2 a 6 semanas. Após extração dos dentes, estes tiveram a porção apical das raízes removida e a porção restante de cada dente foi fixada, desmineralizada em ácido fórmico a 10% e embebida em parafina. Em seguida, foram realizados cortes seriados, os quais foram corados com Brown-Brenn, hematoxilina-eosina e tricrômico de Gomori. Alguns espécimes, após fixação, tiveram suas cavidades pulpares abertas e os implantes removidos, imersos em hipoclorito de sódio a 1% por 4 horas e desidratados em álcool para exame por meio da microscopia eletrônica de varredura. Foi observada a formação de dentina reparadora somente nos dentes capeados com matriz de dentina não desmineralizada. Os implantes de dentina desmineralizada foram degradados ou encapsulados por tecido conjuntivo fibroso. Através da microscopia eletrônica de varredura foi identificado aumento na deposição de dentina ao redor dos implantes de dentina natural. Os resultados sugeriram que a

dentina natural apresenta influência indutiva específica quando exposta ao tecido pulpar de dentes adultos, sendo capaz de induzir a diferenciação direta de células odontoblastóides e de aumentar a atividade biosintética dos odontoblastos primários.

Nakashima<sup>65</sup> (1994) avaliou a capacidade das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) -2 e -4 de induzir a formação de dentina reparadora em dentes pulpotomizados de cães, quando associadas à matriz de dentina desmineralizada. As matrizes dentinárias foram extraídas de incisivos permanentes de bovinos e, em seguida, foram desmineralizadas e adicionadas a 2µg de BMP-2 ou -4. Foi utilizada uma mistura de 10 mg de matriz de dentina inativada e pulverizada, 0,5 mg de condroitin-6-sulfato de sódio e 250 µg de colágeno tipo I como carreador. As polpas remanescentes dos terceiros incisivos superiores e caninos superiores e inferiores de 2 cães, foram capeadas com BMP-2 + carreador, BMP-4 + carreador, ou somente com o carreador, utilizado como controle. As cavidades foram seladas com cimento de fosfato de zinco e resina composta. Após um período de 60 dias, os animais foram sacrificados e as peças preparadas para o exame histológico. Em ambos os grupos experimentais, houve formação de osteodentina, seguida de dentina tubular irregular. No grupo em que foi utilizado apenas o carreador, todas as partes da cavidade foram preenchidas com tecido pulpar e a quantidade de dentina tubular formada foi significativamente reduzida. Não houve sinal de inflamação em todos os dentes avaliados. A análise dos resultados sugeriu que as BMPs-2 e -4 induzem a diferenciação de células pulpares em odontoblastos e podem ser consideradas alternativas para o capeamento pulpar, pela capacidade de induzir a formação de dentina reparadora.

Nakashima<sup>66</sup>, em 1994, avaliou os efeitos da proteína óssea morfogenética recombinante humana (BMP) -2, BMP-4 e do fator de crescimento (TGF- $\beta$ 1), combinados com a matriz de colágeno, na regeneração pulpar e formação de dentina. Foram utilizados 18 dentes de 3 cães, nos quais foram realizadas pulpotomias. Os dentes foram divididos em grupos de acordo com o material capeador e as doses utilizadas: BMP-2 nas doses 220, 660 e 2000 ng, 4  $\mu$ g de BMP-4 e 2  $\mu$ g de TGF- $\beta$ 1 recombinante humano. O carreador para as BMPs e TGF- $\beta$ 1 foi 1 mg de colágeno tipo I. O grupo controle consistiu no capeamento das polpas apenas com colágeno. Após 70 dias, os animais foram sacrificados e os dentes processados para análise histológica. Foi observado um tecido semelhante a osteodentina, contendo osteodentinócitos, tecido fibroso não mineralizado e perda de tecido conjuntivo quando aplicado 2  $\mu$ g (200ng) de BMP-2 na cavidade. Nos dentes onde foram colocados 660 ng de BMP-2 somente fibras não mineralizadas e tecido pulpar foram observados. Nos dentes, onde foram aplicados 220 ng de BMP-2 ou colágeno sozinho foi observado somente tecido pulpar. Dentina semelhante a osteodentina também foi observada quando implantados 4  $\mu$ g de BMP-4 e colágeno. Nos dentes onde foi colocado TGF- $\beta$ 1, o colágeno permaneceu na cavidade e pouca proliferação de tecido pulpar foi observada, sugerindo um possível efeito inibitório do TGF- $\beta$ 1 na regeneração. Segundo o autor, os resultados sugerem que a resposta pulpar é dose dependente e que seria necessário a presença de algum outro componente da matriz de dentina para a diferenciação de odontoblastos e formação de dentina tubular.

Nakashima et al.<sup>67</sup> (1994) estudaram a expressão de genes específicos durante a diferenciação de células pulpares em pré-odontoblastos. Estudaram, também, os efeitos

das BMPs e TGF- $\beta$ 1 na proliferação celular, na formação de matriz extracelular e na diferenciação dos pré-odontoblastos. Para isso, utilizaram cultura de células pulpares de incisivos de bovinos adultos e análise de “Northern Blot” nos dias 0, 7, 14, 21 e 28. Quando a proliferação celular estava baixa após 14 dias da cultura primária, observaram o aumento da expressão de fibronectina e de RNAm para colágeno tipo I e III. A expressão da fosfatase alcalina aumentou gradualmente, enquanto o RNAm para osteocalcina, um marcador de pré-odontoblasto apareceu apenas após o início da mineralização. Houve o desaparecimento da expressão do RNAm para TGF- $\beta$ 1 no 21º dia, quando aumentou a expressão do RNAm para fosfatase alcalina. Na cultura expandida, a expressão do RNAm para proteínas da matriz extracelular, e para fosfatase alcalina e osteocalcina aumentou gradualmente do início da cultura até do 28º dia. O RNAm para BMP-4 estava expressado no dia 14 quando a expressão de proteínas da matriz extracelular estava aumentada, enquanto que o RNAm para BMP-2 foi expresso no dia 28 quando apareceu a osteocalcina. A atividade da fosfatase alcalina foi inibida pelo TGF- $\beta$ 1 e estimulada pelas BMPs -4 e -2. A BMP-4 aumentou a expressão de RNAm do colágeno  $\alpha$ 1, e a BMP-2 aumentou a síntese de osteocalcina. Estes resultados demonstraram o papel regulatório dos membros da superfamília TGF- $\beta$  na expressão de gene de proteínas da matriz extracelular e na diferenciação de células pulpares em pré-odontoblastos.

Rutherford et al.<sup>86</sup> (1994) testaram a capacidade das proteínas osteogênicas recombinantes humanas (hOP-1) em preservar a vitalidade pulpar e induzir a formação de dentina reparadora quando colocada diretamente sobre o remanescente pulpar após pulpotomia. Os efeitos do tratamento das polpas com soluções de EDTA seguido por hipoclorito de sódio ou solução salina também foram determinados. Para realização do

experimento, foram utilizados 64 incisivos, pré-molares e molares de quatro macacos. Os dentes foram isolados, as polpas expostas com alta rotação e amputadas com fresas esterilizadas em baixa rotação, ao nível da entrada dos canais radiculares. Metade das câmaras pulpares expostas foram irrigadas com solução de EDTA 17% esterilizada ou com solução salina seguido de lavagem com solução de hipoclorito de sódio a 1% ou soro fisiológico. As polpas foram capeadas com 1 a 2 mg de rOP-1/mg de matriz de colágeno (2.5 µg hOP-1/matriz de colágeno) ou matriz de colágeno sem hOP-1 umedecido em solução salina. As câmaras pulpares foram preenchidas com Ketac Silver e os dentes restaurados com amálgama. Cinquenta dentes tratados com hOP-1/matriz de colágeno e 8 dentes tratados com matriz de colágeno foram analisados histologicamente para formação de dentina reparadora, após 1, 2, 4 e 6 meses. A polpa radicular foi mantida, houve formação de dentina reparadora e a mineralização estava aproximadamente 75% completa após 1 mês de pós-operatório e mais de 95% após 4 meses. A irrigação da polpa com EDTA ou solução salina não teve nenhuma diferença significativa com relação à vitalidade pulpar e à formação de dentina reparadora. Os resultados também mostraram que um número significativamente maior de polpas irrigadas com hipoclorito de sódio tornaram-se não vitais e o canal radicular de todos os dentes não vitais continham bactérias no seu interior.

Smith et al.<sup>102</sup> (1994) investigaram os efeitos das proteínas da matriz dentinária na atividade secretora dos odontoblastos. As proteínas usadas no estudo foram as frações solúveis em EDTA e liberadas pela colagenase, obtidas de incisivos de coelhos. Foram utilizados os caninos de “ferrets” adultos jovens, nos quais foram preparadas cavidades classe V padronizadas na vestibular sem exposição pulpar. As cavidades foram lavadas com solução salina, esterilizadas e secas, antes da colocação de 100 µg

de proteínas da matriz dentinária sobre a parede pulpar. Em seguida, foi colocado um disco de Teflon e as cavidades foram restauradas com cimento de óxido de zinco e eugenol. No grupo controle as cavidades foram capeadas com albumina sérica de coelhos ou não receberam nenhum material capeador. Os animais foram sacrificados aos 2, 5, 14, 28 e 90 dias após o procedimento e, as peças removidas foram processadas para análise histológica. O exame dos dentes em períodos curtos (2 e 5 dias) mostraram que não havia ocorrido morte dos odontoblastos como resultado do procedimento operatório e nenhuma deposição de dentina reacional foi observada abaixo do assoalho das cavidades. Aos 14 dias, havia uma significativa deposição de dentina reacional tubular abaixo da cavidade, e esta resposta aumentou de maneira não linear com o aumento do tempo. A deposição de nova matriz extracelular pôde ser observada sob os implantes de ambas as frações dos componentes da matriz, embora a resposta pareceu um pouco maior com a fração solúvel em EDTA do que com a liberada pela colagenase. Nas cavidades controle sem os componentes da matriz dentinária não foi observada deposição de dentina reacional. Os autores concluíram que os mecanismos da estimulação dos odontoblastos pela matriz dentinária ainda precisam ser esclarecidos, no entanto, sugerem que podem ser mediados por fatores de crescimento dentro das preparações de matriz de dentina.

Rutherford et al.<sup>87</sup> (1995) testaram a capacidade da proteína osteogênica recombinante humana 1 (OP-1) solubilizada em induzir a formação de dentina quando colocada em assoalho de cavidades recém-confecionadas em dentes permanentes de macacos. Para a realização do experimento, foram utilizados 90 incisivos, pré-molares e molares de 5 macacos machos adolescentes, nos quais foram confeccionadas cavidades classe V. O assoalho das cavidades foi protegido com 1 µl de uma solução contendo

0.01, 0.1, 1 ou 10 µg de OP-1/µl de ácido/alcool (28,5 % etanol, 0,025 % HCl). Os demais grupos receberam só 1µl de ácido-alcool, uma fina camada de hidróxido de cálcio (Dycal) ou não receberam nenhum cimento (sem tratamento). Todas as cavidades foram restauradas com Ketac Silver. Após 2 meses, os animais foram sacrificados e os dentes preparados para análise histológica. Os resultados mostraram que quando a OP-1 (10µg) foi aplicada no assoalho da cavidade estimulou significativamente maior deposição de dentina reacional do que todos os outros tratamentos testados, incluindo o hidróxido de cálcio. A resposta à aplicação do OP-1 foi dependente da concentração da proteína bem como da espessura de dentina remanescente.

Smith et al.<sup>103</sup> (1995) investigaram a importância da matriz dentinária insolúvel como um substrato para potencializar a atividade dos fatores de crescimento durante a dentinogênese reparadora. Também analisaram, se a imobilização dos componentes da matriz extracelular dentinária solúvel seria suficiente ou se interações sinérgicas com a matriz existente seriam necessárias para potencializar a atividade dos fatores de crescimento da fração inativa. A partir da matriz dentinária extracelular de incisivos de coelhos, foram preparadas frações solúveis em EDTA e frações liberadas pela colagenase. Cavidades de classe V padronizadas com exposições pulpares realizadas com sonda exploradora foram confeccionadas na vestibular de caninos de “ferrets” adultos jovens. Em seguida, o tecido pulpar foi capeado com implantes dos componentes da matriz dentinária, imobilizados em membranas de 1 mm de diâmetro de nitrocelulose ou milipore, e as cavidades foram seladas com discos de teflon e cimento de óxido de zinco e eugenol. No grupo controle, as membranas não foram impregnadas com componentes da matriz extracelular. Após os períodos de 14 e 28 dias, os animais foram sacrificados e as peças contendo os dentes e o tecido ósseo

circunjante foram removidas e preparadas para o exame histológico. A formação de dentina reparadora e a diferenciação de células odontoblastóides não foram observadas nos locais da exposição nos grupos experimentais e controle. A natureza das membranas não influenciou na resposta reparadora. Os dentes capeados com os implantes impregnados nas membranas de nitrocelulose não demonstraram evidências de reparo tecidual, entretanto, foi observada uma reação inflamatória significativa no tecido pulpar e, em alguns casos, a reabsorção da matriz dentinária existente em áreas adjacentes à exposição. As membranas de milipore se mostraram mais biocompatíveis, demonstrando reação inflamatória reduzida e localizada com ausência de células gigantes multinucleadas e de reação de corpo estranho. Houve também, ausência de reabsorção na matriz dentinária. Estes dados indicaram que a matriz dentinária insolúvel fornece um substrato importante para imobilizar e potencializar a atividade dos fatores de crescimento dos componentes solúveis isolados da matriz dentinária extracelular, na indução de dentinogênese reparadora.

Segundo Smith et al.<sup>104</sup> (1995) a dentinogênese reacional é a secreção de matriz de dentina terciária por odontoblastos que sobreviveram em resposta a um determinado estímulo. O estímulo pode ser de natureza exógena, ou endógena através dos componentes teciduais liberados da matriz durante o processo patológico. O implante de componentes da matriz extracelular isolados da dentina, em cavidades sem exposição pulpar em dentes de “ferrets”, levaram a estimulação dos odontoblastos subjacentes e, conseqüentemente, a uma resposta de dentinogênese reacional. A afinidade cromatográfica dos componentes ativos antes da implantação e a análise dos fatores de crescimento indicaram que este material continha significativas quantidades de TGF- $\beta_1$ , um fator de crescimento que influencia a diferenciação dos odontoblastos e o

comportamento de secreção. A dentinogênese reacional durante a cárie dental provavelmente resulta da solubilização destes fatores de crescimento, TGF- $\beta$  em particular, da matriz de dentina a qual é responsável por iniciar o efeito estimulatório nos odontoblastos. As diferenças na composição da matriz de dentina terciária abaixo da lesão cariada em dentes humanos também foram mostradas, indicando uma modulação na secreção do odontoblasto durante a dentinogênese reacional ou reparadora.

Por meio de revisão de literatura Tziafas<sup>111</sup>, em 1995, relatou a seqüência dos eventos que levam à expressão do fenótipo das células odontoblastóides, durante o processo de reparo de polpas dentais amputadas ou na presença de indutores específicos, e também sugeriu aspectos moleculares em comum nestes dois eventos. Também foi descrito o potencial das células maduras da polpa em se diferenciarem em células polarizadas capazes de secretar matriz de dentina. Foi ressaltado que condições apropriadas, como ausência de inflamação e quantidade de oxigênio suficiente são necessárias para a expressão da capacidade dentinogênica específica das células da polpa dental. As células odontoblastóides são distinguidas, por critérios morfológicos, de outras células formadoras de matriz envolvidas em mecanismos defensivos não específicos da polpa dental. As moléculas da matriz como fibronectina, fatores de crescimento, incluindo moléculas que pertencem a superfamília TGF e células pulpares competentes podem interagir na iniciação da dentinogênese. É apresentada também uma revisão das observações atuais dos eventos dentinogênicos específicos, induzidos em vários sistemas de cultura ou em locais intrapulpares de dentes maduros por biomoléculas ou biomatrizes artificiais. Dados destes experimentos salientam o papel das moléculas da matriz extracelular e dos fatores de crescimento na aquisição do fenótipo das células odontoblastóides e na iniciação da dentinogênese reparadora.

Tziafas<sup>112</sup>, em 1995, realizou um estudo com o objetivo de elucidar sob bases moleculares, a indução experimental da dentinogênese quando as células ectomesenquimais da polpa foram expostas à matriz de dentina ou à fibronectina e, investigar a importância do domínio RGD da fibronectina durante a dentinogênese reparadora. Para a realização do estudo, foram utilizados os primeiros molares superiores e inferiores de 3 cães adultos jovens (6-10 meses) e 1 mais velho (30 meses), nos quais foram confeccionadas cavidades com exposições pulpares. Matriz de dentina insolúvel em EDTA e/ou HCl-guanidina, ou dentina desmineralizada tratada com fibronectina de plasma, ou pedaços de filtro milipore embebidos com polímero recombinante de fibronectina incorporando várias seqüências de RGD foram implantados na região central do tecido pulpar através das exposições. As polpas expostas foram capeadas com discos de Teflon e as cavidades receberam uma base de hidróxido de cálcio e foram seladas com cimento de óxido de zinco e eugenol. Após o período pós-operatório de 1 e 4 semanas (animais jovens) e 10 semanas (animal velho), os dentes foram extraídos e preparados para avaliação histológica. Os resultados mostraram que a atividade dentinogênica foi conservada na matriz de dentina insolúvel em EDTA e/ou guanidina. A implantação de filtros milipore tratados com o polímero recombinante de fibronectina não induziu diferenciação de células odontoblastóides, indicando que as interações das células pulpares com a fibronectina exógena não são RGD-dependentes. A matriz de dentina insolúvel em ácido ou a fibronectina do plasma, ambas separadamente, induziram a dentinogênese em animais jovens, mas não mostraram qualquer atividade dentinogênica quando implantadas em polpas expostas de animal velho. A matriz de dentina insolúvel em ácido e a fibronectina do plasma também falharam na indução da atividade dentinogênica de tecidos pulpares jovens, quando foram combinadas antes da sua implantação. Os resultados sugeriram que os

fatores de crescimento (endógenos ou artificialmente implantados) e a fibronectina estão envolvidos no mecanismo inicial da dentinogênese reparadora e, este mecanismo parece ser mais complexo que a simples imobilização das células pulpares no substrato de adesão.

Tziafas et al.<sup>119</sup> (1995) examinaram o efeito dos componentes da matriz extracelular de dentina sobre células mesenquimais dentais, por meio de microscópio de luz e eletrônico de transmissão, depois da sua implantação em locais centrais de polpas de dentes de cães mecanicamente expostas. Foram utilizados molares superiores e inferiores e pré-molares inferiores de 3 cães, nos quais foram confeccionadas cavidades classe V com exposições pulpares. Nos grupos experimentais foram implantados filtros de milipore embebidos em soluções contendo: 30 ou 300 µg/ml de uma fração de matriz dentinária de incisivos de coelhos solúvel em EDTA. Nos grupos controle, os filtros foram embebidos em albumina de cães ou solução salina fosfatada tamponada. Todos os filtros foram inseridos no interior do tecido pulpar exposto e, as cavidades foram seladas com discos de Teflon e cimento de óxido de zinco e eugenol. Os dentes foram extraídos após um período de 8 e 24 dias, e preparados para análise microscópica. Células polarizadas, colunares foram observadas, no período de 8 dias, próximas aos filtros embebidos com as duas diferentes concentrações dos componentes da matriz de dentina. Estas células apresentaram aspectos característicos incluindo, ampliação do reservatório do retículo endoplasmático rugoso, uma rica rede de microfilamentos ao longo das extensões citoplasmáticas invadindo os poros do filtro e numerosos corpos citoplasmáticos. As células também mostraram evidência de estarem funcionais e de diferenciação citológica. O processo de polarização dos grânulos secretores pôde ser observado após 8 dias do implante, assim como a presença de vesículas de matriz e

deposição de uma fina matriz colagenosa nos filtros, apicalmente à extremidade distal dos processos citoplasmáticos. No período de 24 dias, a secreção de matriz tubular pôde ser observada em associação com células odontoblastóides. Nenhuma evidência de diferenciação de células odontoblastóides ou na síntese de matriz pôde ser observada após a implantação dos filtros controle. Estes estudos demonstraram que os componentes bioativos presentes na fração de matriz de dentina solúvel em EDTA foram capazes de induzir diretamente a polarização celular e secreção apical de matriz tubular quando implantados em contato com células da polpa dental em locais afastados da camada de odontoblastos.

Cassidy et al.<sup>12</sup> (1997) quantificaram a presença das isoformas TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 e - $\beta$ 3 nas matrizes de dentina humana e de coelho. Três misturas de dentina foram preparados a partir de coroas e raízes de dentes humanos e de coelhos. As frações totais solúveis em EDTA foram extraídas com EDTA a 10%, pH=7,2, contendo inibidores da protease, foram dializadas em água destilada e liofilizadas. O resíduo insolúvel remanescente foi lavado e incubado com colagenase em 0,025M TrisHCl – 0,3 M de tampão de acetato de cálcio, pH 7,2 a 37°C por 5 dias, centrifugado e liofilizado depois da diálise com água. O teste ELISA foi utilizado para detectar as isoformas TGF- $\beta$ . O TGF- $\beta$ 1 foi a isoforma mais detectada em todas as amostras e a única isoforma detectada nas amostras de dentina humana. TGF- $\beta$ 2 foi detectado somente na fração liberada por colagenase de dentina de incisivos de coelhos e estava presente em baixos níveis. TGF- $\beta$ 3 foi detectado em frações de dentina de coelho solúveis em EDTA e liberadas pela colagenase. Maiores níveis da isoforma TGF- $\beta$ 1 foram detectados nas amostras de dentina de coelhos do que na de dentina humana e, algumas diferenças na distribuição entre as 2 frações de tecido foram observadas entres estas espécies. A presença destas

isoformas de TGF- $\beta$  na dentina pode prover um reservatório de fatores de crescimento na matriz que pode participar no processo que leva ao reparo tecidual após a injúria.

Jepsen et al.<sup>46</sup> (1997) tiveram como objetivo avaliar a indução de formação de dentina reparadora pela proteína osteogênica recombinante humana -1 (h OP-1). Foram utilizados 16 dentes, incisivos e caninos, de 4 porquinhos da índia adultos, nos quais foram realizadas exposições pulpares com fresas em alta rotação. Em seguida, o tecido pulpar exposto de cada dente foi capeado com 3mg de um composto constituído de 2,5  $\mu$ g de h OP-1 e 1 mg de colágeno, com 3 mg de matriz de colágeno ou com pasta de hidróxido de cálcio. Os dentes foram selados com óxido de zinco e eugenol. Os animais foram sacrificados após 5 semanas, os dentes removidos em blocos, fixados, descalcificados e processados para análise histomorfométrica e em microscopia de luz. Nos dentes tratados com OP-1/matriz de colágeno, houve formação de grande quantidade de tecido duro, caracterizando uma ponte completa constituída de osteodentina na camada mais superficial e de dentina tubular subjacente. Uma menor formação de dentina foi observada nos dentes tratados com a pasta de hidróxido de cálcio. No grupo controle, onde se utilizou apenas a matriz de colágeno, vários focos de dentina foram identificados, mas não houve a formação de ponte dentinária completa. Os resultados sugeriram que a proteína osteogênica recombinante humana-1 em uma matriz carreadora de colágeno pode ser considerada um agente capeador bioativo em exposições de polpas dentárias.

Martim et al.<sup>59</sup> (1998) estudaram em papila dental cultivada *in vitro*, os efeitos de dois membros da família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), combinados ou não ao fator transformador de crescimento  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) ou ao fator de

crescimento insulínico-I (IGF-I) no processo de polarização de odontoblastos e/ou secreção de pré-dentina. Papilas dentárias de primeiros molares inferiores de camundongos foram isoladas com tripsina a 1%, 4°C, por 50 minutos e cultivadas em meio ágar semi-sólido. Este meio foi suplementado com fatores de crescimento em diferentes concentrações e combinações. Após um período de 6 dias, os espécimes foram preparados para análise histológica. Os resultados mostraram que o aFGF, bFGF ou a combinação destes, promoveram a polarização das células na periferia das papilas dentárias. A adição do aFGF e TGF- $\beta$ 1 nas culturas, induziu a polarização e a diferenciação funcional das células odontoblastóides, bem como a deposição de matriz extracelular. A associação de aFGF ou bFGF com IGF-I promoveu a polarização na superfície das papilas dentárias e, em alguns espécimes, houve secreção de matriz. Na presença de bFGF e TGF- $\beta$ 1, houve apenas, alongamento das células. Os resultados indicaram que o aFGF e o bFGF, combinados ao TGF- $\beta$ 1 e ao EGF-I, são capazes de potencializar seus efeitos indutivos e promover alterações citológicas e funcionais nas células odontoblastóides.

Smith et al.<sup>100</sup> (1998) tiveram como objetivo: 1) determinar a proporção do fator de crescimento transformador  $\beta$ 1 (TGF  $\beta$ 1) na matriz de dentina, nas formas ativa e inativa 2) investigar a associação do TGF- $\beta$ 1 com os componentes da matriz extracelular de dentina, os quais podem regular sua atividade biológica e 3) investigar a expressão dos receptores I e II do TGF-  $\beta$  por odontoblastos. Inicialmente, foi isolada a fração da matriz extracelular de dentina de incisivos de coelhos, solúvel em EDTA a 10%, pH7.2 contendo inibidores de protease. O extrato foi dializado em água destilada e liofilizado. Em seguida, o teste ELISA foi empregado para identificar as proporções ativas e inativas do TGF- $\beta$ 1. Para investigar a associação do TGF- $\beta$  com os

componentes da matriz extracelular de dentina, alíquotas de cada fração cromatográfica preparada com 50 mM Tris Tampão, pH 7.2 e 25 mg da fração total de dentina de coelho solúvel em EDTA, foram aplicadas em membranas de nitrocelulose, que foram encubadas por 2h a 4°C com anticorpos primários. Após lavagem, os anticorpos foram detectados, usando diaminobenzidina como cromóforo. A imunohistoquímica para os receptores I e II do TGF- $\beta$  foi realizada em tecidos de roedores. Os animais de 11 dias de vida, foram sacrificados, as peças foram removidas, fixadas, descalcificadas, diafinizadas e incluídas em parafina. Foram feitos cortes de 5 $\mu$ m de espessura, os quais foram corados com anticorpos purificados de coelhos com afinidade para o receptor I e II do TGF- $\beta$ . O controle negativo foi feito omitindo o anticorpo que foi substituído por um anticorpo irrelevante. Os resultados mostraram que aproximadamente metade do TGF- $\beta$ 1 na matriz de dentina estava presente na forma ativa. O TGF- $\beta$ 1 foi encontrado associado a um peptídeo em latência (LAP), betaglicano e decorin na matriz de dentina isolada. A imunohistoquímica mostrou uma forte coloração para os receptores tipo I e II do TGF- $\beta$  em odontoblastos, e com coloração mais fraca e variável em outras células pulpares. Os autores concluíram que a associação do TGF- $\beta$ 1 com betaglicano, decorin e LAP pode regular a disponibilidade e a atividade biológica deste fator de crescimento e influenciar sua apresentação para os receptores tipo I e II do TGF- $\beta$  sobre odontoblastos. Durante o reparo do tecido dental, o controle do processo será importante na regulação dos efeitos biológicos do TGF- $\beta$ 1 nas células do complexo dentino-pulpar.

Tziafas e Papadimitriou<sup>115</sup> (1998) investigaram *in vivo* o papel do TGF- $\beta$  como um componente ativo da matriz de dentina durante a indução da dentinogênese reparadora bem como a capacidade do TGF- $\beta$ 1 em induzir eventos dentinogênicos.

Foram utilizados 3 cães, de 12 a 16 meses de idade, nos quais foram confeccionadas cavidades classe V e duas exposições pulpares separadas em primeiros molares e caninos superiores e inferiores. Sobre as exposições pulpares foram colocados implantes de: I) filtros de milipore embebidos em matriz de dentina autógena natural ou desmineralizada pré-incubada com anticorpo TGF- $\beta$  neutralizante, II) Filtros de milipore embebidos com solução contendo 100 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 de plaquetas humanas, III) biomatrizes e filtros embebidos em soluções controle. Os dentes foram cuidadosamente extraídos após 42 dias, preparados para análise histológica, corados com hematoxilina/eosina de Mayer e Tricrômico de Gomori e avaliados por microscópio de luz. No grupo controle foi observada a deposição de matriz de dentina tubular associada com células odontoblastóides alongadas e polarizadas em contato direto com o implante de dentina natural ou desmineralizada. No grupo onde foram implantadas as biomatrizes com anticorpo neutralizante do TGF- $\beta$ , a dentina desmineralizada perdeu completamente sua atividade indutora, enquanto a dentina natural foi capaz de estimular a formação de fibrodentina. Os filtros milipore embebidos em TGF- $\beta$ 1 foram consistentemente rodeados por uma espessa zona de matriz tubular margeada por células colunares polarizadas. Os dados evidenciaram que as células pulpares podem expressar o seu potencial dentinogênico em resposta a uma superfície apropriada contendo TGF- $\beta$ 1 exógeno, e que a atividade dentinogênica da matriz de dentina pode ser no mínimo, em parte, atribuída à molécula de TGF- $\beta$ .

Tziafas et al.<sup>120</sup> (1998) investigaram os efeitos do fator de crescimento fibroblástico básico recombinante (bFGF), do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)-II e do fator transformador de crescimento (TGF)- $\beta$ 1 nas células

pulpaes, com o auxílio de microscópio de luz e microscópio eletrônico de transmissão. Para a realização do experimento foram utilizados molares e caninos superiores e inferiores de cães de 12 a 16 meses de vida, nos quais foram confeccionadas cavidades classe V, as polpas foram expostas em 2 diferentes locais, irrigadas com solução salina e os implantes foram forçados para dentro da polpa. Os implantes consistiam de filtros de papel milipore embebidos com soluções contendo 100 ou 500 ng/ml de bFGF ou IGF-II ou 100ng/ml de TGF- $\beta$ 1. Filtros controle foram embebidos em albumina de cães. Metade dos espécimes foram extraídos após 1 semana e processados para análise em microscópio eletrônico de transmissão e a metade remanescente foi extraída após 3 semanas e preparada para avaliação em microscópio de luz. Nenhuma alteração na organização celular ou na síntese de matriz foi observada no grupo controle. Grupo de células colunares e polarizadas com numerosas mitocôndrias e elementos de Golgi ou células alongadas não associadas com qualquer deposição de matriz foi demonstrado após 1 ou 3 semanas, respectivamente, em proximidade com os filtros que foram embebidos com solução bFGF; à distância destes implantes aumento da formação de uma matriz osteotípica foi observada abaixo do local de exposição. Nenhuma resposta particular foi observada em proximidade com os filtros que foram embebidos com IGF-II após 1 ou 3 semanas do implante, mas espessas zonas de osteodentina foram observadas abaixo do local de exposição e em locais de dentina circunferencial adjacente. Numerosas células alongadas e polarizadas com extensões citoplasmáticas longas invadindo os poros do filtro foram observadas após 1 semana em proximidade com os filtros que foram embebidos em solução de TGF- $\beta$ 1. Após 3 semanas de implante destes filtros, a deposição de matriz tubular ao redor dos implantes foi observada em associação com células odontoblastóides alongadas, enquanto aumento da formação de dentina circunferencial foi também vista adjacente aos locais periféricos.

Estes experimentos demonstraram que TGF- $\beta$ 1 quando implantado por curtos períodos de tempo no centro da polpa exerce efeitos específicos na dentinogênese, induzindo a diferenciação de células odontoblastóides e estimulação de odontoblastos primários. A implantação de bFGF e IGF-II não resultaram na formação de dentina reparadora, mas estimularam a deposição de matriz osteotípica à distância dos implantes.

Sloan e Smith<sup>95</sup> (1999) examinaram os efeitos das isoformas TGF-  $\beta$  na resposta do complexo dentina-polpa “in vitro”, usando o meio agarose como carreador para os fatores de crescimento. Os incisivos de ratos de 28 dias foram dissecados, colocados em meio de cultura e foram feitos cortes de 2 mm de espessura, os quais foram colocados novamente em meio de cultura a 37°C. Botões de agarose foram encharcados nas isoformas 1-3 do TGF-  $\beta$  e colocados sobre a camada odontoblástica dos cortes dos dentes. Os cortes foram mantidos em cultura tipo Trowel por 7 dias. Na análise histológica, foram contadas as células da camada subodontoblástica e medida a espessura de pré-dentina, em 3 regiões determinadas aleatoriamente. Os resultados mostraram que o TGF- $\beta$ 1 e  $\beta$ 3 estimularam um aumento na secreção de pré-dentina no local de aplicação do botão quando comparados ao grupo controle. Os efeitos mitogênicos nas células da camada subodontoblástica também foram vistos e, ocasionalmente, pequenos focos de células odontoblastóides recentemente diferenciadas foram observados distantes do local de aplicação do TGF- $\beta$ 3. O TGF- $\beta$ 2 teve o mínimo efeito sobre os tecidos cultivados. Estes resultados demonstraram que os TGF- $\beta$ 1 e  $\beta$ 3 podem estimular a secreção de matriz extracelular pelos odontoblastos, são mitogênicos para as células pulpares, e que o TGF- $\beta$ 3 pode ter efeitos indutores sobre as células

pulpaes. Tais atividades podem ser importantes durante o processo reparador no complexo dentino-pulpar depois da injúria do tecido.

Sloan et al.<sup>97</sup> (1999) tiveram como objetivo caracterizar imunohistoquimicamente a expressão dos receptores I e II para TGF- $\beta$  em dentes humanos hígidos e cariados para melhor compreender a capacidade das células responderem ao TGF- $\beta$ . Para realização do estudo, foram utilizados 15 terceiros molares humanos hígidos e 15 cariados, dos quais 3 apresentavam cárie em esmalte, 6 lesões com envolvimento de dentina e 6 com exposição pulpar. Os dentes foram seccionados longitudinalmente em 2 partes, fixados por 24 h em formalina neutra tamponada a 10%, desmineralizados em ácido fórmico por 8 dias, desidratados em etanol e incluídos em parafina. Cortes de 5  $\mu$ m de espessura foram corados com anticorpos de coelho com afinidade para os receptores I e II do TGF- $\beta$  e a ligação anticorpo-receptor foi detectada usando o método de imunoperoxidase StrAviGen. Foi observada uma forte coloração para ambos os tipos de receptores nos odontoblastos de dentes hígidos com a maior intensidade para o receptor tipo I. Uma intensidade menor na coloração foi também observada para os receptores das células da camada rica em células e da porção central da polpa. Padrões similares de coloração foram observados nos dentes cariados. Os autores concluíram que os odontoblastos e outras células da polpa de molares humanos maduros hígidos e cariados mostraram a presença dos dois tipos de receptores I e II para o TGF- $\beta$ , sendo que os odontoblastos mostraram a mais forte expressão. Os autores ainda sugerem que estas observações podem ser importantes na resposta dessas células à uma injúria tecidual.

Decup et al.<sup>20</sup> (2000) avaliaram os efeitos da sialoproteína óssea na dentinogênese reparadora após capeamento pulpar direto. Para realização do experimento foram utilizados 36 ratos, de 6 a 7 semanas, nos quais foram realizadas cavidades classe V nos primeiros molares superiores, com exposições pulpares feitas com a ponta de uma sonda. As exposições foram capeadas com os diferentes materiais: cimento de ionômero de vidro (Grupo S), carreador (gelatina) sozinho (Grupo C), proteína osteogênica (sialoproteína) com carreador (Grupo OP) e hidróxido de cálcio (Grupo Ca). Após 8, 14 e 30 dias, os animais foram sacrificados e os dentes preparados para avaliação histológica. No período de 8 dias, poucas células inflamatórias foram observadas, a maioria localizada na superfície pulpar próximo à perfuração no grupo da proteína osteogênica. No grupo Ca, uma ponte de dentina iniciou sua formação em contraste com outros grupos. No período de 15 dias, estruturas globulares foram observadas nas polpas dos grupos S e C. Uma ponte de osteodentina reparadora isolou a polpa da cavidade no grupo Ca. Reações variadas foram observadas no grupo OP, com alguma evidência no alinhamento das células e da matriz ou plugues de osteodentina em continuidade com uma camada interna de dentina reparadora. Após 30 dias, foi observada formação irregular de osteodentina nas polpas do grupo S e C, com tendência à fusão de estruturas globulares, mas com espaços interglobulares preenchidos por remanescente pulpar. No grupo Ca, osteodentina foi observada na parte mesial da câmara pulpar. No grupo da sialoproteína (Grupo OP), a proteína osteogênica estimulou a formação de um depósito de dentina homogênea ocupando a maior parte da porção mesial da polpa. Aparentemente, a proteína osteogênica estimula a diferenciação das células, as quais secretam matriz extracelular organizada mais eficientemente do que qualquer outro material capeador. A partir dos resultados, os autores concluíram que a sialoproteína mostra uma propriedade bioativa e é capaz de estimular, em um período de

30 dias, o desenvolvimento de um tecido pulpar reparador, obstruindo a perfuração e preenchendo o terço mesial da câmara pulpar.

Rutherford e Gu<sup>84</sup> (2000) avaliou os efeitos de uma única aplicação de BMP-7 recombinante exógena na reparação do tecido pulpar inflamado. Pulpite experimental reversível foi induzida em caninos de “ferrets” adultos utilizando uma única aplicação de 5µg de LPS de *Salmonella typhimurim*, diretamente sobre a polpa coronária por 3 dias. Em seguida, estes dentes tiveram suas polpas coronárias removidas, irrigadas com soro fisiológico e, após a hemostasia, 2 mg da combinação de 0, 2.5, 7.5 e 25 µg de BMP-7/mg de colágeno foram aplicadas em cada dente e estes foram selados por 30 dias. Os resultados da análise histológica mostraram que o tratamento com uma única aplicação de 2.5, 7.5 ou 25µg de BMP-7 recombinante humana/mg colágeno induziu a dentinogênese reparadora no grupo controle sem inflamação pulpar, mas não no grupo tratado com LPS. Estes dados revelam que uma única aplicação de cerca de 50 µg por dente de BMP-7 recombinante exógena é insuficiente para induzir dentinogênese reparadora em dentes de ferrets com pulpite reversível. Dado que as células pulpares no tecido inflamado comumente conservam a capacidade de responder ao BMP-7 exógeno é possível que proteína recombinante ativa insuficiente esteja disponível para induzir a formação de tecido em polpas dentais inflamadas.

Sloan et al.<sup>96</sup> (2000) avaliaram os efeitos da proteína óssea morfogenética recombinante-7 (BMP-7) na estimulação e modulação dos odontoblastos existentes na ausência de injúria tecidual, utilizando o sistema de cultura de órgãos para cortes dentais. Para realização deste estudo foram dissecados incisivos de ratos de 28 dias de vida. Os incisivos foram cortados em fatias de 1-2 mm de espessura e na região dos

odontoblastos foram introduzidos botões de agarose encharcados com: I) 500 ng de BMP-7 /ml de solução em meio de cultura, II) 100 ng de BMP-7/ml de solução. Os cortes cultivados por 7 dias à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Após a cultura, os cortes dos dentes foram fixados, desmineralizados e corados com hematoxilina/eosina para avaliação histológica. A espessura da pré-dentina foi medida em três áreas onde a BMP-7 tinha sido colocada e em áreas onde não havia ocorrido nenhuma intervenção. Os resultados mostraram que os botões embebidos em 500 ng/ml de BMP-7 estimularam um aumento localizado de secreção de matriz extracelular pelos odontoblastos mais acentuado do que em sua menor concentração. Esses efeitos podem ser importantes nos processos reparadores após a injúria do complexo dentina polpa e podem ser úteis na indução terapêutica de dentinogênese terciária.

Sloan et al.<sup>98</sup> (2000) investigaram a presença das isoformas TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3 nos tecidos de molares humanos hígidos e cariados, para compreender melhor a expressão dos TGF- $\beta$ s durante a saúde e a doença. Dez molares humanos hígidos e 15 cariados foram coletados imediatamente após a extração. Os dentes cariados foram divididos em 3 grupos com diferentes graus de envolvimento cariado: cavitação em esmalte, cavitação moderada em dentina e extensa cavitação em dentina com exposição pulpar (5 dentes por grupo). Os dentes foram seccionados ao meio, fixados por 24 h em formalina neutra tamponada a 10%, desmineralizados em ácido fórmico a 10% por 8 dias, e preparados para análise imunohistoquímica. Cortes de 5  $\mu$ m de espessura foram corados com anticorpos policlonais com afinidade purificada para TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 ou TGF- $\beta$ 3. Os grupos controle consistiram de cortes nos quais a coloração foi inibida ou foi feita com uma quantidade semelhante de corante não específico para as isoformas estudadas. Os controles negativo incluíram a omissão de anticorpos primários e a

substituição dos anticorpos primários com imunoglobulina normal de coelho. Nos tecidos hígidos, odontoblastos, células da camada rica em células, fibroblastos pulpare e células endoteliais foram coradas em graus variados para todas as isoformas, com TGF- $\beta$ 3 mostrando a maior intensidade e TGF- $\beta$ 1 a mais fraca intensidade. Padrões similares de coloração foram observados em dentes cariados, contudo, o TGF- $\beta$ 1 mostrou um aumento significativo da intensidade da coloração dentro dos odontoblastos e células pulpare. A análise bioquímica mostrou quantidades maiores de TGF- $\beta$ 1 na dentina terciária do que nas amostras de dentina primária. A expressão dos TGF- $\beta$ s em odontoblastos e o aumento da presença do TGF- $\beta$ 1 em dentina terciária sugerem que essas isoformas podem ser importantes no comportamento dos odontoblastos e na modulação da resposta tecidual à injúria.

Rutherford<sup>83</sup>, em 2001, testou a hipótese de que genes da BMP-7 transferidos poderiam induzir a regeneração do complexo dentina polpa em polpas dentais inflamadas. Para realização do estudo foram induzidas pulpites reversíveis em dentes de cobaias adultas pela injeção direta de lipopolissacarídeos bacterianos no interior do tecido. Após 3 dias, as polpas foram diretamente infectadas pelo Adenovírus recombinante contendo gene de BMP-7 (Ad BMP-7) de ratos ou  $\beta$ -galactose bacteriana (Adlac Z) ou, implantadas com ex-vivo fibroblastos da pele de cobaias adultas infectadas pelos AdBMP-7 ou AdlacZ. Ambos os grupos foram associados a matrizes carreadoras de hidrogel de colágeno tipo I. Foram utilizados como controle, vírus e células livres de carreadores e polpas não inflamadas. Quatro dentes por grupo foram estudados. Após 30 dias, os dentes foram preparados pra análise histológica. Nos dentes infectados diretamente pelo vírus houve apenas formação de pequenas quantidades de massas mineralizadas em alguns dentes. Foi observado formação de dentina reparadora

em todos os dentes tratados com fibroblastos infectados com os AdBMP7, regenerando o complexo dentino-pulpar. A transferência de genes de BMP-7, ex-vivo, pode ser considerada um método efetivo para indução da dentinogênese reparadora em dentes com pulpites reversíveis.

Six et al.<sup>94</sup> (2002) avaliaram a proteína óssea morfogenética - 7 (BMP-7), também denominada osteogênica, por sua eficácia na indução da dentinogênese reparadora em polpas expostas de dentes de ratos. Para determinar se a reação era dose-dependente, botões de colágeno contendo 1, 3 ou 10µg de BMP-7 recombinante foram inseridas em polpas expostas de primeiros molares superiores. Nos grupos controle, o colágeno (Grupo CC) ou o hidróxido de cálcio (Grupo Ca) foram usados como agentes capeadores. Todas as cavidades foram restauradas com cimento de ionômero de vidro. Metade dos animais foram sacrificados após 8 dias e a outra metade após 28 dias, por perfusão intracardíaca para fixação. Os molares foram processados para avaliação histológica em microscópio óptico de luz. Nenhuma diferença nos resultados pode ser observada entre as diferentes concentrações dos grupos de BMP-7 num mesmo intervalo de tempo. Após 8 dias, todos os grupos mostraram inflamação variável, de suave a severa, e o Grupo Ca mostrou formação recente de ponte de dentina. Aos 28 dias o Grupo CC apresentou formação de osteodentina irregular, exibindo algumas áreas não mineralizadas no local da exposição e áreas interglobulares não mineralizadas contendo remanescente pulpar. Nas polpas tratadas com hidróxido de cálcio, a formação inicial de ponte espessa de osteodentina reparadora que selava quase completamente a exposição pulpar continuou, na parte mais profunda, por dentina tubular irregular. Na maioria dos espécimes tratados com BMP-7, a inflamação inicial foi resolvida aos 8 dias e aos 28 dias a mineralização era heterogênea ou osteodentina preenchia a polpa

coronária mesial. Também foi observado completo preenchimento da polpa radicular por mineralização homogênea na raiz mesial. Estes resultados enfatizaram o potencial das moléculas bioativas tais como a BMP-7 como uma alternativa para o tratamento pulpar.

## *Laser*

O laser de baixa intensidade têm sido utilizado para estimular o reparo de tecidos lesados desde 1966 quando Mester<sup>60</sup> apresentou relatos de casos clínicos de úlceras crônicas de membros inferiores tratadas utilizando a bioestimulação com laser de rubi e argônio.

Em 1984, Bosatra et al.<sup>6</sup> avaliaram, *in vitro*, a atividade de fibroblastos humanos em meio de cultura, após a irradiação com laser e, *in vivo*, o processo de reparo de feridas após a aplicação do mesmo laser. O laser usado foi o bioestimulador de hélio-neônio (Valfire Mod. LCS 25), numa potência de 25 mW e comprimento de onda de 632,8 nm. Para as observações *in vitro*, áreas de 1 cm<sup>2</sup> de cultura de fibroblastos humanos foram irradiadas com uma dose de 2 J/cm<sup>2</sup>, enquanto as superfícies não irradiadas serviram como controle. Após a irradiação, as placas foram incubadas por 2h e por 48h a 37° C . Ao microscópio eletrônico, foi observada uma influência direta sobre as células, tornando o retículo endoplasmático mais hipertrófico e hiperplásico, assim como as mitocôndrias mais hipertróficas e presença de numerosas microfibrilas no citoplasma. No estágio *in vivo* da pesquisa, foi feita uma biópsia do tecido de granulação das bordas de úlceras pós-flebite em pernas de 7 pacientes antes e após o

tratamento com o laser, com uma densidade de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  durante 20 dias. Foi observada uma síntese aumentada de colágeno no tecido de granulação irradiado, no entanto, não foi possível estabelecer se o processo de regeneração foi devido a um efeito direto do laser sobre os fibroblastos ou se foi uma consequência indireta de outras condições, como um melhor suprimento sanguíneo dos tecidos. Foi demonstrado, ainda, que a irradiação laser estimula uma maior síntese de material fibrilar, embora isto não influencie a organização extracelular. Os autores concluíram que houve uma maior síntese de colágeno nas células tratadas com irradiação laser tanto *in vitro* como *in vivo*, enquanto a síntese de fibrilas maduras foi retardada por razões desconhecidas.

Kubasova et al.<sup>50</sup> (1984) investigaram, *in vitro*, o efeito da irradiação do laser Hélio-Neônio (MOM, Hungary, com potência de 5mW) nas funções da membrana celular e na aparência micromorfológica da superfície celular. O experimento foi realizado com cultura de fibroblastos primários de embrião humano, aplicando as doses de  $1\text{J}/\text{cm}^2$  por 7,9 min e de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  por 39,5 min em uma única irradiação ou em quatro irradiações com intervalos de 24 horas entre elas. As células do grupo controle foram preparadas do mesmo modo que as dos grupos experimentais, mas não foram irradiadas. Os resultados não mostraram alterações funcionais ou micromorfológicas das superfícies celulares após uma única aplicação do laser na dosagem de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ . Contudo, quando esta dose foi aplicada quatro vezes com intervalos de 24 horas, ocorreram modificações nas condições funcionais como também nas cargas das superfícies das membranas celulares. A microscopia eletrônica de varredura e de transmissão não revelaram qualquer alteração micromorfológica ou ultra-estrutural. Os efeitos do laser sobre as células na dosagem de  $5\text{J}/\text{cm}^2$  não diferiram daqueles obtidos com a dose de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ . Os autores sugeriram que a indução através da irradiação laser nas superfícies celulares

contribue para um aumento da força de contato intercelular, sendo evidente que a membrana plasmática está envolvida nos processos de cura estimulados pelo laser.

Chomette et al.<sup>13</sup> (1987) avaliaram o efeito da irradiação laser de baixa intensidade (comprimento de onda = 632,6 nm) sobre a cicatrização gengival em 14 pacientes com periodontopatia. Após a biópsia inicial na região de molares inferiores nos lados direito e esquerdo, foi aplicado o laser de baixa intensidade numa potência de 6 mW no lado direito, por 2 a 3 minutos. Quatro biópsias de controle foram realizadas nos mesmos pacientes em áreas gengivais irradiadas e não irradiadas, no 1º, 4º, 8º e 21º dia pós-operatório. Na ausência de inflamação, ocorreu cicatrização de maneira semelhante nos tecidos irradiados e não irradiados. Depois de um crescimento vascular inicial, houve formação de tecido conjuntivo acompanhado por um aumento na atividade enzimática. Então, formou-se uma cicatriz de aspecto longitudinal. O laser induziu uma cicatrização mais rápida (14 dias) do que nos controles (21 dias). A presença de inflamação na gengiva retardou a cicatrização e, com frequência, promoveu cicatrizes quelóides, porém, nesses casos, também houve uma cicatrização melhor e mais rápida quando houve uma irradiação com laser de baixa intensidade.

Em 1987, Longo et al.<sup>57</sup> realizaram um estudo com o objetivo de avaliar macroscópica e histologicamente, o efeito da aplicação do laser de Ga-Al-As (Arianna Europa), num comprimento de onda de 904 nm e densidade de energia de 3 J, na cura de feridas experimentais em ratos. Sob anestesia, foi removido 1 cm<sup>2</sup> de pele na região dorsal e mediana de cada animal, a qual foi coberta com gaze esterilizada, que foi substituída diariamente após o tratamento. Os animais foram divididos em 4 grupos e as feridas foram tratadas 1 vez por dia durante 5 dias, como segue: 1- controle, 2- gaze

embebida em Fitostimulina, 3- laser aplicado por 5 minutos com uma frequência de 3.000 Hz e densidade de potência de 10 mW/cm<sup>2</sup>, 4- laser aplicado por 10 minutos com uma frequência de 1.500 Hz e densidade de potência de 5mW/cm<sup>2</sup>. Os animais foram sacrificados após 7 dias, as feridas foram fotografadas e as peças preparadas para avaliação histológica. Verificaram nos grupos 2 e 3 uma aceleração da re-epitelização e reparo das bordas da ferida quando comparados ao controle. No grupo 4, o reparo estava menos avançado tanto no aspecto macroscópico como histologicamente. No grupo controle, o processo de reparo apresentava-se nos estágios iniciais e não havia evidência de regeneração da epiderme ou de tecido fibroblástico. Os autores concluíram que o laser aplicado por cinco minutos a uma frequência de 3.000 Hz foi mais efetivo em promover a cura das feridas experimentais, enquanto o mesmo laser aplicado por 10 minutos a uma frequência de 1.500 Hz, não afetou o processo de reparo.

Meyers et al.<sup>61</sup> (1987) descreveram o efeito da irradiação do laser de hélio-nônio (He-Ne) no aumento da produção de DNA em cultura de linfócitos humanos. O sangue de dois doadores sem história de imunodeficiência e discrasia sangüínea foi coletado, diluído com solução salina fosfatada tamponada (PBS) e centrifugado para criar uma camada rica em linfócitos, que foi pipetada e lavada usando PBS. As células foram novamente diluídas em PBS para serem divididas em 6 grupos experimentais. Dois grupos foram irradiados com laser de He-Ne com 1.033 mW de potência (tamanho da ponta 0,67 mm) e uma densidade de potência de 0,29 W/cm<sup>2</sup>, por cinco minutos. Dois outros grupos foram irradiados com o mesmo laser, nas mesmas especificações, durante 10 e 20 minutos. Os dois últimos grupos serviram como controle (sem aplicação do laser). As células foram então centrifugadas e resuspendidas em meio de cultura tecidual e foram incubadas a 37°C, com 90% de umidade e 5% de CO<sub>2</sub>. Nas placas, foi

colocado tritiatedo de timidina às 0, 24 e 98 horas. Nenhum aumento significativo no tritiatedo de timidina foi detectado nas culturas de células. Concluíram que o efeito potencializador do laser de He-Ne sobre linfócitos parece ser devido à alteração biofísica de subsistemas celulares mais do que à produção de DNA ou à regeneração celular.

Ohta et al.<sup>71</sup> (1987) investigaram o efeito do laser de arseneto de gálio (M/A-COM Laser Diode, Inc., model LC-200), 904 nm de comprimento de onda, frequência de pulso de 292 Hz, potência média de 0,88 mW) na proliferação de linfócitos humanos. Depois que células sanguíneas periféricas foram isoladas e cultivadas, a irradiação foi feita em tempos que variaram de 1 segundo a 5 minutos, resultando numa densidade de energia de 2,17 a 651 mJ/cm<sup>2</sup>. Em algumas culturas foi adicionado fitohemaglutinina (25µg/ml do meio de cultura). A proliferação celular foi verificada pela incorporação de [<sup>3</sup>H] timidina. Tanto a proliferação mitogênica em resposta à fitohemaglutinina quanto a proliferação celular espontânea foram acentuadamente inibidas pela irradiação laser numa densidade de energia tão baixa quanto 10,85 mJ/cm<sup>2</sup> (5s de irradiação). De forma semelhante, a resposta imune funcional de células à estimulação antigênica também foi diminuída como resultado da irradiação laser. Esses resultados indicaram que a irradiação laser de baixa intensidade pode interferir com a resposta imunológica *in vitro* e, modulação semelhante pode ocorrer em indivíduos expostos a tal tipo de irradiação *in vivo*.

Anneroth et al.<sup>3</sup>, em 1988, avaliaram, macroscopicamente e histologicamente, o efeito do laser de baixa energia infra-vermelho de arseneto de gálio (Cavity D1-VP MID Laser - Space Laser Co, Italy) no tratamento de feridas experimentais em ratos.

Foram utilizados 14 ratos, nos quais foram criadas bilateralmente na área caudal do dorso 2 feridas de 6 mm de diâmetro incluindo derme e epiderme. Os ratos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, sendo que em um grupo constituído por 8 ratos, a aplicação do laser foi feita do lado esquerdo e no outro grupo, constituído por 6 ratos, a aplicação do laser foi feita do lado direito. Os lados opostos não tratados serviram como controle. O laser foi aplicado a uma distância de 5 mm da ferida, numa potência de 0,5 mW, frequência de 500 Hz, duração de pulso 200 nseg, comprimento de onda 904 nm, durante 8 minutos. Os 14 ratos foram sacrificados em períodos que variaram de 1 a 14 dias, sendo que o tratamento com o laser foi realizado até a véspera do sacrifício. Todas as feridas tratadas e não tratadas mantiveram o mesmo padrão de reparo dentro do mesmo período de tempo. Nenhuma diferença foi observada com relação ao tempo de sangramento, nem formação ou perda de crosta. Nenhuma das feridas mostrou sinais de infecção durante o período de observação. A avaliação histológica não indicou diferenças morfológicas entre as feridas tratadas e não tratadas. Os autores concluíram que nenhuma melhora no processo de reparo da ferida pode ser acrescentado quando usado o laser de baixa potência.

Hallman et al.<sup>34</sup> (1988) examinaram *in vitro*, o efeito da irradiação laser de baixa intensidade hélio-nônio (He-Ne) na proliferação de fibroblastos humanos. As culturas de fibroblastos foram mantidas em 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. O tratamento iniciou 48h após a inoculação, e as culturas foram irradiadas diariamente, por 60 segundos, com o laser He-Ne (Dynatron 1120, Dynatronics, Salt Lake City, UT), 0,9mW de potência, 633nm de comprimento de onda, 24,7 mW/cm<sup>2</sup> de densidade de potência, usado no modo contínuo por um período de 5 dias. As culturas do grupo controle foram mantidas nas mesmas condições, no entanto, não foram irradiadas. Não

foi encontrada diferença estatisticamente significativa nas médias de replicação da cultura de fibroblastos entre os grupos irradiado e não irradiado. Os autores concluíram que o laser de He-Ne, na potência utilizada, não alterou a proliferação de fibroblastos humanos e que, se esta alteração existe, especificações do tratamento tais como comprimento de onda, duração, potência e intensidade devem ser cuidadosamente estabelecidas. Se os efeitos proliferativos não aumentam com a estimulação de baixa potência, então, a aceleração do reparo de feridas mostrada em outras pesquisas deve ser atribuída a outros mecanismos tais como alteração na síntese de colágeno e metabolismo celular.

Takeda<sup>106</sup> (1988) estudou histopatologicamente o efeito do laser de baixa intensidade no reparo inicial de feridas após extração de molares de ratos. Foram utilizados 24 ratos de 8 semanas de vida, os quais foram divididos em 2 grupos, controle e experimental. Os primeiros molares superiores direitos de todos os ratos foram extraídos, e no grupo experimental foi aplicado um laser semiconductor de arseneto de gálio (comprimento de onda = 904nm; densidade de potência = 25 mW/cm<sup>2</sup>; densidade de energia = 20 J/cm<sup>2</sup>), uma vez ao dia por 5 min durante o período de 0, 2, 4 e 7 dias. Os animais não irradiados serviram como controle. Após os períodos experimentais, os animais foram sacrificados e as peças preparadas em laboratório para análise histopatológica, sendo que a parede mesial da loja cirúrgica foi usada como referência para o exame. No dia zero, 5 minutos após a extração dos dentes, não houve diferenças entre os grupos controle e experimental. Aos 2 dias, foi observada uma maior proliferação de fibroblastos no grupo experimental que no grupo controle. Aos 4 dias, o grupo experimental apresentou formação de tecido osteóide trabecular ou matriz óssea com ou sem ossificação mais avançada do que no grupo controle. Aos 7 dias, o osso

trabeculado recém formado foi mais espesso e mais abundante no grupo experimental do que no controle. O autor constatou que a proliferação de fibroblastos dos remanescentes do ligamento periodontal foi mais pronunciada no grupo irradiado, bem como, foi mais rápida a formação de tecido osteóide trabecular.

Villa et al.<sup>122</sup> (1988) avaliaram histologicamente, a atuação do laser He-Ne na neoformação dentinária em polpas de dentes de ratos. Os animais tiveram os molares do lado direito desgastados e irradiados com 1 ou 2 aplicações de 4 minutos e foram sacrificados após 7 dias (grupos I e II), ou, 2 ou 3 aplicações de 4 minutos e sacrifício após 14 dias (grupos III e IV). Os molares do lado esquerdo foram usados como controle. Observaram que nos grupos irradiados houve neoformação dentinária sendo o processo inflamatório reacional ao desgaste de menor intensidade. A neoformação foi maior no grupo I decrescendo nos demais grupos. O lado não irradiado em todos os grupos, mostrou intenso processo inflamatório que, por vezes, evoluiu para necrose. Concluíram que a radiação laser é eficiente como bioestimuladora da neoformação dentinária.

Em 1989, Braverman et al.<sup>7</sup> examinaram os efeitos bioestimuladores da radiação laser em reparo de feridas em coelhos. Foram feitas 2 incisões lineares de 1,5 cm no dorso de setenta e dois coelhos que foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 18 animais: controle (grupo 1), utilização de ondas contínuas de He-Ne com comprimento de 632,8 nm, potência 10 mW, numa densidade de 1,65 J/cm<sup>2</sup> (grupo 2), uso pulsado de radiação laser infra-vermelho (GaAlAs), com comprimento de onda de 904 nm, potência de 50 mW, frequência de 4.672 Hz e densidade 8,25 J/cm<sup>2</sup> (grupo 3), utilização de ambos, He-Ne e infra-vermelho - GaAlAs (grupo 4). O laser utilizado foi o

Lasotronics Model 3 Therapy Laser (Zug, Switzerland), por 11 minutos, diariamente por 20 dias. As áreas das feridas foram medidas em fotografias padronizadas tiradas em intervalos periódicos (1, 3, 7, 11, 15 e 21 dias). No 21º dia os animais foram sacrificados. Amostras de tecido foram analisadas quanto à força de tensão e quanto à coloração do colágeno. Não foram encontradas diferenças significativas na força de tensão para o lado irradiado e não irradiado do mesmo grupo. Entretanto, para todos os grupos tratados com laser a força de tensão foi significativamente maior do que para o grupo 1. Nenhuma diferença foi detectada, entre os grupos, quanto ao grau de reparo da ferida e à área de colágeno. O crescimento da epiderme foi maior nas feridas tratadas com laser de He-Ne (grupo 2) comparado ao tecido não exposto, mas a diferença não foi significativa. Concluíram que a irradiação de feridas experimentais com laser de HeNe a  $1,65 \text{ J/cm}^2$  e com laser infravermelho a  $8,25 \text{ J/cm}^2$  isolada ou em combinação diariamente por 20 dias aumentou a força de tensão durante o reparo e pode ter liberado fatores teciduais na circulação sistêmica que aumentaram a força de tensão também no lado oposto.

Pourreau-Schneider et al.<sup>78</sup> (1989) estudaram o efeito bioestimulador de um laser de baixa intensidade hélio-neônio (Soft Laser 632, Worldwide Laser International), num comprimento de onda de 632,8 nm,  $10\text{mW/cm}^2$  de densidade de potência total num estudo *in vitro* usando fibroblastos humanos. Tecido gengival foi obtido por biópsia da região retromolar de pacientes jovens que tinham indicação de extração do 3º molar. As biópsias foram preparadas para cultura de células passando por vários processos até que fossem obtidos os fibroblastos. As células foram divididas em 4 grupos: grupo I (controle, no qual as células não foram irradiadas), grupo II (recebeu 10 min de aplicação do laser, resultando numa exposição total de  $1,2 \text{ J/cm}^2$ , no dia 0), grupo III

(recebeu a aplicação do laser nos dias 0 e 7), grupo IV (recebeu a aplicação do laser nos dias 0, 7 e 11 ). A contagem do número de células foi feita nos dias 4, 7, 11 e 14. Microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para observar as modificações ultra-estruturais nas células estimuladas pelo laser. A irradiação com o laser de baixa intensidade promoveu crescimento de fibroblastos e induziu alterações morfológicas a nível ultraestrutural, tais como: hipertrofia e hiperplasia mitocondrial, desenvolvimento de microfilamentos citoplasmáticos e matriz fibrilar abundante na região pericelular. Segundo os autores, extremo cuidado deve ser tomado ao se extrapolar resultados *in vitro* para situações clínicas, porém, é possível que algumas ou todas as modificações que ocorrem no comportamento dos fibroblastos possam estar altamente envolvidas na aceleração do processo de reparo da ferida gengival que se segue a um tratamento com o laser He-Ne.

In de Braekt et al.<sup>42</sup> (1991) avaliaram o efeito do laser de baixa intensidade de arseneto de gálio-alumínio (GaAsAl, Medical P Laser 924 – Creative Medical Systems, Copenhagen, Denmark), no reparo e contração de feridas depois de cirurgia palatal em cães com 12 semanas de vida. Foram utilizados 30 animais, os quais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: grupo L (n = 12), grupo LL (n = 12) e controle (n = 6). Nos grupos experimentais foram realizados defeitos através de excisões mucoperiostais em forma de elipse na região central do palato, seguido por duas incisões relaxantes paralelas à arcada dental. O defeito em forma de elipse foi suturado deixando duas regiões de osso exposto adjacente aos dentes. Após a sutura, pontos de tatuagem foram colocados no mucoperiósteo a uma distância de 1 mm das margens das feridas do lado oposto da área de osso descoberta e, em cada lado da região central da área da incisão. No grupo controle, nenhuma cirurgia foi realizada e os pontos de tatuagem foram

colocados em locais correspondentes ao mucoperiósteo palatino. No grupo LL, foram feitas 4 irradiações nas áreas de osso descobertas, utilizando comprimento de onda de 830 nm, potência de 30 mW, por 33s, resultando em uma dosagem de  $1\text{J}/\text{cm}^2$ , logo após a cirurgia e 3 vezes por semana totalizando 10 aplicações. Nos grupos L e controle não foi aplicado o laser. O reparo das feridas foi observado clinicamente até a completa cicatrização na quarta semana de pós-operatório. A área das feridas foi medida em intervalos regulares sobre fotografias intra-orais padronizadas e a contração foi calculada através da soma das distâncias entre os pontos tatuados nas margens. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na qualidade e grau de reparo da ferida entre os dois grupos experimentais. Também não foi encontrada diferença significativa para a soma das distâncias entre os pontos para os dois grupos. Os autores concluíram que macroscopicamente o laser de baixa intensidade, nas condições usadas neste estudo, não influenciou a cicatrização e contração a ferida.

Breugel e Bär<sup>8</sup>, em 1992, submeteram cultura de fibroblastos humanos à irradiação com laser hélio-nônio (Spindler & Hoyer tipo 45-7) (comprimento de onda = 632,8 nm) sob várias doses de energia, variando a densidade de potência e o tempo de exposição. As monocamadas de células foram irradiadas por 3 dias consecutivos, por períodos entre 0,5 e 10 minutos. A potência do laser variou de 0,55 a 5,98 mW. O número de células e a produção de colágeno tipo I foram determinadas para cada condição de irradiação. Os resultados mostraram que quando a potência do laser estava abaixo de 2,91 mW aumentava a proliferação celular, enquanto potência de laser maior (5,98 mW) não causava efeito. Os efeitos estimulatórios foram mais pronunciados em intervalos de irradiação entre 0,5 e 2 minutos. A produção de colágeno tipo I, determinada pelo teste ELISA, alterou inversamente à proliferação celular, isto é, quando a proliferação celular

aumentou, a produção de colágeno tipo I diminuiu. Concluíram que o tempo de exposição e a densidade da potência determinam os efeitos da irradiação com laser, podendo estimulação e inibição das propriedades das células ser obtidas com o mesmo tipo de laser.

Honmura et al.<sup>41</sup> (1992) avaliaram o efeito terapêutico da irradiação laser diodo de arseneto de gálio-alumínio (FLAT 10, Fuji Electric Co., Tokyo), 780 nm de comprimento de onda; de modo contínuo, 10 mW de potência, 31,8 J/seg/cm<sup>2</sup> de densidade de energia, com diâmetro de ponta de 0,2 mm, sobre a inflamação induzida experimentalmente em ratos. As inflamações foram provocadas através da carragenina, um tipo de polissacarídeo, utilizando-se 3 modelos experimentais diferentes (modelo bolsa de ar, modelo granuloma, modelo edema das patas) e foram tratadas com uma aplicação diária de laser ou com indometacina, um potente agente antiinflamatório. No modelo bolsa de ar realizado no dorso dos ratos, a carragenina foi injetada para induzir a inflamação e, foi avaliado o efeito da irradiação laser e da indometacina sobre a permeabilidade vascular. No modelo granuloma, uma bolinha de algodão embebida com a carragenina ou soro fisiológico foi implantada no tecido subcutâneo do dorso dos ratos e foi aplicado o laser ou administrada 1mg/Kg de indometacina por 7 dias. No oitavo dia, a bolinha foi removida junto com o granuloma formado, o qual após permanecer 24h a 48° C teve seu peso seco medido. No modelo edema de pata, a inflamação foi induzida pela injeção de carragenina na área subplantar e, somente a pata esquerda foi tratada com irradiação laser para comparar o inchaço e examinar o efeito antiinflamatório. Para este último modelo, no grupo tratado com a indometacina, a droga foi injetada 1 hora antes da indução da inflamação. Cada um dos modelos experimentais teve um grupo controle no qual foi feita a indução da inflamação e não

foi instituído nenhum tipo de tratamento. Verificou-se que o laser de baixa intensidade inibiu o aumento da permeabilidade vascular durante a ocorrência da inflamação aguda, no modelo bolsa de ar; inibiu o edema no estágio agudo, no modelo edema de pata e; inibiu a formação do granuloma no modelo granuloma. Em todos os casos, a irradiação por menos de 10 min foi suficiente para inibir a inflamação cerca de 20 a 30%. O efeito inibidor da irradiação laser não foi comparável ao da indometacina (4mg/Kg) no modelo bolsa de ar e no modelo de edema de pata, entretando, foi mais potente do que a administração diária de indometacina (1mg/Kg) no modelo granuloma.

Silva et al.<sup>93</sup> (1992) avaliaram clinicamente os efeitos de um laser de baixa intensidade do tipo semiconductor de arseneto de gálio-alumínio (Ga-Al-As, Compact Laser da J. Morita Corporation), com comprimento de onda de 790nm, potência de pico de 30 mW, em aproximadamente 300 aplicações, durante um período de 10 meses. Foram feitas aplicações do laser de baixa intensidade em diversas áreas e os resultados, de acordo com a avaliação clínica, foram classificados em eficiente e ineficiente. Aplicou-se o laser nos casos de hipersensibilidade dentinária e em preparos extensos, onde se obteve sucesso em 100% dos casos, o que sugere a capacidade do laser em inibir o processo da dor. Em Endodontia, foram feitas aplicações após instrumentação dos canais radiculares, na região apical das raízes em 33 pacientes, sendo ineficiente em apenas cinco casos. Nos casos de inflamação gengival e abscessos gengivais, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, havendo redução significativa no grau de inflamação. Em relação aos implantes, as aplicações foram feitas antes, durante e após a cirurgia. Onde foi feito o implante e não houve a aplicação do laser, o paciente relatou intensa dor em toda a região de intervenção persistindo por cerca de 10 dias. Nos casos em que foi feita a aplicação do laser, não houve sensibilidade dolorosa e a reparação

tecidual foi melhorada. Concluíram que esse tipo de laser auxiliou nos casos de Endodontia e Periodontia através de seus efeitos analgésicos, antiinflamatório e bioestimulador, obtendo-se também bons resultados em casos de dor pós-preparos cavitários e pós-cirurgias dentárias.

Niccoli-Filho et al.<sup>70</sup> (1993) se propuseram a avaliar o processo de reparo em feridas de extração dental após a aplicação do laser tipo Hélio-Neônio verde. Foram utilizados 48 ratos de 80 dias de vida, os quais foram divididos em 2 grupos: controle e tratado. Os incisivos superiores esquerdos de todos os ratos foram extraídos e, no grupo tratado, antes da sutura, o alvéolo recebeu aplicação direta de irradiação laser do tipo Hélio-Neônio verde por meio de fibra óptica, numa potência de 0,95 mW, comprimento de onda de 550 nm (cor visível), divergência de 1,7 mRAD, por 6 minutos. No grupo controle, após a extração dentária, a mucosa gengival foi suturada com fio de seda 4-0 da mesma forma que no grupo tratado. Os animais foram sacrificados aos 3, 7, 14 e 21 dias após o ato cirúrgico. Aos 3 dias foram observadas as mesmas características para o grupo tratado e controle, com presença de coágulo sanguíneo preenchendo todo o alvéolo dental e fibroblastos jovens invadindo este coágulo. Nos períodos subsequentes (7, 14 e 21 dias) foram observados, no grupo tratado, um pequeno incremento na proliferação osteoblástica e na formação de tecido ósseo, porém não significantes quando comparados ao grupo controle. Os resultados do trabalho sugeriram que o uso da irradiação laser de He-Ne verde não determina benefícios sobre o processo de reparo, sendo que a proliferação de fibroblastos e a formação de tecido osteóide não foram mais proeminentes no grupo tratado.

O processo de reparo de feridas experimentais em ratos auxiliado pelo tratamento com laser de baixa intensidade, também foi estudado por Hall et al.<sup>33</sup> (1994). Utilizaram para este experimento 38 ratos, nos quais foram feitas duas feridas de 6mm de diâmetro, incluindo camadas da derme e epiderme, bilateralmente, na área caudal do dorso. Os ratos foram aleatoriamente divididos em 2 grupos com 19 ratos em cada grupo. No grupo A, o laser infra-vermelho pulsado de arseneto de gálio (IR CEB-UP MID Laser - Space Laser®), numa potência média de 1 mW, comprimento de onda de 904 nm, 500 Hz de frequência de pulso, densidade de 0,2 J/cm<sup>2</sup>, com a ponta numa distância de 2 mm, foi aplicado na ferida de um lado (A1), deixando o lado contralateral para controle dos possíveis efeitos sistêmicos do laser (A2). No grupo B foi aplicada uma irradiação placebo de um lado (B1) e o outro lado foi deixado sem tratamento (B2). As feridas experimentais do grupo de irradiação laser e do grupo placebo foram tratadas por um minuto por dia, durante o período de observação, começando imediatamente após a abertura das feridas. Diariamente, cada ferida era examinada quanto à presença de sinais de sangramento, infecção, formação/perda da crosta e epitelização, além de serem medidas e fotografadas. Cada 2 animais foram sacrificados em períodos que variaram de 3 a 21 dias, sendo que o tratamento com o laser ou irradiação placebo foi realizado até a véspera do sacrifício. Nenhuma diferença clínica ou histológica do processo de reparo da ferida foi observada entre os quatro grupos, durante o período de observação. Clinicamente, em todos os grupos ocorreu a formação do tecido de granulação dentro de 24h, formação da crosta em 3 dias, perda da mesma crosta por volta dos 7 dias e completa epitelização aos 12 dias. Microscopicamente, no terceiro dia foi detectada sobre a ferida, uma crosta de fibrina com infiltração de células inflamatórias, e subjacente organização de tecido de granulação. Aos 7 dias, o tecido de granulação exibia completa maturação e, depois de 10 a 20 dias as lesões exibiram

reparo completo, com queratinização normal do epitélio, para todos os grupos. O estudo não confirmou que a irradiação laser de baixa intensidade tem alguma influência sobre o processo de reparo da ferida.

Loevschall e Arenholt-Bindslev<sup>56</sup> (1994) estudaram “in vitro” os efeitos da irradiação laser de baixa intensidade na proliferação de fibroblastos bucais humanos, usando um laser diodo de arseneto de gálio-alumínio (SLD – 301V, Sony, Japan), comprimento de onda de 812 nm, potência de 84 mW e densidade de potência de  $4,5 \pm 0,5 \text{ mW/cm}^2$ . As culturas foram divididas em oito grupos, sendo que um grupo serviu como controle. A irradiação laser foi realizada por 0; 1; 3; 10; 32; 100; 316 ou 1000 segundos, correspondendo a exposições de 0; 4.5; 13.5; 45; 144; 450; 1.422; 4.500  $\text{mJ/cm}^2$  respectivamente. Subsequentemente, as células receberam  $^3\text{H-dT}$  no meio por 16h para incorporação de DNA. Os resultados do estudo sugeriram que a irradiação laser de baixa intensidade aumenta a proliferação celular e pode induzir um aumento na síntese de DNA.

Em 1995, Garcia e Milanezi<sup>27</sup> compararam a ação do laser de Arsênio e Gálio (Cavity-D1), com comprimento de onda de 904 nm, em diferentes frequências, potências e períodos sobre feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos. Trinta e seis animais foram divididos em três grupos: I) laser com frequência de pulso de 1300 Hz, potência 1,25 mW e tempo de 19s por ponto de aplicação, II) laser com frequência de pulso de 2100 Hz, potência 2.00 mW e tempo de 12 s por ponto de aplicação e III) laser com frequência de pulso de 2900 Hz, potência de 2,75 mW e tempo de 9 s por ponto de aplicação. Para cada animal, estabeleceu-se que a ferida do lado direito seria considerada a experimental e a do lado esquerdo a controle (não irradiada). A aplicação

do laser foi feita de forma “pontual” em 8 localizações na área externa e em 1 ponto na forma de “varredura” na área central e, a densidade de energia usada foi  $3\text{J}/\text{cm}^2$  por ponto de irradiação. Foram feitas medidas do diâmetro das feridas nos tempos inicial, 3, 7 e 14 dias, tanto para os grupos experimentais como para o controle. As análises biométricas levaram a obtenção de dados, que submetidos a análise de variância e ao teste de Tukey permitiram as seguintes conclusões: 1) as feridas experimentais tratadas com raios laser mostraram maior contração tecidual; 2) houve diferenças biométricas significativas entre os grupos e tempos estudados, com maior contração tecidual das feridas dos grupos II e III nos períodos de 3 a 7 dias; 3) no final da pesquisa (14 dias), as feridas experimentais do grupo II mostravam maior índice de contração quando comparadas com as dos Grupos controle, I e III.

Em 1996, Garcia et al.<sup>28</sup> analisaram histologicamente o processo de reparação de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos e submetidas ao tratamento com raios laser. Foram utilizados 15 ratos, os quais foram distribuídos em: grupo experimental e grupo controle. Com o auxílio de um trépano de 8 mm de diâmetro foi realizada a remoção de dois fragmentos circulares de pele na região dorsal, sendo um à direita e outro à esquerda do plano sagital mediano. As feridas do lado direito foram tratadas com laser com as seguintes características: semicondutores Arsênio e Gálio, infravermelho, emissão pulsátil, comprimento de onda de 904 nm, potência de 2 mW, frequência de 2100 Hz, densidade  $3\text{ J}/\text{cm}^2$ , o que determinou um tempo de exposição de 12 segundos em cada um dos 9 pontos de aplicação estabelecidos, totalizando 108 segundos. As feridas do lado esquerdo não receberam nenhum tipo de tratamento e constituíram o grupo controle. Após 3, 7 e 14 dias, os animais foram sacrificados e as peças avaliadas histologicamente. No período de 3 dias, observou-se uma proliferação

epitelial mais intensa no grupo experimental do que no controle. Aos 7 dias, o epitélio recobriu toda a ferida no grupo experimental, com tecido conjuntivo exibindo um discreto número de linfócitos, enquanto que no grupo controle, o epitélio recobriu 2/3 da ferida e o tecido conjuntivo exibiu moderado número de linfócitos e macrófagos. Aos 14 dias, em ambos os grupos, o epitélio recobriu toda a ferida, no entanto, na área mais central, este mostrou-se menos diferenciado no grupo controle. Os autores concluíram que as feridas do grupo experimental mostraram reparação mais evoluída que as do grupo controle, com elevada taxa de migração epitelial, acentuada proliferação fibroblástica e vascular, evolução mais rápida do quadro agudo para o crônico, sendo que os eventos biológicos foram mais evidentes nos períodos de 3 e 7 dias. Além disso, não observaram nenhum sinal de efeito indesejável da aplicação do raio laser sobre a reparação de feridas.

Garcia et al.<sup>29</sup> (1996) analisaram histologicamente em ratos, o processo de reparação em feridas de extração dental submetidas ao tratamento com laser de baixa intensidade de arsênio e gálio (CAVITY – D1- UP), na forma pontual, com comprimento de onda de 904nm; potência de 2mW, frequência de 2100 Hz, por meio de fibra ótica. Foram utilizados 32 ratos, dos quais foram extraídos o incisivo superior do lado direito. No grupo controle, após a extração, foi realizada a sutura com fio de seda 4-0, e no grupo experimental após a sutura foi realizada uma única aplicação do laser por 3 minutos. Decorridos 3, 7, 14 e 21 dias do ato cirúrgico, os animais foram sacrificados e as peças preparadas para análise histológica. Aos 3 dias, observou-se uma proliferação fibroblástica e capilar mais intensa no grupo experimental que no controle. Aos 7 dias o alvéolo dental apresentou-se totalmente preenchido por tecido conjuntivo neoformado mais desenvolvido quando comparado ao grupo controle. Nos períodos de

14 e 21 dias foi observada uma neoformação de trabéculas ósseas mais rápida no grupo experimental do que no controle. Os autores concluíram que: 1) as feridas do grupo experimental demonstraram aceleração do processo de reparação alveolar, caracterizado por formação mais rápida do tecido de granulação cicatricial, formação mais precoce e em maior extensão do tecido ósseo alveolar e fechamento mais rápido das bordas 2) os eventos histológicos mostraram-se mais evidentes nos períodos iniciais de 3 e 7 dias, persistindo com características mais favoráveis durante todo o experimento. Aos 21 dias, as feridas do grupo experimental demonstraram reparação mais diferenciada do que as do grupo controle, caracterizada por formação óssea em toda a extensão alveolar.

Neiburger<sup>69</sup> (1997), avaliaram se a irradiação laser influenciava o processo de reparo de feridas gengivais em humanos. O laser usado foi um laser diodo He-Ne, (Apollo, Ronkonoma, NY) com uma potência de 5 mW e comprimento de onda de 670 nm. Cinquenta e dois pacientes foram submetidos a extrações dentárias simples e, no local da cirurgia foram feitas 2 incisões de alívio (uma mesial e outra distal) de 4mm de extensão indo da gengiva ao osso alveolar. Uma das incisões, escolhida aleatoriamente serviu como controle e a outra foi submetida a uma aplicação de laser He-Ne de 30 segundos com uma ponta de 4 mm de diâmetro, fixada a uma distância de 1 cm da superfície alvo, produzindo uma densidade de energia de  $1,2 \text{ J/cm}^2$ . O grau de reparação foi avaliado clinicamente e através de fotografias em um retorno marcado 2 a 7 dias após a cirurgia. Setenta e nove por cento das incisões irradiadas repararam mais rapidamente que as não irradiadas, 13% demonstraram um retardo do reparo e 8% não mostraram nenhuma diferença quando comparadas às incisões controle. Não foi observada diferença significativa comparando-se os pacientes por idade, gênero, raça ou localização anatômica da incisão. Este estudo sugeriu que o laser diodo He-Ne acelerou

o processo de reparação da ferida gengival em humanos, sem apresentar efeitos negativos.

Oliveira et al.<sup>74</sup>, em 1997, avaliaram os efeitos da irradiação laser de arsênio-gálio sobre o processo de reparo de feridas cutâneas. Foram utilizados 72 ratos, nos quais foram feitas incisões padronizadas com extensão de 3 cm na região medial do dorso e suturadas com fio de mononylon 4.0. Os animais foram divididos em três grupos, sendo que o Grupo I serviu como controle e não recebeu a aplicação do laser. No Grupo II, os animais foram submetidos a aplicação pós-cirúrgica do laser durante 2 minutos e no Grupo III o laser foi aplicado por 4 minutos. O aparelho utilizado foi o Cavity-DI-MID LASER (Space Laser Ibérica S/A), com emissão pulsátil em forma de varredura, comprimento de onda de 904 nm, potência de 2 mW e frequência de repetição de 2.100 Hz. Os animais foram sacrificados em grupos de 6, nos períodos de 1, 3, 6 e 9 dias após a aplicação do laser e o tecido foi removido e avaliado histologicamente. No 1º dia pós-operatório foram encontrados próximo à área de incisão, hiperemia, edema, reação inflamatória predominantemente aguda e hemorragia mais significativa no grupo controle. No 3º dia não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos e observou-se discreta redução do infiltrado inflamatório agudo, aumento da proliferação fibroblástica e neoformação capilar. No 6º dia, os grupos tratados apresentaram formação de anexos cutâneos, diminuição do infiltrado inflamatório e maturação do tecido de granulação, enquanto que o grupo controle apresentava reação inflamatória crônica. No 9º dia o grupo controle ainda apresentou células gigantes do tipo corpo estranho e reação inflamatória crônica, enquanto que os grupos tratados apresentaram anexos cutâneos, ausência de reação inflamatória e fechamento da ferida cirúrgica. Os autores concluíram que independente do tempo de

aplicação (2 e 4 minutos), o laser (As-Ga) promoveu uma aceleração no processo de reparo em feridas cutâneas.

Lopes<sup>58</sup>, em 1999, propuseram dois modelos de estudo “*in vitro*”, usando fibroblastos de gengiva humana em condição de déficit nutricional parcial (meio de cultivo com 5% de soro fetal bovino) e em condição de déficit nutricional total (meio sem soro fetal bovino), simulando duas situações de estresse. Verificou que o primeiro modelo é o ideal para se trabalhar com essas células. Verificou que usando a mesma irradiância e fluência, o comprimento de onda que induziu maior proliferação celular foi aquele situado na região do visível. Quando foi mantida a mesma fluência mas com diferente irradiância, o melhor resultado foi obtido com radiação no infravermelho. Em ambos os casos os grupos irradiados apresentaram proliferação celular significativamente maior nos grupos irradiados quando comparados ao controle.

Kucerová et al.<sup>51</sup> (2000) avaliaram o efeito de diferentes frequências da irradiação de dois diferentes aparelhos de laser de baixa intensidade, no processo de reparo depois da extração de molares humanos. Os aparelhos usados foram o laser diodo de arseneto de gálio-alumínio (MED 100 N - Lasotronic, Zug, Switzerland) num comprimento de onda de 670 nm e uma potência de 20 mW, e o laser bioestimulador de Hélio-Nêonio (Medicom, Prague, Czech Republic) num comprimento de onda de 632,8 nm e potência de 5 mW. Cento e cinquenta pacientes tiveram seus molares inferiores extraídos por estarem semi-inclusos ou cariados e foram divididos em 5 grupos, sendo que nos grupos 1, 2, 3 foi usado o laser diodo GaAlAs nas frequências de 292 Hz, 9000 Hz e 5 Hz respectivamente. No grupo 4 foi usado o laser He-Ne numa frequência de 5 Hz e no grupo 5 não foi utilizado nenhum tipo de laser (grupo controle). Para todos os grupos

tratados com laser foi usada uma densidade de energia de 1,5 J/cm<sup>2</sup>. Os pacientes foram irradiados com os diferentes tipos de laser no dia da cirurgia e nos 4 dias seguintes, ao longo das paredes lingual, vestibular e na parte central da ferida. A avaliação subjetiva das terapias utilizadas foi feita usando uma escala que incluía desde efeito negativo até excelente, e mostrou que em relação à dor os pacientes sentiram-se melhor após o tratamento. Mudanças nos níveis de imunoglobulina A secretora e de albumina e na densidade óssea foram comparados antes da cirurgia e no 5º dia pós-operatório. Foram observadas diferenças significativas nos níveis salivares de IgA secretora e albumina, entre os grupos irradiados e não irradiados e na comparação entre os grupos irradiados por várias modalidades de frequência. O mais alto incremento nos níveis de IgAs e albumina foram observados no grupo tratado a uma frequência de 9000 Hz. Nenhuma diferença foi observada entre a densidade óssea em alvéolos irradiados e não irradiados após 6 meses de cirurgia. Os autores concluíram que o laser de baixa intensidade melhora o processo de reparo das feridas após a extração, contudo não tem influência no processo de osseointegração, não tendo sido encontrada diferença na densidade óssea quando comparados os grupos irradiados e o grupo controle.

Ribeiro et al.<sup>81</sup>, em 2000, avaliaram a resposta do tecido pulpar de dentes decíduos pulpotomizados de cães quando submetidos ou não, ao semicondutor laser de arseneto de gálio-alumínio de baixa potência. Para a realização do experimento foram utilizados os segundos pré-molares e primeiros molares de 9 cães, totalizando 56 dentes não cariados, os quais foram divididos em três períodos experimentais: 7 dias (10 dentes irradiados e 4 não irradiados), 15 dias (8 dentes irradiados e 4 não irradiados) e 30 dias (20 dentes irradiados e 10 não irradiados). Os dentes foram pulpotomizados e a hemorragia contida com bolinhas de algodão esterilizadas. Nos dentes que receberam o

laser, este foi aplicado sobre o remanescente pulpar, com uma ponta de 1,30 mm de diâmetro por 60s, num comprimento de onda de 790nm e potência de 30mW resultando numa densidade de 135,61 J/cm<sup>2</sup>. As câmaras pulpares de todos os dentes tratados foram obturadas com cimento de óxido de zinco e eugenol e estes foram restaurados com cimento de ionômero de vidro. A avaliação histológica foi feita por um único examinador, sem a identificação dos grupos. Dos 56 dentes, 40 foram avaliados histologicamente, uma vez que 16 dentes foram perdidos por falta de restauração ou durante o processamento histológico. Os resultados mostraram que aos 7 dias após a pulpotomia, ocorreu melhor resposta pulpar com graus leve e muito leve de inflamação para os elementos pulpotomizados e irradiados, em relação aos não irradiados, nos quais foram observados graus moderados e severos de inflamação. Aos 15 dias após a pulpotomia, metade dos dentes irradiados exibiram graus leve e moderado de inflamação e a outra metade apresentou necrose parcial da polpa radicular, enquanto nos dentes não irradiados foram observadas inflamação aguda severa e necrose total da polpa radicular. No grupo de 30 dias após a pulpotomia, necrose total da polpa foi observada em 60% dos dentes irradiados e em 60% dos dentes não irradiados. Os autores concluíram que nenhum efeito benéfico do laser de baixa potência GaAlAs foi acrescentado à pulpotomia convencional, em relação à resposta pulpar.

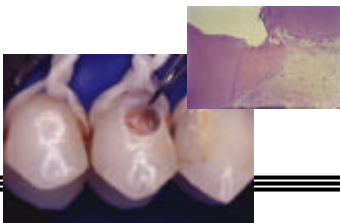
Freitas et al.<sup>26</sup> (2001) avaliaram o efeito anti-inflamatório do laser diodo infravermelho (Laser Beam, RJ, Brasil), com comprimento de onda de 830 nm, no pós-operatório de cirurgias de terceiros molares retidos. A população alvo foi de 24 pacientes divididos aleatoriamente em dois grupos. O grupo teste foi submetido à laserterapia, realizada a uma distância focal de 0,5 cm por um tempo total de dois minutos em corrente contínua, nos pontos preestabelecidos, 24 e 48 horas de pós-

operatório. O laser foi utilizado numa potência de 40 mW e dosimetria de 4,8 J/cm<sup>2</sup>. O grupo controle foi submetido a uma falsa irradiação, nos mesmos intervalos do grupo teste. As amostras de sangue, para a dosagem da proteína C-reativa (PCR) foram colhidas antes da cirurgia e após 48 e 72 horas. Os valores da PCR no grupo teste às 48 horas apresentou uma variabilidade bem menor (0,320 mg/dl) comparada com o grupo controle (0,862 mg/dl), porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significante. Nas 72 horas de pós-operatório os valores da PCR foram bastante semelhantes (0,272 e 0,608 mg/dl, respectivamente) o que pode ser explicado, por uma tendência natural de redução dos níveis desta proteína.

Pretel et al.<sup>79</sup> (2001) avaliaram a influência do laser de baixa intensidade (semicondutor de GaAlAs, infravermelho, comprimento de onda de 785 nm, potência de 50 mW), com ou sem a pomada à base de éster do ácido ricinoléico, na reparação tecidual em ratos. Foram utilizados 36 ratos, submetidos a abertura de feridas confeccionadas no dorso, com trefano de biópsia de 6 mm de diâmetro e distribuídos em 4 grupos. Após 3, 7 e 14 dias os ratos foram sacrificados, as peças removidas e processadas para inclusão em parafina e coradas com H.E., Tricrômico de Masson e Ptero Sirius Red, para análise em microscopia óptica. Os resultados sugeriram que o laser acelerou a reparação quando comparado aos demais grupos, aumentou a angiogênese, aumentou a quantidade e maturação das fibras de colágeno antecipando a reepitelização e, abreviou os processos inflamatórios. A pomada não foi eficiente quando comparada ao tratamento com laser.

Crisci<sup>18</sup> (2002) avaliou histologicamente o efeito do laser de baixa intensidade diodo semicondutor de arseneto de gálio e alumínio (GaAlAs), com comprimento de

onda de 785 nm, infravermelho, potência de emissão de 50 mW e densidade de energia de 3 J/cm<sup>2</sup>, em emissão contínua, por meio de ponta especial de fibra óptica, por um período de 2 segundos, em exposições pulpares induzidas em dentes de ratos. Foram utilizados 60 ratos, dos quais cada animal ofereceu dois dentes (totalizando 120 dentes), que foram distribuídos em 5 grupos experimentais: grupo I (controle): exposição capeada com hidróxido de cálcio; grupo II: laser imediato + hidróxido de cálcio; grupo III: laser imediato + hidróxido de cálcio + laser após 24 horas; grupo IV: laser imediato + hidróxido de cálcio + laser após 24 e 48 horas; e grupo V: somente a aplicação do laser. Decorridos os períodos experimentais de 7 e 30 dias, os animais foram sacrificados, as peças removidas e preparadas para análise histológica. De acordo com a proposta e as condições específicas do trabalho, os resultados permitiram aos autores concluir que as associações laser imediato + hidróxido de cálcio e laser imediato + hidróxido de cálcio + laser 24 horas, foram os grupos que apresentaram os melhores resultados tanto aos 7 dias (prevalência de polpas vitais com inflamação discreta), quanto aos trinta dias (presença de barreira de tecido mineralizado e polpa vital).



### *3. Proposição*

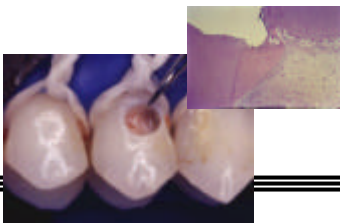
---

---

---

### 3. *Proposição*

Avaliar histologicamente e de forma comparativa a resposta do tecido pulpar de dentes de macacos-prego (*Cebus apella*) exposto mecanicamente e capeado com proteínas bioativas extraídas da dentina de dentes de coelhos ou com pasta de hidróxido de cálcio, associado ou não ao laser de baixa potência.



## *4. Material e Método*

---

---

---

## 4. Material e método

Para o experimento foram utilizados 4 macacos-prego (*Cebus apella*), machos, 7 anos de idade (adultos jovens) e peso corporal entre 2 e 3 Kg, alojados no Núcleo de Procriação de Macacos-Prego do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. O projeto de pesquisa referente a este trabalho foi submetido ao Comitê de Avaliação do referido Núcleo, tendo sido aprovado em 24 de maio de 2002 (Anexo 1), bem como ao Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara e aprovado em 10 de setembro de 2002 (Anexo 2).

Foram selecionados 24 primeiros, segundos e terceiros pré-molares superiores e inferiores e 6 primeiros molares, os quais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de tratamento: G1 = pasta de hidróxido de cálcio\* em água destilada (grupo controle), G2 = laser + pasta de hidróxido de cálcio em água destilada, G3 = proteína bioativa\*\*, G4 = laser + proteína bioativa, G5 = aplicação apenas do laser sobre a exposição. Seis primeiros molares foram utilizados como controle hígido (G6), com a finalidade de avaliar a efetividade de fixação das peças histológicas (Tabela 1 e Anexo 3).

O procedimento operatório foi realizado sob anestesia geral obtida por meio de injeção intraperitoneal de tiopental sódico\*\*\* na dosagem de 30 mg/kg de peso

---

\* Hidróxido de cálcio p.a. - LABSYNTH Produtos para Laboratórios Ltda, SP.

\*\* Extraída da dentina de coelhos de acordo com metodologia descrita por Smith et al.<sup>102</sup> (1994) (Gentilmente fornecida por Dr. Antony Smith, Oral Biology, School of Dentistry, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom)

\*\*\* Thiopentax - Cristália - Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira - SP

corporal e injeção intramuscular de diazepínico\* na dosagem de 0,12 mg/kg de peso corporal.

Foi realizada raspagem e polimento dental com pedra pomes e água e efetuado o isolamento absoluto com dique de borracha e a anti-sepsia do campo operatório com álcool iodado 3% seguido pela neutralização com álcool 70% (Ito, et al.<sup>45</sup>, 1998).

Tabela 1 – Distribuição do número de dentes de acordo com os grupos experimentais e os tratamentos realizados.

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Tratamento empregado</b>	<b>Número de dentes</b>
G1	Pasta de hidróxido de cálcio em água destilada	6
G2	Laser + pasta de hidróxido de cálcio em água destilada	6
G3	Proteína bioativa	6
G4	Laser + proteína bioativa	6
G5	Laser	6
G6	Controle hígido	6

Todo o instrumental e material utilizados foram esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos.

Cavidades de classe V profundas foram preparadas na região cervical da face vestibular dos dentes, utilizando-se para isto fresas diamantadas cilíndricas n°. 1090\*\* em alta rotação com abundante refrigeração ar/água. A fresa foi substituída a cada 4 preparos cavitários realizados. Para a padronização da profundidade da cavidade, a ponta ativa da fresa recebeu uma delimitação confeccionada com resina composta, limitando-a em 2,0 mm de comprimento. Esta padronização permitiu a visualização

\* Diazepam – Vital Brasil

\*\* Ponta diamantada 1090 - KG Sorensen

por transparência de uma coloração rósea no assoalho do preparo cavitário, indicando a proximidade da polpa. A cavidade preparada foi irrigada com soro fisiológico para a remoção das raspas de dentina e, em seguida, foi empregada uma sonda nº1, a qual promoveu a exposição mecânica do tecido pulpar sem, no entanto, penetrar no interior da polpa coronária. Este procedimento foi empregado com o objetivo de evitar a dilaceração tecidual, o que poderia dificultar o processo de reparação, interferindo nos resultados da pesquisa. A hemorragia proveniente da exposição pulpar foi contida através de irrigação com soro fisiológico e cuidadosa compressão da ferida com bolinhas de algodão esterelizadas.

Os materiais testados foram aplicados sobre a exposição pulpar e assoalho da cavidade e, protegidos por um disco de metal esterilizado, o qual foi confeccionado a partir de lâmina de aço inoxidável para matriz. A interposição do disco de metal entre o material capeador e o material de base, teve o objetivo de evitar a interferência deste último, no processo de reparo pulpar.

A pasta de hidróxido de cálcio em água destilada foi manipulada na proporção de 15 mg de hidróxido de cálcio p.a. para 20 µl de água destilada. O “pool” de proteínas foi aplicado num total aproximado de 100 µg por dente.

Após a colocação do disco de metal, foi realizada uma base cavitária com óxido de zinco e eugenol e restauração com amálgama de prata.

Nos grupos onde foi usado o laser de baixa potência, o mesmo foi aplicado antes da colocação dos materiais capeadores. O laser utilizado foi o diodo de InGaAlP\* (potência de 30mW, comprimento de onda de 685 nm, tempo de aplicação 67 s,

---

\* Thera Lase – DMC Equipamentos Ltda– São Carlos - SP

densidade de energia de  $2,00 \text{ J/cm}^2$ ), em emissão contínua, na forma de varredura, com o aparelho fixo apoiado no ângulo cavo-superficial da cavidade.

A Figura 1 ilustra esquematicamente as camadas de material desde a proteção pulpar até a restauração final e as Figuras de 2 a 9 ilustram a seqüência dos procedimentos executados.

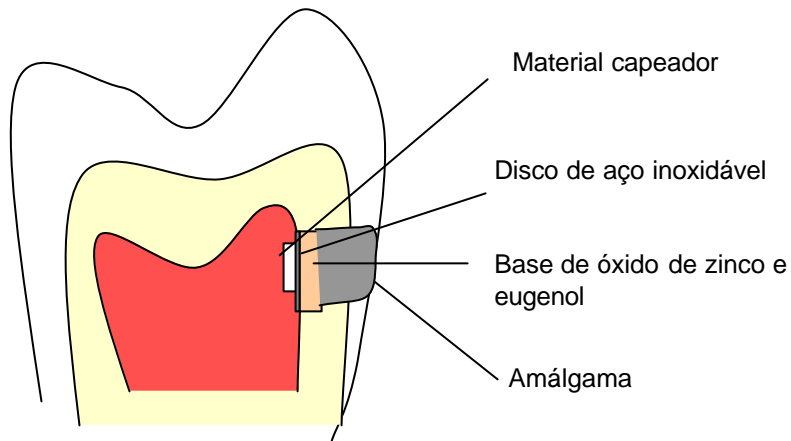


FIGURA 1 - Esquema da cavidade e colocação do material capeador

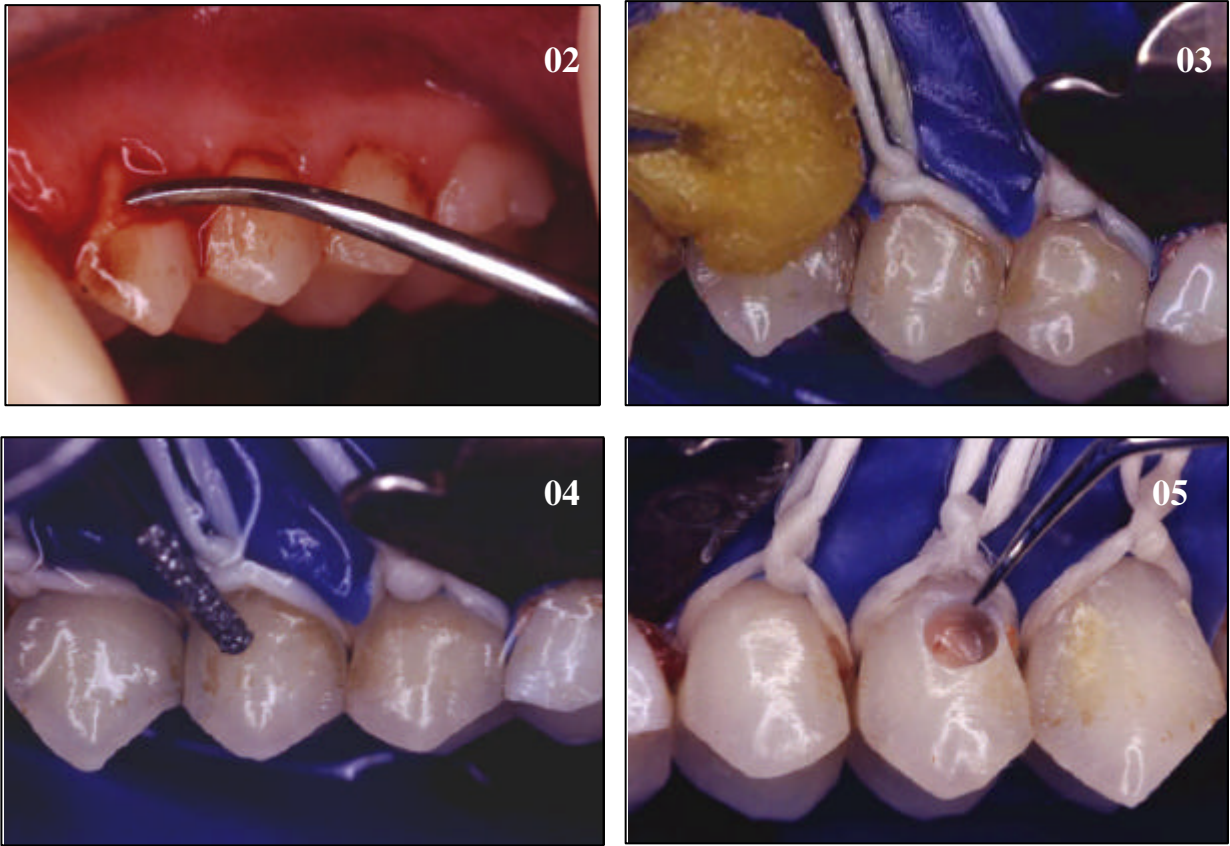


FIGURA 2 - Raspagem dos dentes.

FIGURA 3 -Antissepsia do campo operatório.

FIGURA 4 - Confecção da cavidade cervical com fresa nº 1090.

FIGURA 5 - Exposição pulpar do molar com instrumental manual (sonda nº 1).

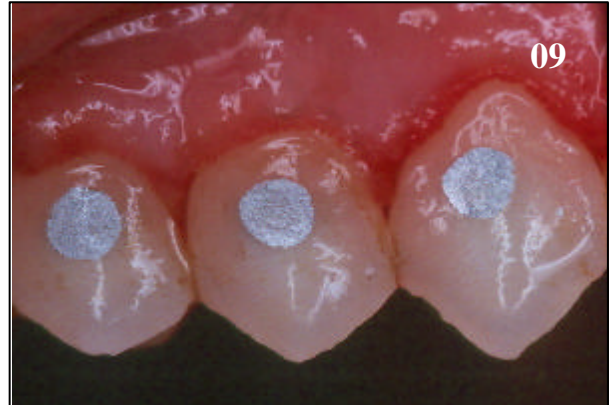
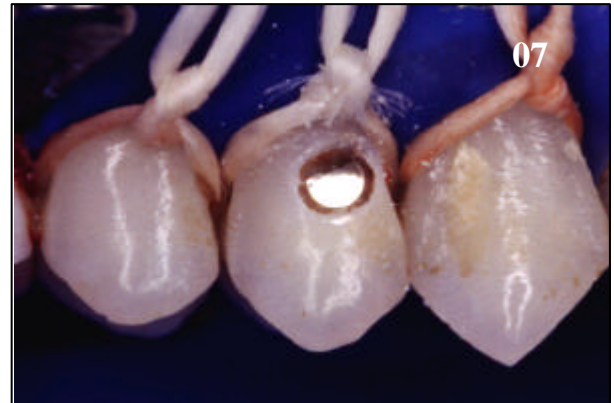
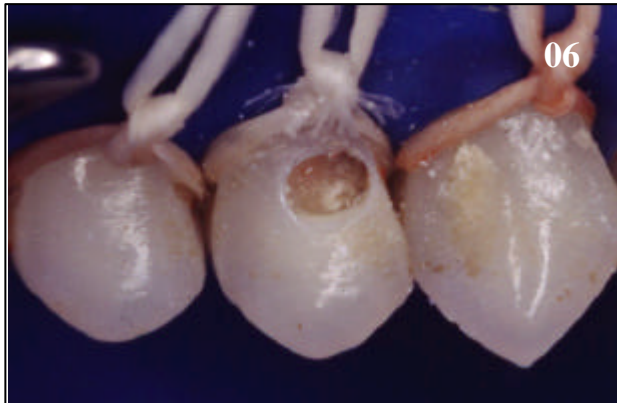


FIGURA 6 - Material capeador aplicado sobre exposição pulpar.

FIGURA 7 - Colocação do disco de aço para proteção do material capeador experimental.

FIGURA 8 - Base cavitária com óxido de zinco e eugenol.

FIGURA 9 - Restauração das cavidades com amálgama.

Após os procedimentos, cada um dos animais recebeu, por via intramuscular, 1 ml de Pentabiótico veterinário\*, 1 ml de Rifocina\*\* 75 mg e 1 ml de Cataflan\*\*\* 75 mg. Foram também administradas, por via oral, 2 gotas de Tylenol\*\*\*\* 2 vezes ao dia durante 2 dias, período em que os animais receberam alimentação líquida ou pastosa.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no Núcleo de Procriação de Macacos-Prego durante 180 dias sob supervisão de pessoal qualificado, e decorrido este período foram anestesiados profundamente e perfundidos via aorta ascendente com solução salina 0.9% (pH=7,0), seguido de solução fixadora inicial (paraformaldeído a 4% em tampão borato de sódio 0,1M, pH=6,0) e solução fixadora final (paraformaldeído 4% em tampão borato de sódio 0,1M, pH=9,5).

### **Processamento histológico**

As maxilas e mandíbulas foram removidas, imediatamente reduzidas e imersas em formol a 10% tamponado, pH 7,2 permanecendo em processo de fixação por 48 horas. Após as primeiras 24 horas, as peças foram recortadas com o auxílio de disco diamantado, de forma a individualizar cada dente, juntamente com o tecido ósseo adjacente. Estes foram devidamente identificados e fixados por mais 24 horas.

Em seguida, as peças foram lavadas em água corrente durante 24 horas, imersas em descalcificador de Morse<sup>62</sup> (1945) com trocas a cada 3 dias até a completa descalcificação, a qual se completou num período aproximado de 4 meses. Então, as

---

\* Fort Dodge Saúde Animal Ltda

\*\* Merrel Lepetit Farmacêutica e Industrial Ltda

\*\*\* Biogalênica Química e Farmacêutica Ltda

\*\*\*\* Cilag Farmacêutica Ltda

peças foram neutralizadas em solução de sulfato de sódio durante 24 horas. Em seguida procedeu-se o processamento para inclusão à vacúo em parafina. Os dentes passaram por processo de desidratação em álcoois crescentes (70%, 90% e absoluto), diafanização em xilol, embebição em parafina, confecção do bloco e microtomia\*, obtendo-se cortes seriados no sentido do longo eixo dos dentes, com 6µm de espessura.

### **Coloração**

Os cortes histológicos montados em lâminas de vidro foram corados com hematoxilina-eosina para análise morfológica, tricrômico de Masson para análise da presença de colágeno tecidual e deposição de matriz dentinária, e pela técnica de Brown & Brenn para evidenciar bactérias.

### **Análise histopatológica**

A análise das lâminas foi realizada com o auxílio de microscópio óptico comum\*\* e os seguintes eventos histopatológicos foram avaliados: resposta celular inflamatória, desorganização tecidual, formação de tecido calcificado (barreira mineralizada) e presença de bactérias coradas. Estes eventos histopatológicos foram graduados como descrito nas Tabelas 2, 3, 4 e 5 adaptadas de (HEBLING et al.<sup>35</sup>, 1999).

---

\* “820” Spencer Microtome (USA)

\*\* Jenamed 2 – Carl Zeiss Jena (Germany)

Tabela 2- Escores atribuídos ao evento **resposta celular inflamatória**

Escore	Caracterização
0	Nenhuma ou poucas células inflamatórias na polpa, abaixo da exposição pulpar, caracterizando tecido normal;
1	Discreta quantidade de células inflamatórias com predomínio de polimorfonucleares neutrófilos (PMN), ou de células mononucleares próximo à área da exposição pulpar;
2	Moderada quantidade de células inflamatórias próximo à área de exposição pulpar
3	Intensa quantidade de células inflamatórias caracterizando abscesso ou denso infiltrado celular envolvendo a polpa coronária.

Tabela 3 – Escores atribuídos ao evento **desorganização tecidual**

Escore	Caracterização
0	Tecido normal;
1	Discreta desorganização do tecido pulpar relacionado com a área de exposição pulpar. Porção central da polpa normal;
2	Moderada desorganização da morfologia do tecido pulpar próximo ao local de exposição;
3	Necrose da polpa coronária e/ou radicular

Tabela 4 – Escores atribuídos ao evento **formação de barreira mineralizada**

Escore	Caracterização
0	Ausência;
1	Discreta deposição de matriz dentinária na região relacionada ao assoalho da cavidade ou adjacente à área da exposição;
2	Moderada deposição de matriz dentinária na região relacionada ao assoalho da cavidade ou adjacente à área da exposição;
3	Intensa deposição de matriz dentinária na área relacionada ao assoalho da cavidade ou formação completa de ponte de dentina na área da exposição.

Tabela 5 – Escores atribuídos ao evento **presença de bactérias coradas**

<i>Bactérias</i>	<i>Caracterização</i>
0	Ausência
1	Presença nas paredes laterais da cavidade;
2	Presença nas paredes laterais e axial da cavidade
3	Presença no interior dos túbulos dentinários e/ou sobre o tecido pulpar.

Com o objetivo de medir o diâmetro das exposições pulpares, foi utilizado microscópio de luz\* com objetiva para aumento de 3.2/10x, o qual estava adaptado a uma câmera de vídeo\*\*, um microcomputador equipado com um software analisador de imagens\*\*\*.

Após a captura das imagens e a inserção das mesmas no programa para análise, foram obtidas quatro medidas lineares do diâmetro da exposição pulpar em 1 corte histológico representativo de cada espécime. O valor médio do diâmetro da exposição pulpar de cada dente foi definido como sendo a média correspondente das quatro medidas obtidas.

### **Tratamento estatístico dos resultados**

Inicialmente foi feita uma comparação entre os diâmetros das exposições pulpares para os diferentes grupos. Como esta variável forneceu dados contínuos em distribuição normal e as variâncias foram homogêneas foi aplicado o teste de análise de variância.

\* Jenamed 2 – Carl Zeiss Jena (Germany)

\*\* Digital Color Camera SCC-131, Samsung, Korea

\*\*\* Image Lab 2000, Softium Informática LTDA-ME

Na análise histomorfológica dos resultados obtidos, foram considerados para cada espécime 4 eventos histológicos (variáveis dependentes), correspondentes às alterações passíveis de serem detectadas nos espécimes tratados em cada um dos 5 grupos de tratamento (variáveis independentes). Foi empregado o teste Kruskal-Wallis para comparação dos grupos e uma vez apontada diferença estatisticamente significativa, o teste de Mann-Whitney U foi empregado para comparação dos grupos dois a dois, com o objetivo de localizar estas diferenças. Todos os testes estatísticos foram aplicados considerando um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05\%$ ).

Hipóteses testadas:

- Quanto ao material capeador:

$H_0$  = O material capeador não exerce influência na resposta do tecido pulpar.

$H_1$  = O material capeador exerce influência na resposta do tecido pulpar.

- Quanto à aplicação do laser:

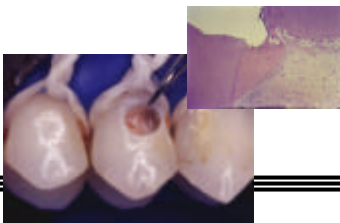
$H_0$  = A aplicação do laser não exerce influência na resposta do tecido pulpar.

$H_1$  = A aplicação do laser exerce influência na resposta do tecido pulpar.

- Quanto a interação material capeador/aplicação do laser:

$H_0$  = A interação material capeador/aplicação do laser não exerce influência na resposta do tecido pulpar.

$H_1$  = A interação material capeador/aplicação do laser exerce influência na resposta do tecido pulpar.



## *5. Resultado*

---

---

---

## 5. Resultado

### 5.1. Descrição dos Eventos Histopatológicos

#### Grupo 1: Hidróxido de cálcio (Grupo Controle)

Tabela 6 – Escores atribuídos aos eventos histopatológicos observados nos espécimes do grupo tratado com hidróxido de cálcio.

Evento Histopatológico	Hidróxido de Cálcio (n=6)			
	Escore			
	0	1	2	3
Resposta celular inflamatória	3	2	1	0
Desorganização tecidual	0	5	1	0
Barreira mineralizada	0	1	2	3
Bactérias coradas	6	0	0	0

Em três espécimes avaliados, o tecido pulpar imediatamente abaixo do sítio de capeamento exibiu resposta inflamatória com nenhuma ou poucas células mononucleares. Discreta resposta inflamatória com predomínio de células mononucleares (linfócitos) foi observada em dois espécimes pertencentes a este grupo experimental. Todavia, o restante do tecido pulpar exibiu características histológicas de normalidade. Para estes 5 espécimes, a desorganização tecidual foi discreta, localizada apenas adjacente à exposição da polpa, sendo que em 3 deles, foi observada espessa área de necrose de contato parcialmente substituída por uma calcificação distrófica (Figuras 10 e 11). Adjacente a esta estrutura houve formação de espessa barreira mineralizada homogênea, a qual isolou o material capeador do contato direto com a polpa. Em 2 destes 3 espécimes, pequenas raspas de dentina permaneceram incorporadas à matriz dentinária sintetizada e depositada por uma camada de células odontoblastóides recém diferenciadas (Figuras 10 e 11). As barreiras mineralizadas se apresentaram contínuas com a dentina reacional que foi depositada por odontoblastos primários presentes nas paredes internas da polpa, ao redor da área do capeamento

pulpar. Em outros 2 espécimes, apesar da presença da área de necrose abaixo do material capeador, houve deposição de menor quantidade de matriz dentinária, o que resultou em barreira mineralizada incompleta e heterogênea (Figuras 12 e 13).

Em apenas 1 dos 6 espécimes avaliados neste grupo, ocorreu moderada reação inflamatória, com intensa proliferação vascular associada à presença de moderada quantidade de células mononucleares e polimorfonucleares neutrófilos (Figuras 14 e 15). Neste caso isolado, a desorganização tecidual também foi moderada e envolveu parte do corno pulpar relacionado com a exposição, sendo que discreta deposição de dentina reacional ocorreu apenas nas paredes internas da polpa adjacente ao material capeador. Para todos os espécimes avaliados, bactérias não foram detectadas sobre a polpa, nem mesmo nas paredes cavitárias (Figuras 16 e 17).

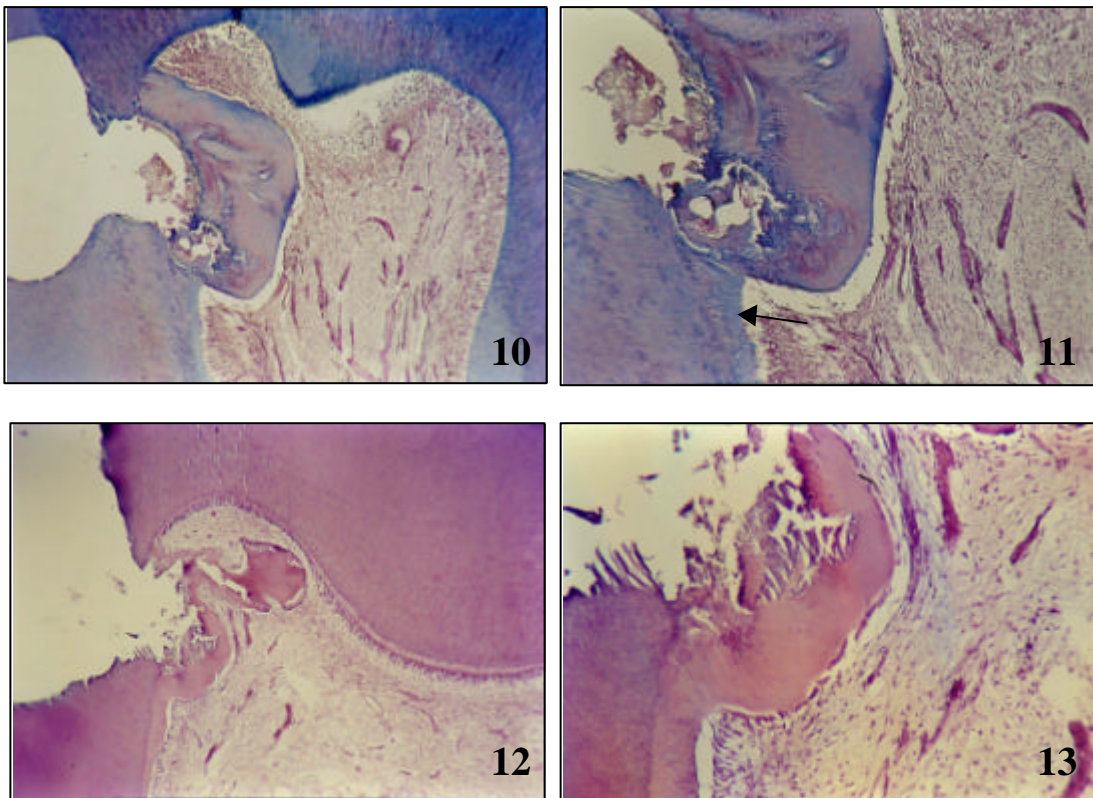


FIGURA 10 - G1 - Presença de necrose de coagulação superficial, seguida de calcificação distrófica e barreira mineralizada homogênea. Tricrômico de Masson – 42X

FIGURA 11 - G1 - Detalhe da figura anterior, mostrando barreira mineralizada com inclusão de raspas de dentina à matriz dentinária sintetizada. Observa-se a dentina reacional depositada por odontoblastos primários em continuidade com a barreira mineralizada (seta). Tricrômico de Masson – 64X

FIGURA 12 - G1 - Presença de necrose de coagulação superficial, barreira mineralizada incompleta e heterogênea. H/E – 42X

FIGURA 13 - G1 - Detalhe da figura anterior, onde pode-se observar barreira mineralizada incompleta e heterogênea com inclusões celulares . H/E – 86X

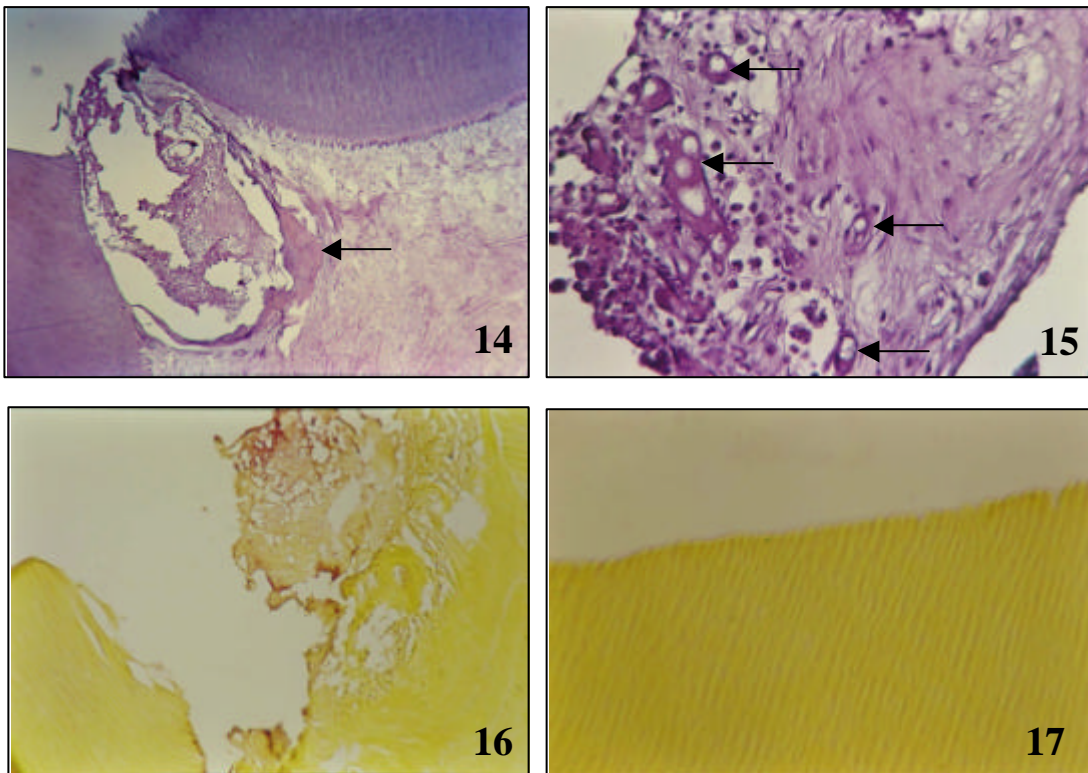


FIGURA 14 - G1 - Necrose de coagulação superficial e barreira mineralizada heterogênea e incompleta na área da exposição pulpar (seta). H/E – 42X

FIGURA 15 - G1 - Tecido conjuntivo pulpar com presença de células mononucleares, polimorfonucleares neutrófilos e macrófagos, associado a intensa proliferação vascular (seta) e moderada desorganização tecidual. H/E – 125X

FIGURA 16 - G1 - Ausência de bactérias no tecido conjuntivo pulpar. Brown & Brenn – 125X

FIGURA 17 - G1 – Parede lateral da cavidade com ausência de bactérias nos túbulos dentinários próximos à área de exposição. Brown & Brenn – 250X

## Grupo 2: Laser + Hidróxido de cálcio

Tabela 7 – Escores atribuídos aos eventos histopatológicos observados nos espécimes do grupo tratado com laser + hidróxido de cálcio.

Evento Histopatológico	Laser + Hidróxido de Cálcio (n=5)			
	Escores			
	0	1	2	3
<b>Resposta celular inflamatória</b>	3	1	1	0
<b>Desorganização tecidual</b>	0	4	1	0
<b>Barreira mineralizada</b>	0	0	2	3
<b>Bactérias coradas</b>	4	1	0	0

Três espécimes apresentaram resposta celular inflamatória ausente ou suave e discreta desorganização do tecido pulpar relacionado com a área de exposição. Nestes casos, a barreira mineralizada mostrou-se completa e homogênea, sendo que em um deles houve intensa deposição de dentina reacional na parede axial cervical, a qual se apresentou justaposta à barreira mineralizada depositada adjacente ao material capeador (Figuras 18-22). Em outro espécime houve intensa deposição de dentina reacional, a qual preencheu por completo o corno pulpar relacionado com a exposição. Raspas de dentina estavam presentes em dois destes espécimes entre a barreira mineralizada e o material capeador.

Ainda neste grupo experimental, um espécime apresentou reação inflamatória e desorganização tecidual discretas, porém, a barreira mineralizada era heterogênea.

Em apenas um espécime a reação inflamatória era moderada, com predomínio de macrófagos e linfócitos, além de polimorfonucleares neutrófilos. Neste caso isolado, houve também desorganização tecidual, a qual era moderada e se estendia por todo o corno pulpar próximo ao local da exposição. Para este espécime, foram evidenciadas bactérias nas paredes laterais da cavidade (Figura 23), sendo que a barreira mineralizada espessa se apresentava descontínua e incompleta com deposição de dentina reacional preenchendo parte do corno pulpar (Figuras 24 e 25).

Para todos os espécimes avaliados, foi possível observar que a porção central do tecido pulpar coronário exibia características histológicas de normalidade.

Um espécime deste grupo foi perdido durante o processamento histológico.

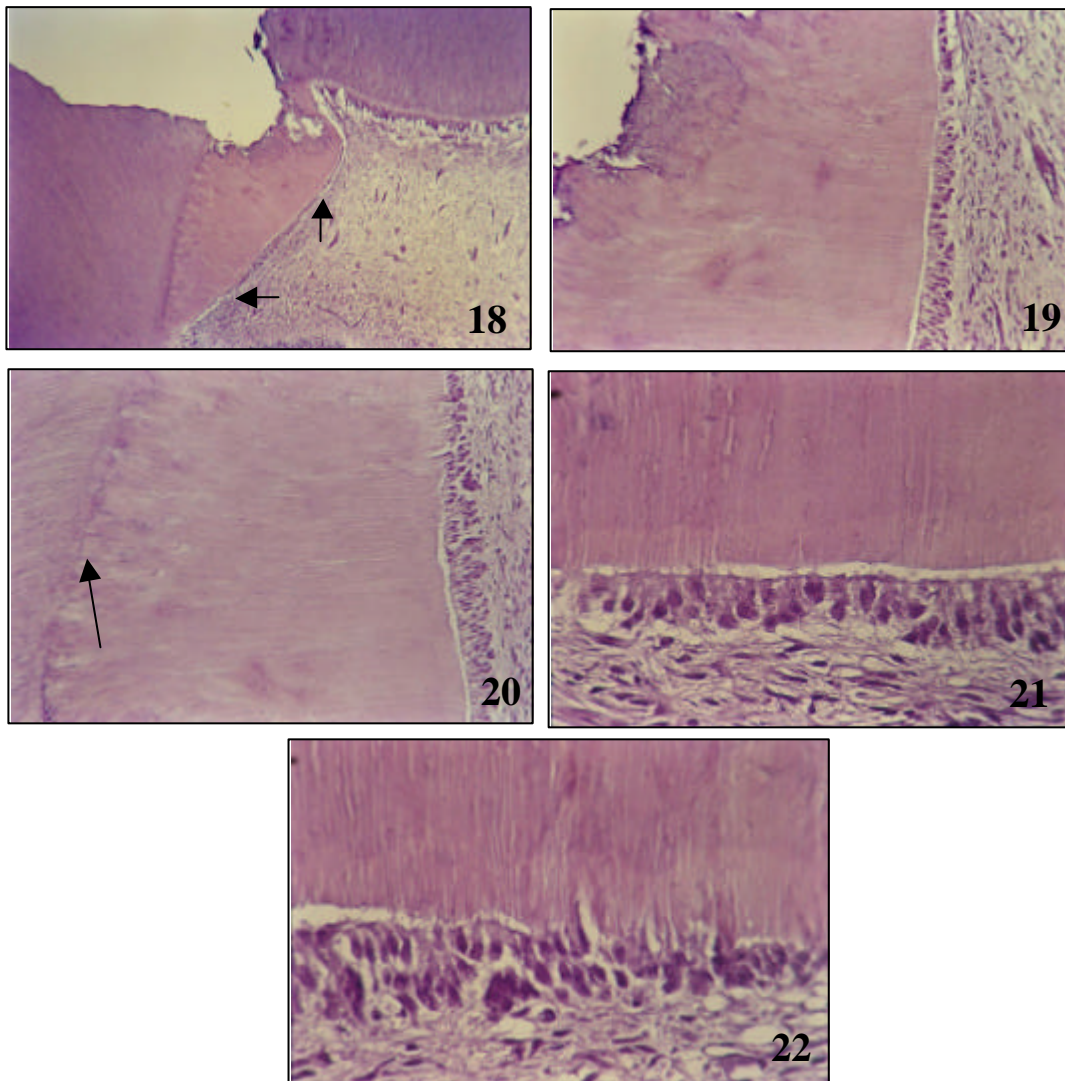


FIGURA 18 - G2 - Área de exposição com formação de barreira mineralizada completa (setas). H/E - 42X

FIGURA 19 - G2 - Detalhe da figura anterior mostrando barreira mineralizada completa e homogênea. H/E - 125X

FIGURA 20 - G2 - Detalhe da linha hipercromática (seta) que limita a união entre dentina primária e o início da deposição de dentina reacional na parede lateral à exposição. H/E - 125X

FIGURA 21 - G2 - Detalhe da Figura 18 relacionado à seta vertical. Observa-se a camada odontoblástica responsável pela deposição de dentina reparadora parcialmente tubular adjacente à exposição pulpar. H/E - 320X

FIGURA 22 - G2 - Detalhe da Figura 18 relacionado à seta horizontal. Observa-se a camada odontoblástica associada à deposição de dentina reacional na parede interna da dentina. Nota-se o maior número de túbulos dentinários quando comparado com a Figura 21. H/E - 320X

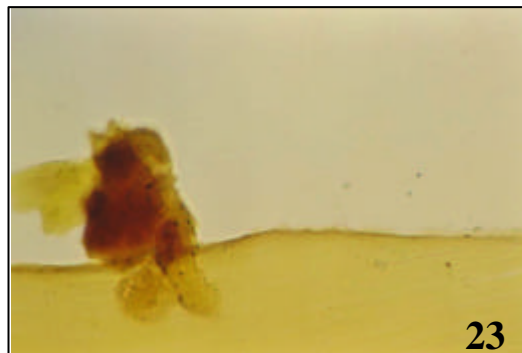


FIGURA 23 - G2 - Parede lateral da cavidade com presença de bactérias. Brown & Brenn – 320X

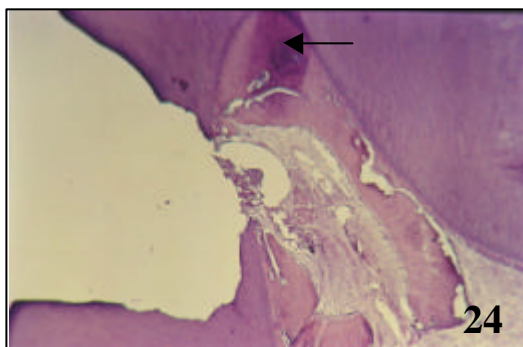


FIGURA 24 - G2 - Necrose de coagulação superficial, barreira mineralizada espessa, porém irregular, descontínua e incompleta com deposição de dentina preenchendo parte do corno pulpar na área de exposição (seta). H/E – 32X

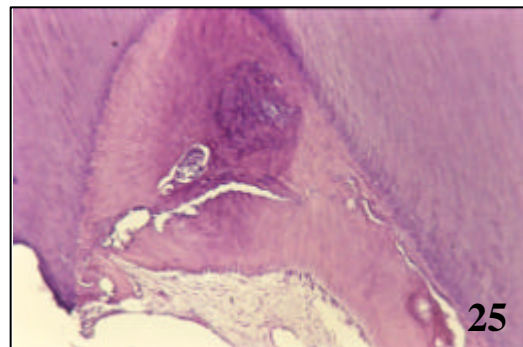


FIGURA 25 - G2 - Detalhe da figura anterior mostrando corno pulpar quase que completamente obliterado por matriz de dentina. H/E – 54X

### Grupo 3: Proteína bioativa

Tabela 8 – Escores atribuídos aos eventos histopatológicos observados nos espécimes do grupo tratado com proteína bioativa.

Evento Histopatológico	Proteína bioativa (n=4)			
	Escores			
	0	1	2	3
<b>Resposta celular inflamatória</b>	0	3	1	0
<b>Desorganização tecidual</b>	0	3	1	0
<b>Barreira mineralizada</b>	3	0	1	0
<b>Bactérias coradas</b>	3	1	0	0

Três espécimes deste grupo apresentaram resposta celular inflamatória discreta com predomínio de células mononucleares próximas à área de exposição. Nestes casos, ocorreu discreta desorganização do tecido pulpar relacionada apenas com a área da exposição, sendo que a porção central da polpa exibia características histológicas de normalidade (Figuras 26-29). Dois destes espécimes apresentaram ligeiro espessamento da pré-dentina nas paredes internas de dentina próxima à exposição pulpar. Adjacente ao material capeador, e próximo a pequenas raspas de dentina que se deslocaram para o interior da polpa, foi observada proliferação fibro-angioblástica e presença de numerosas células alongadas, organizadas ao acaso (Figuras 26-29). Um único espécime apresentou moderada deposição de dentina reacional nas paredes internas da dentina relacionada com o assoalho da cavidade, caracterizando uma tendência à formação de uma barreira mineralizada no local. Todavia, houve manutenção de um tecido conjuntivo fibroso interposto entre ambas as partes, com células inflamatórias de predomínio mononuclear na superfície (Figuras 30 e 31).

Em um espécime isolado, foi observado reação inflamatória moderada associada a notável desorganização tecidual, a qual ocorria imediatamente abaixo do local da exposição. Em meio ao material capeador, foram observados numerosos macrófagos em atividade, além de um grande número de vasos sanguíneos dilatados e congestos

(Figuras 32 a 34). Neste espécime, também foi observado ligeira deposição de dentina reacional na superfície interna da dentina relacionada com a região mais superior do corno pulpar (Figura 32).

Para todos os espécimes avaliados, o tecido conjuntivo central e a polpa radicular apresentavam características histológicas de normalidade.

Em apenas um espécime, bactérias foram evidenciadas na superfície mais externa da parede lateral da cavidade. Neste caso único, o tecido pulpar exibiu moderada reação inflamatória e ausência de formação de barreira mineralizada (Figuras 32-34).

Dois espécimes deste grupo foram perdidos durante o processamento histológico.

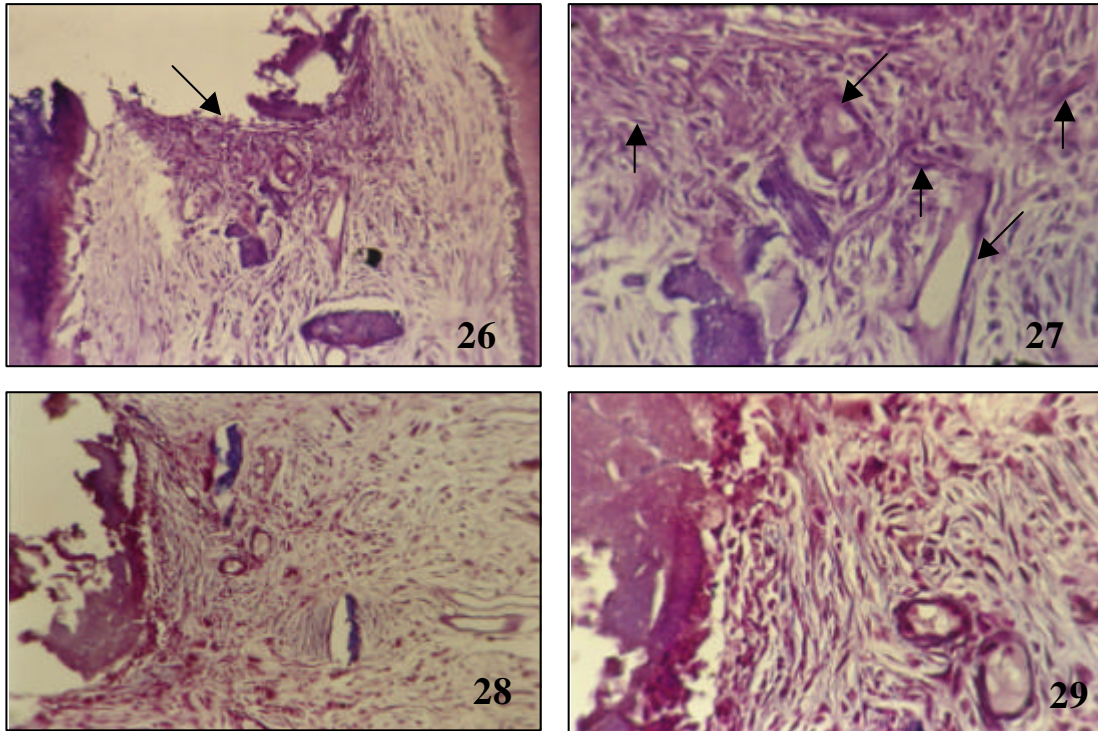


FIGURA 26 - G3 - Tecido conjuntivo pulpar na área da exposição, exibindo proliferação celular e discreta desorganização tecidual (seta). H/E – 125X

FIGURA 27 - G3 – Detalhe da Figura anterior mostrando tecido conjuntivo pulpar com vasos sanguíneos (setas oblíquas) e células alongadas organizadas ao acaso adjacente ao sítio de capeamento (setas verticais). H/E – 320X

FIGURA 28 - G3 - Tecido conjuntivo pulpar na área adjacente à exposição da polpa sem indícios de deposição de barreira mineralizada. Tricrômico de Masson – 125X

FIGURA 29 - G3 - Detalhe da figura anterior, onde pode-se observar tecido conjuntivo pulpar fibroso com células inflamatórias de predomínio mononuclear na superfície. Tricrômico de Masson – 320X

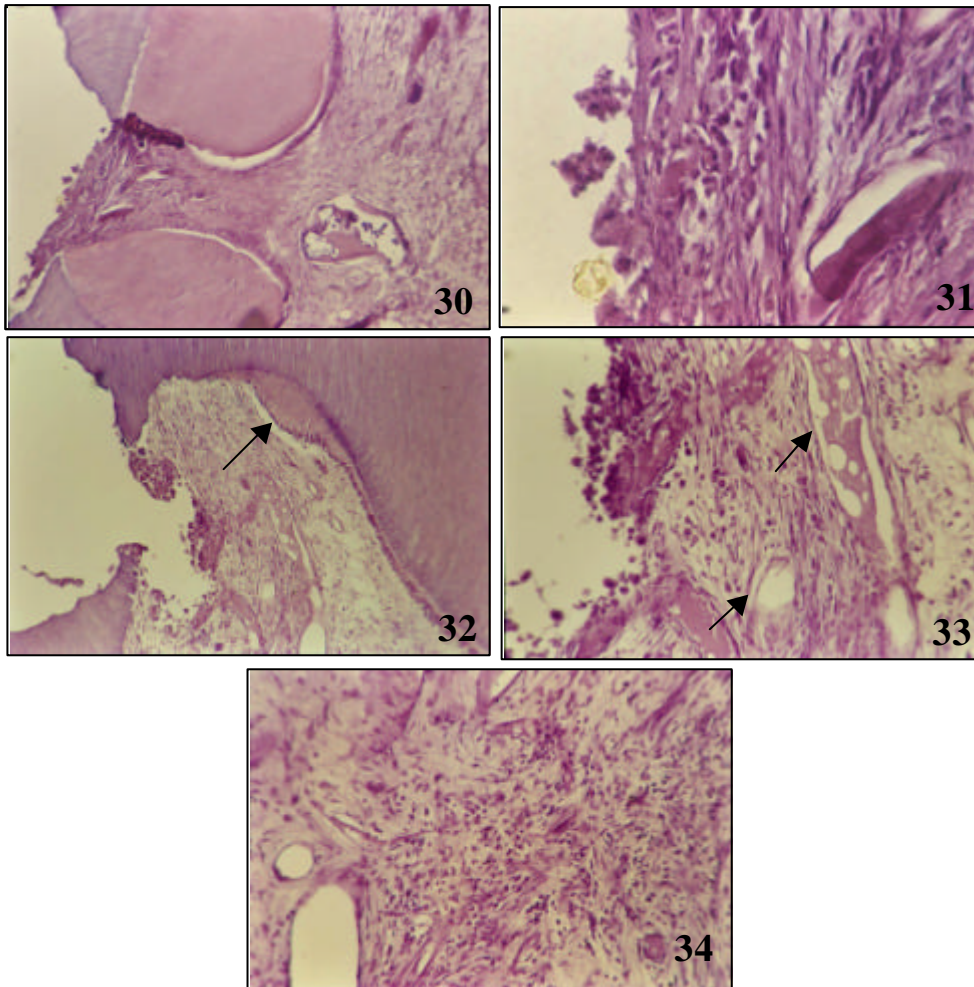


FIGURA 30 - G3 -Área da exposição pulpar exibindo formação de dentina reacional bilateral (setas oblíquas) tendendo ao fechamento da exposição, sendo que entre a matriz dentinária houve persistência de tecido conjuntivo pulpar denso. Observa-se a presença de raspas de dentina (seta vertical) e proliferação fibroangioblástica próximo ao sítio de capeamento.H/E – 64X

FIGURA 31 - G3 - Detalhe da Figura anterior. Tecido conjuntivo pulpar entre as duas áreas de dentina reacional, exibindo moderado processo inflamatório com predomínio de células mononucleares próximas à área de exposição. H/E – 125X

FIGURA 32 - G3 - Área de exposição com ligeira deposição de dentina reacional na superfície interna da dentina relacionada com a região mais superior do corno pulpar (seta oblíqua). H/E – 64X

FIGURA 33 - G3 - Detalhe da figura anterior onde pode-se observar tecido conjuntivo pulpar com presença de numerosos macrófagos (seta horizontal) em atividade e grande número de vasos sanguíneos dilatados e congestionados (setas oblíquas). H/E – 125X

FIGURA 34 - G3 - Tecido conjuntivo mais abaixo da área de exposição exibindo moderada reação inflamatória com predomínio de células mononucleares. H/E – 125X

#### Grupo 4: Laser + Proteína bioativa

Tabela 9 – Escores atribuídos aos eventos histopatológicos observados nos espécimes do grupo tratado com laser + proteína bioativa.

Evento Histopatológico	Laser + Proteína bioativa (n=4)			
	Escores			
	0	1	2	3
<b>Resposta celular inflamatória</b>	0	3	0	1
<b>Desorganização tecidual</b>	0	3	0	1
<b>Barreira mineralizada</b>	3	1	0	0
<b>Bactérias coradas</b>	3	0	0	1

Em três espécimes pertencentes a este grupo experimental, foi observado discreta reação inflamatória e desorganização tecidual discretas, associada a ligeira ou discreta deposição de matriz de dentina reacional na superfície da dentina relacionada com o assoalho da cavidade e adjacente à área de exposição (Figuras 35, 36 e 37). Em um destes espécimes, houve também, deposição de dentina reacional na região mais superior do corno pulpar. Contudo, não houve indícios de formação de barreira mineralizada. Matriz de dentina também foi observada em torno das raspas de dentina deslocadas para o interior da polpa (Figura 35). Nestes três espécimes houve ausência de bactérias coradas nas paredes cavitárias ou sobre o tecido pulpar exposto, sendo que a porção central da polpa coronária apresentava características histológicas de normalidade.

Em apenas um espécime, bactérias foram evidenciadas no interior do tecido pulpar, sendo que neste caso único, foi observado intensa morte celular e degradação da matriz extracelular associado a amplas áreas de abscesso (Figuras 38 e 39).

Dois espécimes deste grupo foram perdidos durante o processamento histológico.

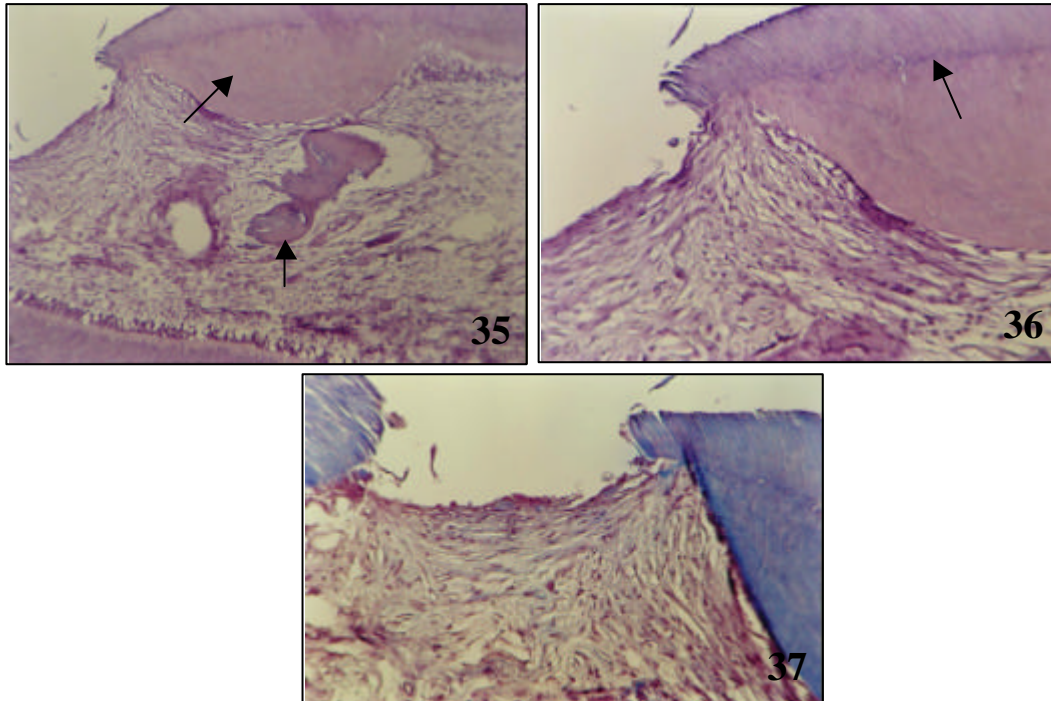


FIGURA 35 - G4 - Deposição de matriz de dentina reacional na superfície da dentina relacionada com o assoalho da cavidade (seta oblíqua) e adjacente à área de exposição. Observa-se a presença de raspa de dentina deslocada para a região central do corno pulpar (seta vertical). H/E – 86X

FIGURA 36 - G4 - Detalhe da linha hiper cromática (seta) caracterizando o limite entre a dentina primária e dentina reacional, adjacente a qual pode-se notar uma camada odontoblástica desorganizada. H/E – 125X

FIGURA 37 - G4 - Tecido conjuntivo adjacente à exposição pulpar sem indícios de formação de barreira mineralizada. Tric rômico de Masson – 125X

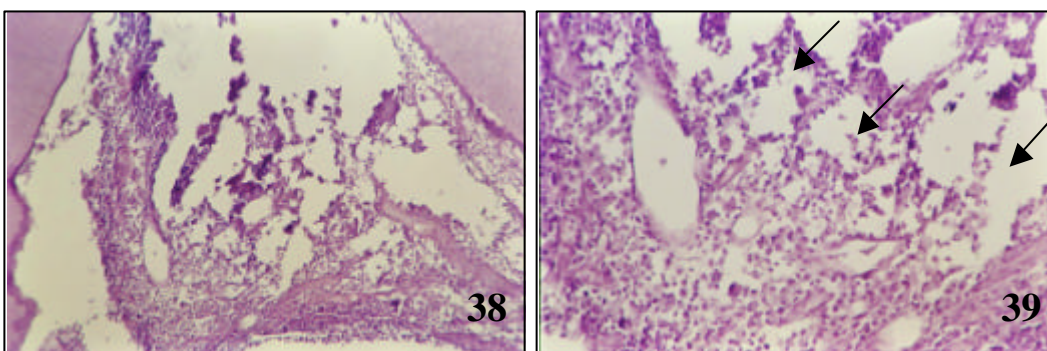


FIGURA 38 - G4 - Tecido conjuntivo com intensa morte celular associado com área de abscesso. H/E – 64X

FIGURA 39 - G4 - Maior aumento da figura anterior exibindo área de abscesso pulpar, caracterizado pela presença de neutrófilos em degeneração e degradação da matriz extracelular (setas). H/E – 125X

### Grupo 5: Laser

Tabela 10 – Escores atribuídos aos eventos histopatológicos observados nos espécimes do grupo tratado com laser.

Evento Histopatológico	Laser (n=4) Escores			
	0	1	2	3
<b>Resposta celular inflamatória</b>	2	2	0	0
<b>Desorganização tecidual</b>	0	4	0	0
<b>Barreira mineralizada</b>	2	1	1	0
<b>Bactérias coradas</b>	3	1	0	0

Para este grupo experimental, a resposta celular inflamatória foi discreta para dois espécimes e ausente para outros dois casos, estando todos eles associados a discreta desorganização tecidual localizada. Três dos espécimes analisados apresentaram quantidade relativamente grande de raspas de dentina adjacente à exposição pulpar (Figura 40), sendo que imediatamente abaixo observou-se intensa proliferação fibroangioblástica e células inflamatórias de predomínio mononuclear (Figura 41). Um destes espécimes apresentava moderada formação de matriz de dentina reacional no assoalho da cavidade e ao redor das raspas de dentina, com tendência ao fechamento da exposição. Neste caso, as raspas se mantiveram em meio à barreira mineralizada heterogênea e incompleta (Figuras 42 e 43). Os demais espécimes apresentavam ausência (dois casos) ou discreta (1 caso) deposição de dentina reacional no assoalho da cavidade. Para todos os espécimes avaliados neste grupo experimental, o tecido conjuntivo pulpar central e radicular apresentavam características histológicas de normalidade (Figura 44).

Apenas um espécime apresentou bactérias localizadas superficialmente nas paredes laterais da cavidade (Figura 45).

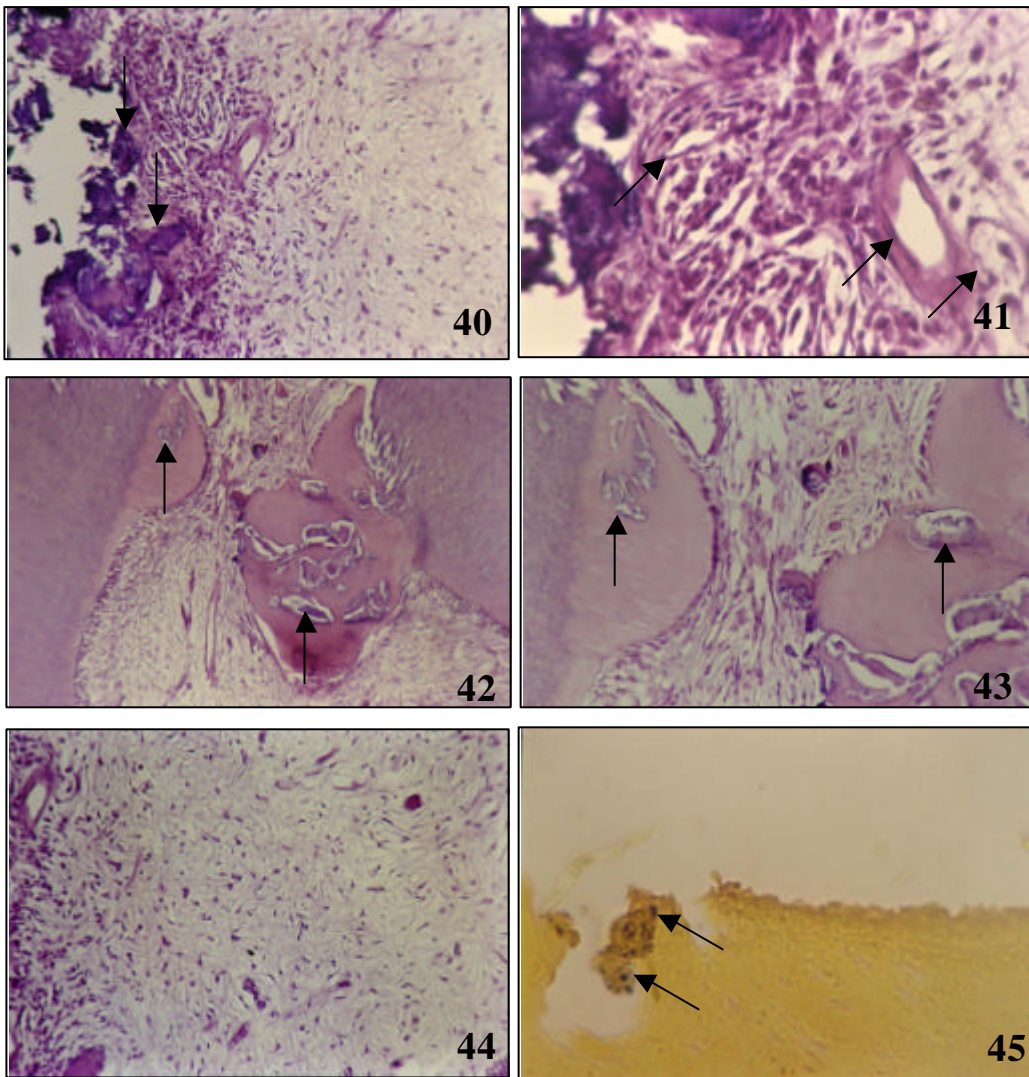


FIGURA 40 - G5 - Tecido conjuntivo pulpar com presença de raspas de dentina abaixo da exposição pulpar (setas). H/E – 125X

FIGURA 41 - G5 - Detalhe da figura anterior mostrando tecido conjuntivo pulpar com intensa proliferação angioblástica (setas) e células inflamatórias de predomínio mononuclear. H/E – 120X

FIGURA 42 - G5 - Presença de raspas de dentina em meio à deposição de matriz dentinária (setas) com tendência ao fechamento da exposição. H/E – 64X

FIGURA 43 - G 5 - Maior aumento da figura anterior mostrando ligeira desorganização do tecido pulpar, sendo que as raspas de dentina permaneceram incluídas em meio a matriz dentinária recém depositada (setas). H/E – 125X

FIGURA 44 - G5 - Região central do tecido conjuntivo pulpar com características histológicas de normalidade. H/E – 125X

FIGURA 45 - G5 - Presença de bactérias (setas) na superfície da parede lateral da cavidade. Brown & Brenn – 320X

**Grupo 6: Controle Hígido**

Este grupo caracterizou-se pela presença de monocamada homogênea de células odontoblásticas dispostas em paliçada. O tecido pulpar subjacente apresentava-se frouxo, rico em células de variada morfologia (Figuras 46 e 47).

Na periferia da polpa foram observados pequenos vasos sanguíneos, enquanto que na porção mais central deste tecido, estas estruturas vasculares apresentavam-se em menor número, porém com amplo calibre (Figuras 46 e 47).

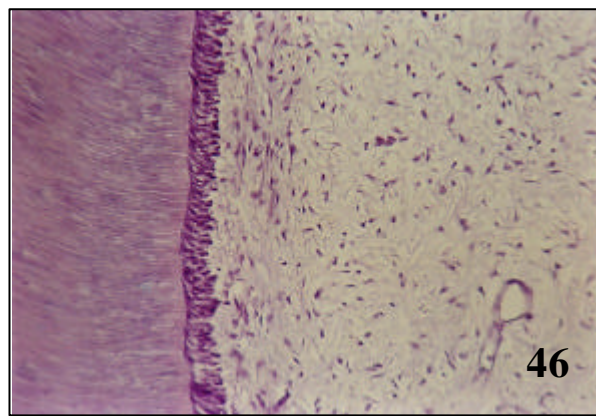


FIGURA 46 - G6 - Complexo dentino-pulpar com características histológicas de normalidade. H/E – 125X

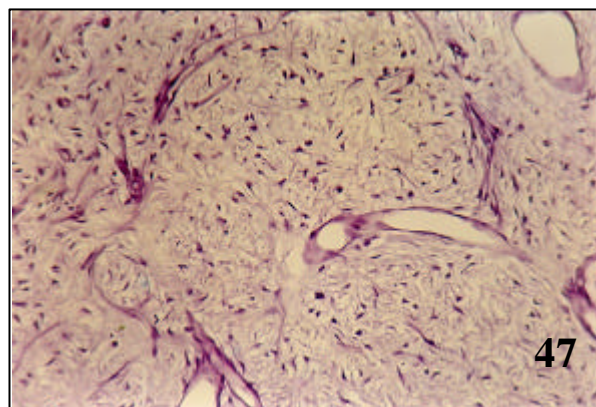
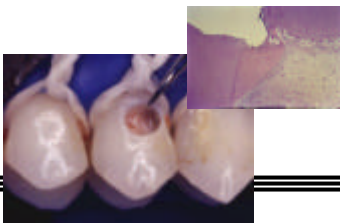


FIGURA 47 - G6 - Região central da polpa celularizada e com grande número de vasos sanguíneos. Observa-se a homogeneidade entre células pulpares e componentes da matriz extracelular. H/E – 125X



## *6. Discussão*

---

---

---

## 6. DISCUSSÃO

Para avaliar a biocompatibilidade de materiais odontológicos, a ANSI/ADA, FDI e ISO têm procurado regularizar e padronizar as diversas metodologias de pesquisa, incluindo para isso a realização de testes iniciais (nível 1), secundários (nível 2) e testes de aplicação clínica (nível 3)<sup>2,43</sup>.

Apesar de grande número de pesquisas em nível 3 ter sido realizado com o uso do hidróxido de cálcio em dentes de animais<sup>4,16,21,23,30,37,39,40,73,77,89,91,92,109,123</sup>, e de seres humanos<sup>15,31,32,35,48,68,107,110,124</sup>, a ação das proteínas bioativas tem sido avaliada apenas em dentes de animais<sup>63,65,66,82,85,101,102,103,104,111,112,113,115,118</sup>. Também, são limitados os conhecimentos e dados científicos que caracterizam a associação das proteínas bioativas e do hidróxido de cálcio com a aplicação do laser de baixa potência<sup>18,81</sup>.

Com base no fato de que o maior número de trabalhos para a avaliação da ação das proteínas bioativas<sup>5,54,55,59,64,67,95,98</sup> e do laser<sup>6,13,50,57,61,71</sup> foram realizados nos níveis 1 e 2, optou-se pelo estudo destes materiais por meio do teste de aplicação clínica (nível 3), em dentes de macacos.

A seleção do animal para a realização de uma pesquisa é complexa, contudo, considerando-se as recomendações de avaliação da biocompatibilidade dos materiais odontológicos para os testes de aplicação clínica, o macaco é tido como o último modelo animal a ser trabalhado, previamente a realização de pesquisas com os materiais experimentais em dentes de seres humanos. No entanto, segundo Costa<sup>14</sup> (2001), os resultados obtidos em estudos com animais não podem ser extrapolados de imediato para as condições clínicas em seres humanos, existindo a necessidade da avaliação e monitoramento das reações provocadas pelos materiais experimentais em suas variadas

aplicações clínicas em seres humanos, antes de determinar a segurança do uso em procedimentos de rotina.

Neste estudo, selecionou-se o macaco como modelo experimental respaldado, também, nos trabalhos de Weiss e Bjorvatn<sup>123</sup> (1970), Tronstad<sup>109</sup> (1974), Cox et al.<sup>17</sup> (1985), Cox e Bergenholtz<sup>16</sup> (1986), Cvek et al.<sup>19</sup> (1987), Heys et al.<sup>37</sup> (1990) e Rutherford et al.<sup>85</sup> (1993) entre outros, que utilizaram este animal para o tratamento pulpar e, o consideraram um modelo bastante conveniente, preenchendo os requisitos básicos necessários a este tipo de estudo.

A idade é um outro fator que deve ser levado em consideração quando do estabelecimento de um protocolo de pesquisa, visto que polpas envelhecidas apresentam menor capacidade funcional, caracterizada pelo baixo potencial de reparação, que é uma consequência da regressão tecidual<sup>105</sup>. Assim, com o objetivo de minimizar interferências relacionadas ao gênero, saúde e idade dos animais, neste estudo foram utilizados macacos do mesmo gênero (machos), com aproximadamente 7 anos de idade (adultos jovens), em ótimo estado de saúde geral, o que proporcionou o trabalho em dentes com câmaras pulpares amplas e com adequada capacidade de reparação.

A avaliação do comportamento de materiais em dentes hígidos, conforme foi utilizado neste estudo, é pertinente, uma vez que o tecido pulpar encontra-se em seu pleno estado de saúde, resultando em uma resposta mais fiel aos materiais e técnicas empregados por não existirem outros fatores agressores<sup>35</sup>.

O isolamento absoluto foi usado para evitar a contaminação do campo operatório, uma vez que o sucesso do capeamento pulpar depende de uma polpa livre de contaminação bacteriana<sup>17,37</sup>. Com o mesmo objetivo, foram feitos a anti-sepsia do campo operatório com álcool iodado 3%, seguida da neutralização com álcool 70% e, todo o instrumental utilizado foi esterilizado em autoclave a 120°C por 20 min<sup>45</sup>.

As cavidades foram preparadas no terço cervical das faces vestibulares dos dentes, em alta rotação, com refrigeração ar/água, baseado nos trabalhos de Pereira et al.<sup>76</sup> (1980), Cox et al.<sup>17</sup> (1985), Cox e Bergenholtz<sup>16</sup> (1986), Turner et al.<sup>110</sup> (1987), Tziafas e Molyvdas<sup>114</sup> (1988), Heys et al.<sup>37</sup> (1990), Smith et al.<sup>101</sup> (1990), Smith et al.<sup>102</sup> (1994), Smith et al.<sup>103</sup> (1995), Rutherford et al.<sup>87</sup> (1995), Tziafas et al.<sup>119</sup> (1995), Tziafas et al.<sup>120</sup> (1998), Hebling et al.<sup>35</sup> (1999), Decup et al.<sup>20</sup> (2000), Nascimento et al.<sup>68</sup> (2000), Costa et al.<sup>15</sup> (2001) e Duarte<sup>22</sup> (2002), que também utilizaram as faces vestibulares devido ao fácil acesso e excelente visibilidade, contribuindo para a adequada realização da técnica, bem como, pelo fato de as faces vestibulares não sofrerem a influência direta das forças mastigatórias, favorecendo a retenção das restaurações, que é um fator importante para o sucesso do tratamento conservador da polpa<sup>9</sup>.

Para minimizar os efeitos do aquecimento decorrente do preparo cavitário e manter a qualidade de corte, as fresas foram substituídas após a confecção de quatro cavidades como descrito anteriormente por Hebling et al.<sup>35</sup> (1999). A exposição mecânica da polpa foi realizada com explorador nº. 1, semelhante aos trabalhos desenvolvidos por Sela et al.<sup>92</sup> (1981), Hirschfeld et al.<sup>38</sup> (1982), Alle et al.<sup>1</sup> (1984), Oliveira et al.<sup>74</sup> (1988), Smith et al.<sup>101</sup> (1990), Smith et al.<sup>103</sup> (1995), Decup et al.<sup>20</sup> (2000), Oliveira<sup>73</sup> (2000) e Crisci<sup>18</sup> (2002), procedimento que resultou em exposições cujos diâmetros não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Esta técnica de exposição mecânica teve, também, por objetivo, evitar a dilaceração do tecido pulpar pela ação de fresas em alta ou baixa rotação, uma vez que a polpa é um tecido altamente organizado e sensível à agressão. Certamente, este fato poderia interferir diretamente no mecanismo de reparação tecidual, visto que, além do material, estaria somado o trauma causado pela técnica.

A seguir, a cavidade foi irrigada com solução salina fisiológica, aspirada e seca com bolinhas de algodão esterilizadas para evitar que as raspas de dentina pudessem se deslocar para o interior da polpa. Contudo, para todos os grupos experimentais avaliados, foi observada a presença de raspas de dentina no interior do tecido pulpar. Este fato induz ao questionamento sobre o tipo de exposição realizada e talvez sugerir a confecção da mesma com fresas, como realizado por Tronstad<sup>109</sup> (1974), Cox e Bergeholtz<sup>16</sup> (1986), Turner et al.<sup>110</sup> (1987), Tziafas e Molyvdas<sup>114</sup> (1988), Heys et al.<sup>37</sup> (1990), Robson e Katz<sup>82</sup> (1992), Yoshida et al.<sup>124</sup> (1996), Jepsen et al.<sup>46</sup> (1997), Hebling et al.<sup>35</sup> (1999), Nascimento et al.<sup>68</sup> (2000) e Costa et al.<sup>15</sup> (2001), os quais observaram estas raspas com menor frequência do que demonstrado na presente pesquisa.

As raspas dentinárias são responsáveis por alterações morfológicas que podem levar o tratamento conservador ao insucesso. Segundo Kalnins e Frisbie<sup>48</sup> (1960), Holland et al.<sup>40</sup> (1979/80), Dias et al.<sup>21</sup> (1988), Giro et al.<sup>30</sup> (1994), estas podem interferir com a resposta tecidual ao medicamento testado porque impedem o íntimo contato deste com o tecido pulpar e criam condições desfavoráveis ao processo de reparo, o que resulta na não formação de barreira mineralizada, ou na sua formação de forma irregular e incompleta. Quando estas raspas de dentina se deslocam em profundidade no tecido pulpar, podem induzir a deposição de matriz dentinária no local e, assim, dificultar a avaliação da verdadeira resposta do tecido pulpar em contato com o agente capeador experimental<sup>40,48</sup>.

Na presente pesquisa, as raspas de dentina presentes nos grupos capeados com hidróxido de cálcio (G1 e G2), pareceram não interferir diretamente na formação da barreira mineralizada uma vez que estas raspas permanecem incorporadas na matriz dentinária que caracterizou a barreira mineralizada. Por outro lado, nos grupos tratados com as proteínas bioativas (G3 e G4) e apenas pelo laser de baixa intensidade (G5),

houve proliferação fibroangioblástica e de células alongadas semelhantes a odontoblastos associados à deposição de matriz de dentina ao redor das raspas de dentina introduzidas no interior do tecido pulpar.

A hemorragia causada pela exposição pulpar foi contida por meio da irrigação com solução fisiológica e, secagem com bolinhas de algodão esterilizadas, para evitar a formação de coágulo espesso, que pode prejudicar a ação dos diferentes materiais capeadores empregados, interferindo negativamente no processo de reparo por impedir o contato direto entre o material e a polpa ou potencializar a reação inflamatória decorrente do ato operatório e da ação irritante do próprio material capeador<sup>15,30,31,35,68,123</sup>.

Os materiais capeadores usados na presente pesquisa foram o hidróxido de cálcio e o *pool* de proteínas bioativas extraídas da dentina de coelhos, associados ou não à aplicação prévia do laser de baixa intensidade.

O processo de reparo de uma polpa exposta, quando capeada com hidróxido de cálcio, obedece a um padrão caracterizado inicialmente pela formação de uma zona superficial de necrose determinada pela alta alcalinidade do hidróxido de cálcio<sup>89</sup>. A necrose superficial provoca uma irritação suave que estimula a defesa, com aumento da vascularização, proliferação e migração de células inflamatórias com a finalidade de controlar o agente irritante<sup>19,21,37,72,88,89</sup>. Em seguida, inicia-se o reparo pulpar, com proliferação e migração de células mesenquimais e endoteliais e formação de uma barreira de colágeno<sup>88,90</sup>.

A elevação no pH, provocada pela liberação de íons hidroxila do hidróxido de cálcio ativa a fosfatase alcalina e, a alta concentração de íons cálcio leva a um aumento da atividade da pirofosfatase cálcio dependente, as quais são enzimas que apresentam papel importante na mineralização<sup>4,24</sup>. Desta forma, em torno de 30 dias após o

capeamento, ocorre a mineralização da matriz de colágeno, formando uma barreira com aspecto ósseo<sup>90</sup>.

Subjacente à barreira de colágeno ocorre a diferenciação de novos odontoblastos e a formação de dentina reparadora com a normalização da função do tecido pulpar<sup>1,15,16,21,30,31,35,39,44,68,72,75,88,90,107</sup>.

A deposição da matriz extracelular de colágeno, bem como, a presença de focos de calcificação dessa matriz, segundo Sela et al.<sup>92</sup> (1981), pode ser resultado de alterações no estado metabólico dos tecidos. Assim, o sucesso do hidróxido de cálcio em estimular a diferenciação de novos odontoblastos e o reparo pulpar pode ser devido a uma resposta às alterações celulares provocadas por este medicamento<sup>49</sup>.

Muitas pesquisas têm avaliado a resposta do tecido pulpar capeado com materiais experimentais em diferentes períodos de tempo. Todavia, a maioria das investigações tem demonstrado adequada reparação pulpar associada à deposição de matriz dentinária e formação de barreira mineralizada em períodos que variam de 15 a 90 dias,<sup>15,17,35,39,40</sup> após o procedimento operatório. Desta maneira, foi selecionado, no presente trabalho o período longo de 180 dias para avaliação dos espécimes, uma vez que, este tempo seria suficiente para permitir a caracterização dos efeitos exercidos pelos materiais experimentais sobre a polpa mecanicamente exposta de animais, de maneira definitiva.

Nesta pesquisa, à semelhança do que tem sido relatado na literatura, as polpas capeadas com hidróxido de cálcio (G1 e G2), mostraram processo de reparação caracterizado pela diferenciação de células odontoblastóides e deposição de barreira mineralizada completa e homogênea na maioria dos espécimes. Em alguns espécimes a barreira mineralizada mostrou-se irregular, mas o tecido pulpar subjacente apresentou-se sempre com características histológicas de normalidade.

Desde que a proliferação de células pulpares, bem como, a diferenciação de novos odontoblastos ocorrem imediatamente abaixo da camada de calcificação distrófica, entre a zona necrótica provocada pelo hidróxido de cálcio e o tecido pulpar subjacente, e, esta exibe reação positiva à fibronectina, Yoshida et al.<sup>124</sup> (1996) sugeriram que a fibronectina pode estar associada à calcificação inicial e ter um papel mediador na diferenciação das células pulpares em novos odontoblastos durante a formação de dentina reparadora.

Segundo Franz et al.<sup>25</sup> (1984), e com base no processo de reparo tecidual após o capeamento pulpar direto com hidróxido de cálcio, a barreira mineralizada formada apresenta duas camadas distintas, uma mais superficial semelhante ao osso, com inclusão de células e, outra mais profunda semelhante à dentina com poucos túbulos, a qual com o passar do tempo, passa a apresentar características de uma dentina tubular normal.

Na presente pesquisa, também foi possível observar que as barreiras de tecido duro que se formaram adjacentes ao hidróxido de cálcio apresentam características histológicas semelhantes às aquelas descritas na literatura, ou seja, duas camadas distintas: 1) uma ampla área externa de calcificação distrófica, seguida de 2) uma área de dentina tubular secretada por células odontoblastóides organizadas em camada.

Optou-se neste trabalho pelo capeamento pulpar com pasta de hidróxido de cálcio em água destilada, pois existem trabalhos mostrando que polpas capeadas com estas pastas apresentam mecanismo de cura semelhante ao cimento de hidróxido de cálcio<sup>40</sup>, entretanto, com uma maior eficiência devido ao maior efeito indutor da formação de barreira mineralizada<sup>1,40</sup>.

Trabalhando em dentes de macacos, Weiss e Bjorvatan<sup>123</sup> (1970) e Tronstad<sup>109</sup> (1974) observaram, através da aplicação do hidróxido de cálcio na forma de pó ou pasta

em água sobre polpas expostas, a formação de uma ampla área de necrose, a qual, segundo os autores, é responsável pela formação da barreira de tecido mineralizado à distância do material capeador. Tronstad<sup>109</sup> (1974) verificou, ainda, que com o cimento de hidróxido de cálcio não houve a formação da camada de necrose superficial espessa e a barreira se formou diretamente na interface material capeador/tecido pulpar.

No presente trabalho de pesquisa, observou-se aos 180 dias, que a pasta de hidróxido de cálcio promoveu intensa deposição de tecido duro caracterizando a formação de barreira mineralizada completa e homogênea, na maioria dos espécimes. Porém, esta se formou à distância do local de exposição, devido à ampla área de necrose de coagulação determinada pela pasta de hidróxido de cálcio, conforme mostrado por Weiss e Bjorvatan<sup>123</sup> (1970), Tronstad<sup>109</sup> (1974) e Giro et al.<sup>30</sup> (1994).

Como o hidróxido de cálcio provoca uma área de necrose de coagulação e, em conseqüência, causa uma perda substancial de células pulpares, têm sido propostas novas modalidades de terapia, utilizando-se para isso, fatores de crescimento (TGFs) e outras moléculas bioativas (BMPs), as quais participam de maneira efetiva no processo de reparação tecidual e indução de síntese e deposição de matriz óssea e dentinária<sup>5,11,20,46,55,63,85,87,95,101,112,116</sup>.

As BMPs óssea e dentinária parecem apresentar uma atividade mitogênica e ter um papel importante na regulação da diferenciação de células pulpares em odontoblastos e na formação de dentina reparadora, podendo ser consideradas uma boa alternativa como agente capeador pulpar<sup>55,64</sup>, visto que induzem a diferenciação das células sem provocar necrose e evitam a perda de células de maneira significativa<sup>102</sup>.

Muitas pesquisas têm relatado que a matriz de dentina contém informações específicas capazes de induzir a atividade celular e o comportamento da matriz

extracelular na polpa dental, estimulando a formação de dentina reacional ou reparadora<sup>65, 82,85,101,103,104,111,112,113,115,118</sup>.

Na presente pesquisa foi usado como capeador direto do tecido pulpar de dentes de macacos, um *pool* de proteínas extraídas da dentina de incisivos de coelhos, solúvel em EDTA e liberadas pela colagenase (Grupo 3 e 4) e, esperava-se obter, de acordo com as propriedades sugeridas na literatura, a formação de barreira mineralizada com características de dentina tubular, obliterando a exposição pulpar. Contudo, houve, no período de 180 dias de pós-operatório, um ligeiro espessamento da pré-dentina nas paredes internas, próximas à exposição, e, um único espécime mostrou moderada deposição de dentina reacional, caracterizando uma tendência à formação de barreira mineralizada no local.

Como não foi observada a formação de barreira dentinária com as proteínas, resultado bastante divergente daquele mostrado pelos trabalhos de pesquisa citados, sugere-se que as proteínas usadas neste estudo poderiam estar com sua atividade reduzida, uma vez que até o momento, não foi determinado o período em que estes componentes da matriz se mantêm ativos, podendo assim sofrer influências da temperatura de conservação. Numa temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  as proteínas permanecem estáveis por um longo período, porém aquelas usadas neste estudo, ficaram em temperatura ambiente por algum tempo durante o transporte e não se pode precisar o quanto a sua atividade foi afetada.

Outros possíveis fatores que podem ter prejudicado a ação das proteínas neste estudo são: 1- uma reação destas com o metal do disco utilizado na tentativa de as isolar do óxido de zinco e eugenol utilizado como base para a restauração final e, 2- o efeito tóxico do eugenol, uma vez que o disco de metal não promove um isolamento perfeito.

Os componentes não colagenosos da matriz orgânica da dentina de incisivos de coelhos foram analisados por Smith e Leaver<sup>99</sup> (1979), os quais verificaram que 4 frações correspondiam a glicoproteínas menos ácidas semelhantes às frações correspondentes da dentina humana, 3 frações eram glicoproteínas aniônicas contendo pouco fósforo e, a fração final, uma proteoglicana consistindo principalmente de condroitin-4-sulfato associado a uma proteína menos ácida do que as frações correspondentes da dentina humana e do osso bovino.

A presença das isoformas TGF- $\beta$  na dentina representa um reservatório de fatores de crescimento na matriz, os quais podem participar no processo de reparo tecidual. As isoformas TGF- $\beta_{1-3}$  estão presentes nas frações de dentina de coelhos solúvel em EDTA e liberada pela colagenase<sup>12</sup>, e, estão presentes também em odontoblastos, células da camada rica em células, fibroblastos e células endoteliais de dentes humanos<sup>98</sup>, apresentando um aumento em dentes cariados. Isto sugere que estas isoformas podem ser importantes no comportamento dos odontoblastos e na modulação da resposta tecidual à injúria, podendo estimular a secreção de matriz extracelular pelos odontoblastos e exercer uma atividade mitogênica sobre as células pulpares, características importantes durante o processo de reparo<sup>95,104,120</sup>.

A organização dos odontoblastos e o início da dentinogênese secundária requerem, segundo Tziafas et al.<sup>118</sup> (1992) e Tziafas et al.<sup>116</sup> (1993), a presença de uma matriz não mineralizada de origem ectomesenquimal, sintetizada por odontoblastos primários ou por células do parênquima pulpar. Contudo, de acordo com as observações *in vivo*, os componentes da matriz solúveis em EDTA e liberados pela colagenase têm se mostrado ativos na diferenciação dos odontoblastos e, as moléculas de matriz podem modular a atividade dos fatores de crescimento na diferenciação de células odontoblastóides<sup>112,119</sup>.

Segundo Tziafas et al.<sup>120</sup> (1998), em dentina de coelhos, aproximadamente metade do TGF- $\beta_1$  está presente na forma ativa e, associado a um peptídeo de latência (LAP), a um betaglicano e ao decorin, o que pode regular a sua disponibilidade biológica e influenciar sua apresentação para os receptores Tipo I e II do TGF- $\beta$ <sup>100</sup>, os quais estão presentes principalmente sobre os odontoblastos<sup>97</sup>.

As observações de Lesot et al.<sup>54</sup> (1986) marcaram uma etapa importante do estudo das proteínas morfogenéticas. Estes autores prepararam sete frações de proteínas não-colagenosas extraídas da dentina de incisivos de coelhos, que foram usadas como substrato para cobrir filtros de milipore, sobre os quais foram cultivados tecidos de germes dentários. As análises histológica e citológica mostraram que a interação das frações 2 e 6 com as células mesenquimais da papila dentária resultou em células alongadas, polarizadas e com alta atividade metabólica.

O comportamento das proteínas na formação de dentina reparadora quando colocadas diretamente sobre o tecido pulpar exposto de animais foi estudado por vários autores<sup>63,82,85,101,102,103,111,112,113,115,118</sup>.

A matriz extracelular não colagenosa da dentina de coelhos demonstrou ser capaz de induzir a dentinogênese reparadora, comprovando sua atividade morfogenética<sup>101,102,113</sup>, a qual pode ser mediada por fatores de crescimento presentes nas preparações de matriz de dentina.

Tziafas et al.<sup>119</sup> (1995) mostraram que a matriz de dentina de incisivos de coelhos insolúvel em EDTA foi capaz de induzir, em polpas de dentes de cães, polarização celular e secreção de matriz tubular em locais afastados da camada de odontoblastos. Estes resultados reforçam os achados de Robson & Katz<sup>82</sup> (1992), os quais sugeriram que as partículas de dentina desmineralizada provêm uma superfície adequada para a adesão de odontoblastos, estimulando a produção de osteodentina

reparadora. Bem como, aqueles de Tziafas<sup>111</sup> (1995), Tziafas<sup>112</sup> (1995), que mostraram que os implantes de matriz de dentina atuam como um substrato insolúvel para imobilização de fatores de crescimento endógenos e, possibilitam a criação de uma interface rica em fibronectina que pode levar células pulpares a expressar o seu fenótipo.

Nakashima<sup>63</sup> (1990) verificaram que a formação de dentina reparadora inicia-se com resposta imune suave mediada por células, seguida por reabsorção das BMPs e proliferação de células mesenquimais fusiformes, aumento da vascularização e diferenciação de osteodentinoblastos com deposição de osteodentina, a qual parece apresentar um papel importante na diferenciação de odontoblastos e formação de dentina tubular. Contudo, Tziafas<sup>111</sup> (1995) ressalta que para a expressão da capacidade dentinogênica específica das células da polpa dental é necessária a ausência de inflamação e quantidade suficiente de oxigênio.

Rutherford et al.<sup>85</sup> (1993) e Jepsen et al.<sup>46</sup> (1997), comparando uma associação de proteína óssea recombinante humana (hOP1) / matriz de colágeno com o hidróxido de cálcio em capeamento pulpar direto, e, Rutherford et al.<sup>87</sup> (1995) em capeamento indireto, verificaram maior quantidade de dentina recém formada nos dentes tratados com a associação e, esta, segundo Rutherford et al.<sup>85</sup> (1993), se mostrou proporcional à quantidade de OP1/matriz de colágeno aplicada. Este achado foi confirmado por Sloan et al.<sup>96</sup> (2000), os quais observaram, *in vitro*, que uma solução com maior concentração de OP-1 estimulou um aumento localizado de secreção de matriz extracelular pelos odontoblastos, mais acentuado do que uma concentração menor, o que é de grande importância no processo reparador e na indução de dentinogênese terciária. Ainda, Decup et al.<sup>20</sup> (2000) concluíram que a proteína osteogênica estimula a diferenciação de

novos odontoblastos mais eficientemente do que qualquer outro material capeador, inclusive o hidróxido de cálcio.

Comparando o grupo tratado com a pasta de hidróxido de cálcio em água com aquele tratado com o *pool* de proteínas não colagenosas extraídas da dentina de coelhos, observou-se, na presente pesquisa, uma diferença estatisticamente significativa, apenas com relação à formação de barreira mineralizada, uma vez que o hidróxido de cálcio promoveu a formação de barreira mineralizada obliterando totalmente a exposição pulpar, na maioria dos espécimes e, com as proteínas não foi observada a formação de barreira de dentina em todos os espécimes avaliados. Como os dentes usados neste experimento eram hígidos e, portanto, apresentavam excelente capacidade de reparação, este resultado só pode ser explicado por uma possível inativação das proteínas, o que poderia ser um fator negativo quando do desenvolvimento de agentes capeadores de polpas expostas que apresentam curto período de atividade.

Baseado no fato de que associado à exposição do tecido pulpar, ocorre uma reação inflamatória com intensidade variável de acordo com o grau de agressão tecidual e, considerando-se que o hidróxido de cálcio<sup>110</sup> e as proteínas bioativas<sup>111</sup>, não são efetivos em promover a formação de barreira mineralizada quando colocados sobre polpas inflamadas, é importante a utilização de um coadjuvante que exerça um efeito antiinflamatório melhorando as condições de resposta tecidual.

Quando da existência de um processo inflamatório específico, tem sido demonstrado que o uso do laser de baixa intensidade parece propiciar um efeito antiinflamatório e antiedematoso, além de exibir um efeito bioestimulante do trofismo celular (reparação celular). Por outro lado, na ausência de inflamação, o processo de cicatrização parece ocorrer de maneira semelhante nos tecidos irradiados e não irradiados<sup>13,58</sup>.

Considerando a importância de se minimizar a resposta inflamatória para uma melhor ação dos medicamentos utilizados como capeadores do tecido pulpar, na presente pesquisa, utilizou-se um laser de baixa intensidade, diodo de arseneto de gálio e alumínio, com comprimento de onda de 685nm, antes do capeamento direto com hidróxido de cálcio em água destilada ou com proteína bioativa extraída da dentina de coelhos.

Muito embora o laser de baixa intensidade tenha sido utilizado desde a década de sessenta para a bioestimulação de tecidos lesados<sup>60</sup>, os estudos com este tipo de laser se intensificaram à partir da década de 80 e, existe na literatura uma grande divergência com relação à potência, densidade e tempo de aplicação do laser, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos nos diferentes trabalhos. Nesta pesquisa utilizou-se o laser de baixa intensidade (InGaAlP), com comprimento de onda de 685 nm, potência de 30mW e tempo de 67 segundos. Semelhante padronização do laser utilizado nesta pesquisa também foi utilizado anteriormente por Ribeiro et al.<sup>81</sup> (2000) que demonstraram uma ação efetiva com relação a intensidade da resposta inflamatória, aos 7 dias. Porém, em período mais longo (30 dias), não observaram nenhum efeito benéfico do laser de baixa intensidade em relação à resposta pulpar.

Quando se propõe a trabalhar com um determinado aparelho, é importante conhecer, o mecanismo pelo qual este atua sobre os tecidos vivos. A luz gerada pelo laser InGaAlP tem as mesmas características descritas para o bioestimulador de baixa intensidade de Hélio-Neôni, o qual promove, em fibroblastos humanos, hiperplasia e hipertrofia do retículo endoplasmático, hipertrofia de mitocôndrias e aumento do número de fibrilas no citoplasma<sup>6,78</sup>, além de mudanças funcionais e nas cargas das superfícies das membranas celulares<sup>50</sup>, promovendo ainda, notável aumento da síntese de colágeno<sup>6</sup>. Assim, o seu efeito potencializador parece ser devido à alteração biofísica

de subsistemas celulares mais do que a uma estimulação da produção de DNA ou à regeneração celular<sup>61</sup>.

O laser diodo de arseneto de gálio-alumínio, de baixa intensidade, quando aplicado sobre a inflamação induzida em ratos, inibe o aumento da permeabilidade vascular e, a inflamação em cerca de 20 a 30%<sup>41</sup>. Aplicado em feridas cutâneas em ratos, acelera o processo de reparo, promovendo aumento da angiogênese e da quantidade e maturação das fibras de colágeno, antecipando a re-epitelização, além de abreviar os processos inflamatórios<sup>57,79</sup>.

O tempo de exposição e a densidade de potência determinam os efeitos da irradiação laser, podendo estimulação e inibição das propriedades das células serem obtidas com o mesmo tipo de laser<sup>8</sup>.

Em alvéolos de ratos, o laser semiconductor de arseneto de gálio, numa densidade de potência de 25mW/cm<sup>2</sup>, aplicado uma vez por dia durante 5 minutos, promoveu uma proliferação mais pronunciada de fibroblastos dos remanescentes do ligamento periodontal do que no grupo não irradiado, bem como, a formação de tecido osteóide trabecular mais avançada<sup>106</sup>.

Utilizado em humanos, numa potência de 30mW, o laser de arseneto de gálio-alumínio promoveu redução significativa no grau de inflamação gengival, redução da dor e melhor reparação tecidual após cirurgias, exercendo, assim, seus efeitos analgésico, antiinflamatório e bioestimulador<sup>93</sup>. In vitro, a irradiação laser de baixa intensidade aumenta a proliferação celular e pode induzir um aumento na síntese de DNA<sup>56,58</sup>.

Hallman et al.<sup>34</sup> (1988) sugeriram que a aceleração do reparo de feridas, quando é utilizado o laser de baixa intensidade, deve ser atribuída a mecanismos como

alteração na síntese de colágeno e no metabolismo celular, uma vez que não observaram alteração na proliferação celular.

Apesar de vários trabalhos terem relatado uma melhora no processo de reparo quando foi utilizado o laser de baixa intensidade, outros verificaram o mesmo padrão de reparo, sem nenhuma diferença morfológica detectada histologicamente<sup>3,70</sup> ou macroscopicamente<sup>42</sup>.

Na presente pesquisa, um mesmo animal teve dentes irradiados e não irradiados pelo laser de baixa intensidade, antes da proteção pulpar com a pasta de hidróxido de cálcio (grupos 1 e 2) ou com as proteínas bioativas (grupos 3 e 4). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas com relação à formação de barreira mineralizada, entre aqueles que foram ou não irradiados com laser. Contudo, quando os dentes foram irradiados, houve uma tendência a síntese e deposição de maior quantidade de matriz dentinária, a qual obliterava parcialmente o corno pulpar. Villa et al.<sup>122</sup> (1988) também observaram uma maior neoformação dentinária em dentes de ratos do lado irradiado do que naqueles não irradiados e, Garcia et al.<sup>28</sup> (1996), mostraram uma evolução mais rápida de feridas cutâneas em ratos do lado irradiado do que do não irradiado, reforçando a hipótese de que o laser apresenta um efeito local.

Por outro lado, Braverman et al.<sup>7</sup> (1989) estudando os efeitos bioestimuladores da radiação laser em reparo de feridas de coelhos, verificaram que os lasers He-Ne e Ga-Al-As, aplicados 11 minutos por dia durante 20 dias, aumentaram a força de tensão durante o reparo e podem ter provocado a liberação de fatores teciduais na circulação sistêmica que aumentaram a força de tensão também do lado oposto.

Hall et al.<sup>33</sup> (1994), contudo, não observaram diferença clínica ou histológica no processo de reparo de feridas irradiadas, não irradiadas e placebo, não podendo

afirmar, com base em seu estudo, se a irradiação com laser de baixa intensidade exerce algum efeito sobre o processo de reparo.

No presente estudo, o laser de baixa intensidade foi usado em emissão contínua, com o aparelho fixo em uma determinada posição por um tempo de 67 segundos. Garcia et al.<sup>29</sup> (1996) utilizando o laser As-Ga, de baixa intensidade, numa potência de 2mW, na forma pontual, em uma aplicação por 3 minutos, verificaram uma aceleração no processo de reparação alveolar com formação mais rápida de tecido de granulação superficial, formação precoce e em maior extensão de tecido ósseo alveolar e fechamento mais rápido das bordas da ferida.

Contudo, Kucerová et al.<sup>51</sup> (2000) observaram que o laser de baixa intensidade apesar de melhorar o processo de reparo de alvéolos dentários em humanos, não tem influência no processo de osseointegração, não tendo encontrado diferença na densidade óssea quando comparados os grupos irradiados e o controle.

Com relação ao processo de reparo do tecido pulpar submetido à ação do laser de baixa intensidade, existem ainda poucos trabalhos na literatura. Ribeiro et al.<sup>81</sup> (2000) avaliaram a resposta do tecido pulpar de dentes decíduos pulpotomizados de cães, após a aplicação do laser semiconductor de arseneto de gálio-alumínio, com comprimento de onda de 790nm, potência de 30mW, durante 60s. Os autores verificaram a ocorrência de melhor resposta pulpar com graus leve e muito leve de inflamação para os dentes irradiados, pelo período de 7 dias. Não houve diferença entre os grupos irradiado e não irradiado, em períodos mais longos de avaliação (30 dias). Estes resultados levaram os autores a concluir que o laser de baixa potência de Ga-As-Al não acrescenta efeito benéfico em relação à resposta pulpar em dentes pulpotomizados. Crisci<sup>18</sup> (2002) avaliou os efeitos sobre polpas expostas de ratos, do laser diodo semiconductor de Ga-Al-As, de baixa intensidade, com comprimento de onda de 785nm,

potência de emissão de 50mW, emissão contínua e densidade de energia de 3J/cm<sup>2</sup> por 2 segundos. Foi verificado que as associações laser imediato + hidróxido de cálcio e laser imediato + hidróxido de cálcio + laser após 24 horas do capeamento, representaram os grupos com os melhores resultados com polpas vivas e inflamação discreta aos 7 dias sendo observado a formação de barreira mineralizada aos 30 dias.

Na presente pesquisa não foi possível observar as reações inflamatórias características do período inicial e nem a possível melhora com o uso do laser, por ser o único período experimental longo (180 dias). Neste período pós-operatório, os grupos nos quais foi aplicada a irradiação laser não apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação à resposta inflamatória e desorganização tecidual, quando comparados com os grupos não irradiados.

Em relação à formação de barreira mineralizada, no grupo experimental no qual o laser atuou como terapia pulpar única, houve discreta deposição de matriz dentinária na região relacionada ao assoalho da cavidade em apenas um espécime. Outro espécime apresentou moderada deposição de dentina reacional, contudo esta estava relacionada com a presença de raspas de dentina. Villa et al.<sup>122</sup> (1988) também observaram neoformação dentinária após uma única aplicação do laser de baixa intensidade por 4 min, e o consideraram eficiente como bioestimulador.

Comparando os grupos G1 (hidróxido de cálcio) e G2 (laser + hidróxido de cálcio), não houve diferença estatisticamente significativa para todos os eventos histológicos avaliados. Porém, no grupo em que foi usado o laser antes da aplicação do hidróxido de cálcio, observou-se uma maior tendência a deposição de dentina reacional no assoalho da cavidade, a qual se apresentou justaposta à barreira mineralizada. Houve também, em dois espécimes deste grupo, uma intensa deposição de dentina reacional, preenchendo parcial ou completamente o corno pulpar relacionado com a exposição.

Os grupos que foram capeados com hidróxido de cálcio, com ou sem a aplicação prévia do laser tiveram um comportamento superior aos demais grupos, sendo que esta diferença foi estatisticamente significante com relação à formação de barreira mineralizada.

Quando se comparou a resposta pulpar dos dentes pertencentes aos grupos G3 (proteína bioativa) e G4 (laser + proteína bioativa), também não houve entre eles, diferença estatisticamente significativa em todos os eventos histológicos avaliados, sendo que os resultados determinados para estes grupos não diferiram daqueles do grupo G5 (laser apenas). Contudo, houve tendência a uma maior deposição de dentina reacional na região do corno pulpar, dos dentes do grupo 4, onde foi feita a associação do laser com a proteína bioativa.

Na literatura, existem trabalhos como os de Longo et al.<sup>57</sup> (1987), Takeda<sup>106</sup> (1988), Silva et al.<sup>93</sup> (1992), Garcia et al.<sup>28</sup> (1996), Garcia et al.<sup>29</sup> (1996), Neiburger<sup>69</sup> (1997), Oliveira et al.<sup>74</sup> (1997), Kucerová et al.<sup>51</sup> (2000), Pretel et al.<sup>79</sup> (2001) e Crisci<sup>18</sup> (2002), os quais, contrariamente à presente pesquisa encontraram evidências de promoção de cura, com melhora e aceleração do processo de reparo, bem como diminuição da reação inflamatória com a utilização do laser. Outros trabalhos, como os de Anneroth et al.<sup>3</sup> (1988), Braverman et al.<sup>7</sup> (1989), Niccoli-Filho et al.<sup>70</sup> (1993), Hall et al.<sup>33</sup> (1994) e Ribeiro et al.<sup>81</sup> (2000) que à semelhança deste, não encontraram nenhuma melhora significativa no processo de reparo quando usado o laser de baixa potência. Portanto, sugere-se a realização de outras pesquisas utilizando o laser associado a materiais capeadores pulpares, com o intuito de estabelecer os parâmetros adequados para o sucesso da sua aplicação como coadjuvante na terapia pulpar.

Além das propriedades do material capeador, existem outros fatores externos que podem influenciar a resposta do tecido pulpar exposto, tais como a toxicidade do material utilizado como base da cavidade e a microinfiltração marginal da restauração.

Com a finalidade de impedir o contato direto do material capeador com o óxido de zinco e eugenol usado para a confecção da base da restauração, e, conseqüentemente, evitar as possíveis alterações pulpares determinadas pela ação irritante deste medicamento<sup>31,129</sup>, foi posicionado, na presente pesquisa, um disco de metal esterilizado, confeccionado a partir de tira matriz de aço inoxidável, entre o agente capeador e o material usado como base. Esta técnica foi utilizado com sucesso por Oliveira<sup>73</sup> (2000) e Crisci<sup>18</sup> (2002).

Segundo Cox et al.<sup>17</sup> (1985), Pereira et al.<sup>75</sup> (2000), Duarte<sup>22</sup> (2002) a presença de bactérias nas paredes cavitárias após o capeamento direto é a principal causa de inflamação pulpar e necrose. De acordo com Heys et al.<sup>37</sup> (1990), a fratura ou perda do material restaurador permite a contaminação bacteriana da polpa resultando em reação inflamatória aguda.

No presente trabalho, a restauração final foi realizada com amálgama de prata, pois este material apresenta boa resistência mecânica e retenção na cavidade por um longo período de tempo. Entretanto, devido à pressão exercida durante a condensação e à grande infiltração marginal que ocorre nas primeiras horas após a restauração, o amálgama não deve ser colocado diretamente sobre o hidróxido de cálcio, pois pode provocar inflamação pulpar associada a falta de formação de ponte de dentina ou à formação de pontes incompletas e irregulares<sup>76</sup>.

Glass e Zander<sup>31</sup> (1949), Pisanti e Sciaky<sup>77</sup> (1964), Holland et al.<sup>40</sup> (1979/1980), Alle et al.<sup>1</sup> (1984) obtiveram bons resultados (formação de barreira de tecido duro completa protegendo polpas vitais não inflamadas), quando as polpas foram capeadas

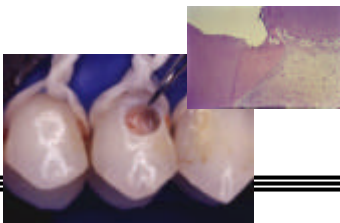
com hidróxido de cálcio e as cavidades seladas com óxido de zinco e eugenol. Browne<sup>9</sup> (1994) mostrou ausência de microrganismos nas paredes de cavidades seladas com este cimento provisório, o que é atribuído às suas propriedades antibacterianas, que podem durar várias semanas após a manipulação. O óxido de zinco e eugenol é um material restaurador provisório adequado, contudo, não suporta de maneira adequada forças mastigatórias por período longo como 180 dias, sendo, desta maneira, indicado como selador apenas em pesquisas com período pós-operatório curto. Na presente pesquisa, a associação da base de óxido de zinco e eugenol com a restauração final da cavidade com amálgama parece ter favorecido a avaliação dos espécimes no período de 180 dias, como inicialmente proposto. Isto porque bactérias foram evidenciadas em poucos espécimes, sendo que o amálgama estava presente em todas as cavidades, em avaliação realizada nas peças obtidas após o sacrifício dos animais.

Bactérias estavam presentes apenas nas paredes laterais da cavidade, na porção correspondente à restauração de amálgama, em 3 espécimes, os quais apresentaram inflamação e desorganização tecidual moderadas, com intensa proliferação vascular associada à presença de notável quantidade de células mononucleares e neutrófilos polimorfonucleares. Nestes casos havia ausência de formação de barreira de tecido mineralizado. Apenas um espécime apresentava bactérias no interior do tecido pulpar, onde foi observado intensa morte celular associado à formação de amplas áreas internas de abscesso.

Hirschfield et al.<sup>38</sup> (1982), Giro et al.<sup>30</sup> (1994), Duarte<sup>22</sup> (2002) também obtiveram sucesso empregando a técnica de confecção de base cavitária com cimento de óxido de zinco e eugenol e restauração com amálgama.

Considerando que polpas expostas, em condições clínicas, apresentam-se inflamadas, devido ao processo de cárie ou a um trauma, ressalta-se a importância da

avaliação de materiais capeadores alternativos biocompatíveis associados ao selamento adequado da cavidade, bem como, a de coadjuvantes como o laser de baixa intensidade, para se obter uma resposta tecidual adequada.



## *7. Conclusão*

---

---

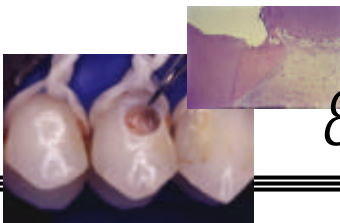
---

## *7. Conclusão*

Dentro das condições experimentais deste trabalho e baseado nos resultados obtidos, chegou-se as seguintes conclusões:

1. O material capeador exerceu influência significativa na resposta do tecido pulpar, tendo o hidróxido de cálcio associado ou não ao laser de baixa intensidade apresentado resultados superiores com relação à deposição de barreira mineralizada quando comparado com os grupos nos quais foram utilizadas as proteínas bioativas.

2. O laser de baixa intensidade aplicado previamente ao capeamento direto não melhorou de forma significativa a resposta do tecido pulpar aos materiais empregados.



## *8. Referências Bibliográficas*

---

---

---

## 8. Referências\*

1. ALLE, N.; COSTA, N. O.; PEREIRA, J.C. Efeito de alguns materiais à base de hidróxido de cálcio em proteções diretas de polpas de cães. **Estomat. Cult.**, Bauru, v. 14, n. ½, p. 21-28, 1984.
2. AMERICAN DENTAL ASSOCIATION. ANSI-ADA document nº 41 for Biological Evaluation of Dental Materials. Chicago: ADA; 1982.
3. ANNEROTH, G. et al. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 26, n. 1, p. 12-17, Feb. 1988.
4. BERMAN, D.S.; MASSLER, M. Experimental pulpomies in rat molars. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v. 37, n. 2, p. 229-242, Apr. 1958.
5. BESSHO, K. et al. Human dentin-matrix-derived bone morphogenetic protein. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v. 70, n. 3, p. 171-175, March. 1991.
6. BOSATRA, M. et al. In vitro fibroblast and dermis fibroblast activation by laser irradiation at low energy. **Dermatologica**, New York, v. 168, n. 4, p. 157-162, 1984.
7. BRAVERMAN, B. et al. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. **Laser Surg. Med.**, New York, v. 9, n. 1, p. 50-58, 1989.

---

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002. 24 p.

8. BREUGEL, H.H.F.I.V.; BÄR, P.R.D. Power density and exposure time of He-Ne laser irradiation are more important than total energy dose in photobiomodulation of human fibroblasts in vitro. **Laser Surg. Med.**, New York, v. 12, n. 5, p. 528-537, 1992.
9. BROWNE, R.M. Animal tests for biocompatibility of dental materials – relevance, advantages and limitations. **J. Dent.**, Guildford, v. 22, suppl.2, p. S21-S24, Aug. 1994.
10. BRUGNERA Jr., A.; VILLA, R. G.; GENOVESE, W. J. **Laser na odontologia**. São Paulo: Pancast Editora, 1991. 61p.
11. BUTLER, W.T.; MIKULSHI, A.; URIST, M.R. Noncollagenous proteins of a rat dentin matrix possessing bone morphogenetic activity. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v. 56, n. 3, p. 228-232, Mar. 1977.
12. CASSIDY et al. Comparative analysis of transforming growth factor- $\beta$  isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 219-223, Mar. 1997.
13. CHOMETTE, G. et al. Effet du soft-laser sur le tissu conjonctif gingival II – Effet sur la cicatrisation. Etude en microscopie optique, histoenzymologie et microscopie électronique. **J. Biol. Buccale**, Paris, v. 15, n. 1, p. 51-57, Mar. 1987.
14. COSTA, C.A.S.C. Testes de biocompatibilidade de materiais odontológicos. In: ESTRELA, C. **Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. cap.10, p. 161-194.
15. COSTA, C.A.S.C. et al. Response of human pulps capped with a self-etching adhesive system. **Dent. Mater.**, Copenhagen, v. 17, p. 230-240, 2001.

16. COX, C.F.; BERGENHOLTZ, G. Healing sequence in capped inflamed dental pulps of Rhesus monkeys (*Macaca mulata*). **Int. Endod. J.**, Guildford, v. 19, n. 3, p. 113-120, May, 1986.
17. COX, C.F. et al. Pulp capping of dental pulp mechanically exposed to oral microflora: a 1-2 year observation of wound healing in the monkey. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 14, n. 2, p. 156-168, Feb. 1985.
18. CRISCI, F.S. **Reação histológica de exposições pulpares em dentes de ratos à aplicação do laser de baixa intensidade somente ou em associação do capeamento com hidróxido de cálcio.** 2002. 192f. Dissertação (Mestrado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.
19. CVEK, M. et al. Hard tissue barrier formation in pulpotomized monkey teeth capped with cyanoacrylate or calcium hydroxide for 10 and 60 minutes. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v. 66, n. 6, p. 1166-1174, June 1987.
20. DECUP, F. et al. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. **Clin. Oral Invest.**, Berlin, v. 4, n. 2, p. 110-119, June 2000.
21. DIAS, D.B. et al. Efeito de materiais à base de hidróxido de cálcio, em polpas de dentes de cães expostas experimentalmente. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 17, n. ½, p. 27-42, 1988.
22. DUARTE, P.C.T. **Análise histopatológica comparativa da resposta do tecido conjuntivo pulpar de dentes de cães submetidos à pulpotomia e capeados com MTA ou hidróxido de cálcio.** 2002. 182f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

23. EDA, S. Histochemical analysis on the mechanism of dentin formation in dog's pulp. **Bull. Tokyo Dent. Coll.**, Tokyo, v. 2, p. 339-368, 1961.
24. FOREMAN, P.C.; BARNES, I.E. A review of calcium hydroxide. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 283-297, Nov. 1990.
25. FRANZ, F.E.; HOLZ, J.; BAUME, L.J. Ultrastructure (SEM) of dentine bridging in the human dental pulp. **J. Biol. Buccale**, Paris, v. 12, n. 3, p. 239-246, Sept. 1984.
26. FREITAS, A. C et al. Assessment of anti-inflammatory effect of 830 nm laser light using C-reactive protein levels. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 187-190, 2001.
27. GARCIA, V.G.; MILANEZI, L.A. Avaliação biométrica de feridas cutâneas provocadas na região dorsal de ratos e submetidas ao tratamento com raio laser com diferentes frequências e potências. **Fac. Odontol. Lins**, Lins, v. 8, n. 1, p. 36-42, jan./jun. 1995.
28. GARCIA, V.G.; OKAMOTO, T.; KINA, J.R. Reparação de feridas cutâneas submetidas ao tratamento com raio laser. Estudo histológico em ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 37-48, jan./jun. 1996.
29. GARCIA, V.G. et al. Reparação de feridas de extração dental submetidas ao tratamento com raio laser. Estudo histológico em ratos. **Fac. Odontol. Lins**, Lins, v. 9, n. 1, p. 33-42, jan./jun. 1996.
30. GIRO, E.M.A.; IOST, H.I.; LIA, R.C.C. Análise histopatológica comparativa em polpa de dentes de cães, após pulpotomia e utilização de pastas a base de hidróxido de cálcio em diferentes veículos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 23, n.2, p. 191-201, jul./dez. 1994.

31. GLASS, R.L.; ZANDER, H.A. Pulp healing. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v.28, n. 2, p. 97-107, Apr. 1949.
32. GONZALEZ VONO et al. Reação da polpa de pré-molares humanos sob materiais à base de hidróxido de cálcio (MPC e Hypo-cal). Estudo histológico. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 13, n. ½, p. 51-60, 1984.
33. HALL, G. et al. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. **Swed. Dent. J.**, Stockholm, v. 18, n. 1-2, p. 29-34, 1994.
34. HALLMAN, H.O. et al. Does low-energy helium-neon laser irradiation alter “in vitro” replication of human fibroblasts ? **Laser Surg. Med.**, New York, v. 8, n. 2, p. 125-129, 1988.
35. HEBLING, J.; GIRO, E.M.A.; COSTA, C.A.S.C. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. **J. Endod.**, Baltimore, v. 25, n. 10, p. 676-682, Oct. 1999.
36. HERMAN, B.W. Die biologische wurzelbehandlung. *Zahnarztl. Rundsch*, v. 44, p. 1509-17, 1935 apud LEAL, J.M. Materiais obturadores de canais radiculares. In: LEONARDO, M.R., LEAL, J.M. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. 2.ed. São Paulo: Panamericana, 1991. cap. 23, p.348-404.
37. HEYS, D.R. et al. Healing of primate dental pulps capped with teflon. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 69, n. 2, p. 227-237, Feb. 1990.
38. HIRSCHFELD, Z. et al. Primary mineralization of dentin in rats after pulp capping with calcium hydroxide. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 11, n. 6, p. 426-433, Dec. 1982.
39. HOLLAND, R. Histochemical response of amputated pulps to calcium hydroxide. **Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.**, São Paulo, v. 4, n. 1-2, p. 83-95, Jan./Abr. 1971.

40. HOLLAND, R. et al. Healing process of dog's dental pulp after pulpotomy and protection with calcium hydroxide or Dycal. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 8/9, p. 67-73, 1979/1980.
41. HONMURA, A et al. Therapeutic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on experimentally induced inflammation in rats. **Laser Surg. Med.**, New York, v. 12, n. 4, p. 441-449, 1992.
42. IN DE BRAEKT, M. M. et al. Effect of low level laser therapy on wound healing after palatal surgery in beagle dogs. **Laser Surg. Med.**, New York, v. 70, n. 11, p. 1462-1470, Nov. 1991.
43. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 109993-5. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. London, 1994.
44. ISAIA, V.; CATANZARO-GUIMARÃES, S.A. Formação de dentina cicatricial em polpas sob proteção direta com hidróxido de cálcio, formagen e óxido de zinco e eugenol. **Estomat. & Cult.**, Bauru, v. 9, n. 2, p. 265-270, jul./dez. 1975.
45. ITO, I.Y., SOUZA-GUGELMIN, M.C.M., LIMA, S.N.M. Assepsia e anti-sepsia em endodontia. Biosegurança: controle de infecção. In: LEONARDO, M.R., LEAL, J.M. **Endodontia: tratamento de canais radiculares**. 3.ed. São Paulo: Panamericana, 1998. cap.12, p. 261-297.
46. JEPSEN, S. et al. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. **J. Endod.**, Baltimore, v. 23, n.6, p. 378-382, June 1997.
47. JONES, I.L.; LEAVER, A.G. Studies on the minor components of the organic matrix of human dentine. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 19, n. 5. p. 371-380, May 1974.

48. KALNINS, V.; FRISBIE, H.E. The effect of dentine fragments on the healing of the exposed pulp. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 96-103, July 1960.
49. KARDOS, T.B. et al. Odontoblast differentiation: a response to environmental calcium? **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v.14, n.3, p. 105-11, June 1998.
50. KUBASOVA, T. et al. Biological effect of He-Ne laser: investigations on functional and micromorphological alterations of cell membranes, in vitro. **Laser Surg. Med.**, New York, v. 4, n. 4, p. 381-388, 1984.
51. KUCEROVÁ, H. et al. Low-level laser therapy after molar extraction. **J. Clin. Laser Med Surg.**, New York, v. 18, n. 6, p. 309-315, Dec. 2000.
52. LEAVER, A.G.; PRICE, R.; SMITH, A.J. The insoluble fraction isolated after digestion of desmineralized human dentine matrix with collagenase. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 511-513, 1978.
53. LEAVER, A.G. et al. Components of the organic matrices of bone and dentine isolated only after digestion with collagenase. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 211-216, Mar. 1975.
54. LESOT, H. et al. Cell-matrix interactions: influence of noncollagenous proteins from dentin on cultured dental cells. **J. Embryol. Exp. Morph.**, Cambridge, v. 96, p. 195-209, July 1986.
55. LIANJIA, Y.; YUHAO, G.; WHITE, F.H. Bovine bone morphogenetic protein-induced dentinogenesis. **Clin. Orthop. Related Research**, Philadelphia, v. 295, p. 305-312, Oct. 1993.
56. LOEVSCHELL, H.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. Effect of low-level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. **Laser Surg. Med.**, New York, v. 14, n. 4, p. 347-354, 1994.

57. LONGO, L. et al. Effect of diodes-laser silver arsenide-aluminium (Ga-Al-As) 904 nm on healing of experimental wounds. **Laser Surg. Med.**, New York, v. 7, n. 5, p. 444-447, 1987.
58. LOPES, L. A. **Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana, tratados com laser de baixa potência.** 1999. Dissertação (Mestre em Ciências) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 1999.
59. MARTIM, A. et al. Effects of aFGF, bFGF, TGF  $\beta$ 1 and IGF-I on odontoblast differentiation in vitro. **Eur. J. Oral Sci.**, Cambridge, v. 106, suppl. 1, p. 117-121, 1998.
60. MESTER, E. A laser sugar alkamazaea a gyogyaezatban. **Orv Hetilap**, v. 107, p. 1012, 1966 apud LOPES, L. A. **Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência.** 1999. Dissertação (Mestre em Ciências) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 1999.
61. MEYERS, A.D.; JOYCE, J.; COHEN, J.J. Effects of low-watt helium neon laser radiation on human lymphocyte cultures. **Laser Surg. Med.**, New York, v. 6, n. 6, p. 540-542, 1987.
62. MORSE, A. Formic acid-sodium citrate descalcification and butyl alcohol desydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v.24, p. 143-153, 1945.
63. NAKASHIMA, M. The induction of reparative dentine in the amputated pulp of the dog by bone morphogenetic protein. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 493-497, 1990.

64. NAKASHIMA, M. Mitogenic and dentin-inductive effects of crude bone morphogenetic protein from bone and dentin in primary adult pulp cell culture. **Oral Surg. Oral Med Oral Pathol.**, St. Louis, v. 73, n. 4, p. 484-489, Apr. 1992.
65. NAKASHIMA, M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v. 73, n.9, p. 1515-1522, Sept. 1994.
66. NAKASHIMA, M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 39, n. 12, p. 1085-1089, Dec. 1994.
67. NAKASHIMA, M. et al. Regulatory role of transforming growth factor- $\beta$ , bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. **Dev. Biol.**, New York, v. 162, n. 1, p. 18-28, Mar. 1994.
68. NASCIMENTO, A.B.L. et al. Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v. 13, n.1, p. 28-34, Feb. 2000.
69. NEIBURGER, E.J. Accelerated healing of gingival incisions by the helium-neon diode laser: a preliminary study. **Gen. Dent.**, Chicago, v. 45, n. 2, p. 166-170, Mar/Apr. 1997.
70. NICCOLI-FILHO et al. Efeitos da radiação laser do tipo hélio-neônio verde (550 nm) no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 213-221, jul./dez. 1993.

71. OHTA, A.; ABERGEL, R.P.; UITTO, J. Laser modulation of human immune system: inhibition of lymphocyte proliferation by a gallium-arsenide laser at low energy. **Laser Surg. Med.**, New York, v. 7, n. 2, p. 199-201, 1987.
72. OLIVEIRA, D.C.; LIA, R.C.C., BENATTI NETO, C. Efeito de pastas à base de hidróxido de cálcio sobre a polpa de molares de ratos, exposta experimentalmente. Estudo histológico comparativo. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 17, n. ½, p. 43-61, 1988.
73. OLIVEIRA, M.F. **Resposta do tecido pulpar à aplicação da pasta à base de hidróxido de cálcio precedida do emprego de curativo de corticosteróide ou corticosteróide/antibiótico. Estudo histológico em dentes de ratos.** 2000. 158f. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria) Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.
74. OLIVEIRA, J.A.G.P. et al. Ação da irradiação laser (arsênio-gálio) sobre a cronologia do processo de reparo em feridas cutâneas. Estudo histológico em ratos. **Robrac**, Goiânia, v. 6, n. 21, p.28-31, mar. 1997.
75. PEREIRA, J.C.; SEGAL, A.D.; COSTA, C.A.S.C. Human pulpal response to direct pulp capping with an adhesive system. **Am. J. Dent.**, San Antonio, v. 13, n. 3, p. 139-147, June 2000.
76. PEREIRA, J.C. et al. Effect of calcium hydroxide in powder or in paste form on pulp-capping procedures: histopathologic and radiographic analysis in dog's pulp. **Oral Surg.**, St Louis, v. 50, n. 2, p. 176-186, Aug. 1980.
77. PISANTI, S.; SCIAKY, I. Origin of calcium in the repair wall after pulp exposure in the dog. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v. 43, n. 5, p. 641-644, Oct. 1964.

78. POURREAU-SCHNEIDER, N. et al. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. **Quintessence Int.**, Illinois, v. 20, n. 12, p. 887-893, 1989.
79. PRETEL, H. et al. Avaliação da reparação tecidual utilizando laser e pomada à base de éster do ácido recinoléico. **Pesq. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 15, supl., p. 68, 2001. Resumo 1370
80. RANLY, D.M.; GARCIA-GODOY. Current and potencial pulp therapies for primary and young permanent teeth. **J. Dent.**, Guildford, v. 28, n. 3, p. 153-161, Mar. 2000.
81. RIBEIRO, R.A. et al. Pulpal tissue response of pulpotomized primary teeth irradiated or not by a low power gallium aluminium arsenide semiconductor laser: a preliminary study in dogs. **Pediatr. Dent.**, Illinois, v. 10, n. 1, p. 23-28, 2000.
82. ROBSON, W.C.; KATZ, R.W. Preliminary studies on pulp capping with demineralized dentin. **Proc. Finn. Dent. Soc.**, Helsinki, v. 88, suppl 1, p. 279-282, 1992.
83. RUTHERFORD, R.B. BMP-7 gene transfer to inflamed ferret dental pulps. **Eur. J. Oral Sci**, Cambridge, v. 109, n. 6, p. 422-424, Dec. 2001.
84. RUTHERFORD, R.B.; GU, K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein-7. **Eur. J. Oral Sci.**, Cambridge, v. 108, n. 3, p. 202-206, June 2000.
85. RUTHERFORD, R.B. et al. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 571-576, July 1993.

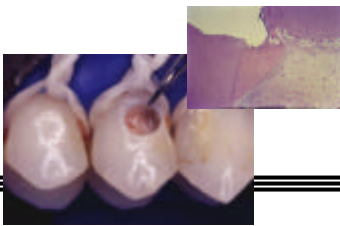
86. RUTHERFORD, R. et al. The time-course of the induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 39, n. 10, p. 833-838, Oct. 1994.
87. RUTHERFORD, B. et al. Transdental stimulation of reparative dentine formation by osteogenic protein-1 in monkeys. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 681-683, 1995.
88. SCHRÖDER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v.64, sp. iss., p. 541-548, Apr. 1985.
89. SCHRÖDER, U.; GRANATH, L.E. Early reaction of intact human teeth to calcium hydroxide following experimental pulpotomy and its significance to the development of hard tissue barrier. **Odontol. Revy**, Lund, v. 22, n.4, p. 379-396, 1971.
90. SCHRÖDER, U.; SUNDSTROM, B. Transmission electron microscopy of tissue changes following experimental pulpotomy of intact human teeth and capping with calcium hydroxide. **Odontol. Revy**, Lund, v. 25, n. 1, p. 57-68, 1974.
91. SCIAKY, I.; PISANTI, S. Localization of calcium placed over amputated pulps in dog's teeth. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v. 39, n. 6, p. 1128-1132, Nov./Dec. 1960.
92. SELA, J.; TAMARI, I.; HIRSCHFELD, I.B. Transmission electron microscopy of reparative dentin in rat molar pulps. **Acta Anat.(Basel)**, Basel, v. 109, n. 3, p. 247-251, 1981.

93. SILVA, M.M.S.; CECCHINI, R.C.M.; EDUARDO, C.P. Aplicações clínicas do soft laser em odontologia. **Rev. Paul. Odontol.**, São Paulo, v. 14, n. 4, p. 30-32, jul./ago. 1992.
94. SIX, N. LASFARGUES, J.J.; GOLDBERG, M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 47, n.3, p. 177-187, Mar. 2002.
95. SLOAN, A.J.; SMITH, A.J. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor- $\beta$  isoforms 1-3 *in vitro*. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 149-156, Feb. 1999.
96. SLOAN, A.J.; RUTHERFORD, R.B.; SMITH, A.J. Stimulation of the rat dentine-pulp complex by bone morphogenetic protein-7 *in vitro*. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 45, n.2, p. 173-177, Feb. 2000.
97. SLOAN, A.J. et al. TGF- $\beta$  receptor expression in human odontoblasts and pulp cells. **Histochem. J.**, London, v. 31, n. 8, p. 565-569, Aug. 1999.
98. SLOAN, A.J. et al. Transforming growth factor- $\beta$  isoform expression in mature human healthy and carious molar teeth. **Histochem. J.**, London, v. 32, n. 4, p. 247-252, Apr. 2000.
99. SMITH, A.J.; LEAVER, A.G. Non-collagenous components of the organic matrix of rabbit dentine. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 449-454, 1979.
100. SMITH, A.J.; MATTHEWS, J.B.; HALL, R.C. Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. **Eur. J. Oral Sci.**, Cambridge, v. 106, suppl. 1, p. 179-184, Jan. 1998.
101. SMITH, A.J. et al. In vivo morphogenetic activity of dentine matrix proteins. **J. Biol. Buccale**, England, v. 18, n. 2, p. 123-129, Jun. 1990.

102. SMITH, A.J. et al. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 39, n.1, p. 13-22, Jan. 1994.
103. SMITH, A.J. et al. Influence of substrate nature and immobilization of implanted dentin matrix components during induction of reparative dentinogenesis. **Connect Tissue Res.**, London, v. 32, n. 1-4, p. 291-296, 1995.
104. SMITH, A.J. et al. Reactionary dentinogenesis. **Int. J. Dev. Biol.**, Vizcaya, v. 39, n. 1, p. 273-280, Feb. 1995.
105. SOUZA, M.A.L. Biologia pulpar. In ESTRELA, C.; FIGUEIREDO, J.A. **Endodontia: princípios biológicos e mecânicos**. São Paulo: Artes Médicas, 1999. cap. 1, p. 1-24.
106. TAKEDA, Y. Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 17, n. 6, p. 388-391, Dec. 1988.
107. TEUSCHER, G.W.R.; ZANDER, H.A. Preliminary report on pulpotomy. **Northwestern Univ. Dent. Bull.**, v. 39, p. 4-8, 1938 apud: Berman D.S. Pulp amputation and healing. **J. Dent. Child.**, Fulton, v. 25, p. 84-104, 1958.
108. THOMAS, M.; LEAVER, A.G. Identification and estimation of plasma proteins in human dentin. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 217-218, Mar. 1975.
109. TRONSTAD, L. Reaction of the exposed pulp to Dycal treatment. **Oral Surg.**, St. Louis, v. 38, n. 6, p. 945-953, Dec. 1974.
110. TURNER, C.; COUTS, F.J.; STANLEY, H.R. A histological comparison of direct pulp capping agents in primary canines. **J. Dent. Child.**, Fulton, v. 54, n. 6, p. 423-428, Nov. / Dec. 1987.

111. TZIAFAS, D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. **Int. J. Dev. Biol.**, Vizcaya, v. 39, n. 1, p. 281-290, Feb. 1995.
112. TZIAFAS, D. Induction of reparative dentinogenesis *in vivo*: a synthesis of experimental observations. **Connect Tissue Res.**, London, v. 32, n. 1-4, p. 297-301, 1995.
113. TZIAFAS, D.; KOLOKURIS, I. Inductive influences of demineralized dentin and bone matrix on pulp cells: an approach of secondary dentinogenesis. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v. 69, n. 1, p. 75-81, Jan. 1990.
114. TZIAFAS, D.; MOLYVDAS, I. The tissue reactions after capping of dog teeth with calcium hydroxide experimentally crammed into the pulp space. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 65, n. 5, p. 604-608, May 1988.
115. TZIAFAS, D.; PAPADIMITRIOU, S. Role of exogenous TGF- $\beta$  in induction of reparative dentinogenesis *in vivo*. **Eur. J. Oral Sci.**, Cambridge, v. 106, suppl. 1, p. 192-196, Jan. 1998.
116. TZIAFAS, D.; LAMBRIANIDIS, T.; BELTES, P. Inductive effect of native dentin on the dentinogenic potential of adult dog teeth. **J. Endod.**, Baltimore, v. 19, n.3, p. 116-122, Mar. 1993.
117. TZIAFAS, D.; SMITH, A.J.; LESOT, H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. **J. Dent.**, Guildford, v. 28, p. 77-92, 2000.
118. TZIAFAS, D. et al. Short-term dentinogenic response of dog dental pulp tissue after its induction by demineralized or native dentine, or predentine. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 37, n.2, p. 119-128, Feb. 1992.

119. TZIAFAS, D. et al. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after *in vivo* implantation of dentine matrix components. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 40, n. 10, p. 883-893, Oct. 1995.
120. TZIAFAS, D. et al. Effects of recombinant basic fibroblast growth factor insulin-like growth factor-II and transforming growth factor- $\beta$ 1 on dog dental pulp cells *in vivo*. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 431-444, Jun. 1998.
121. URIST, M. Bone histogenesis and morphogenesis in implants of demineralized enamel and dentin. **J. Oral Surg.**, St Louis, v. 29, n. 2, p. 88-102, Feb. 1971.
122. VILLA, R. G.; BRUGNERA JÚNIOR, A.; AUN, C. E. Estudo histológico da atuação do raio laser He:Ne na neoformação dentinária em polpas de ratos. **Oncris SBPqO**, p. 101, 1988.
123. WEISS, M.B.; BJORVATN, K. Pulp capping in deciduos and newly erupted permanent teeth of monkeys. **Oral Surg.**, St Louis, v. 29, n. 5, p. 769-775, May 1970.
124. YOSHIBA, K. et al. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. **J. Dent. Res.**, Washington, DC, v. 75, n. 8, p. 1590-1597, Aug. 1996.



## *9. Resumo*

---

---

---

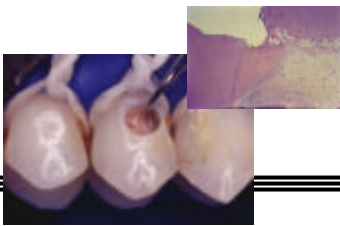
OLIVEIRA, M.F. **Resposta de polpas capeadas com proteínas bioativas ou hidróxido de cálcio submetidas ou não, à ação do laser.** 2004. 198f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

## **RESUMO**

Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a resposta do tecido pulpar de dentes de macacos-prego exposto mecanicamente e capeado com proteínas bioativas extraídas da dentina de incisivos de coelhos ou pasta de hidróxido de cálcio, precedidas ou não de uma aplicação do laser de baixa intensidade. Para o experimento foram selecionados 36 dentes de 4 macacos-prego, os quais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: G1: pasta de hidróxido de cálcio em água destilada, G2: laser + pasta de hidróxido de cálcio em água destilada, G3: proteína bioativa, G4: laser + proteína bioativa, G5: laser e G6: controle hídrico. Cavidades classe V foram confeccionadas na face vestibular dos dentes. Após exposição mecânica da polpa, diferentes terapias foram realizadas de acordo com os grupos experimentais. As cavidades foram restauradas com cimento de óxido de zinco e eugenol e amálgama. Decorrido o período experimental de 180 dias, os animais foram sacrificados, os dentes removidos e preparados para análise histológica. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais para os eventos histopatológicos resposta celular inflamatória, desorganização tecidual e presença de bactérias coradas. No entanto, em relação à formação de barreira mineralizada, o grupo que recebeu como material capeador a pasta de hidróxido de cálcio precedida ou não da aplicação do laser

apresentou as melhores respostas com formação de barreiras mineralizadas espessas e homogêneas. Concluiu-se que o laser de baixa intensidade aplicado previamente ao capeamento pulpar direto, não melhorou de forma significativa a resposta do tecido pulpar aos materiais capeadores empregados. A pasta de hidróxido de cálcio, aplicada sobre as polpas expostas, caracterizou os melhores resultados de reparação tecidual quando comparada às proteínas bioativas, com relação à formação de barreira mineralizada.

Palavras-chave: Exposição pulpar; proteínas bioativas; hidróxido de cálcio, laser de baixa potência.



## *10. Abstract*

---

---

---

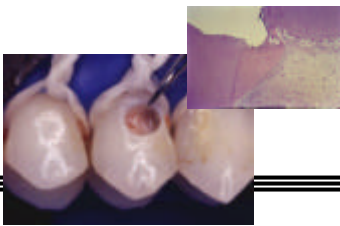
OLIVEIRA, M.F. **Response of pulps capped with bioactive proteins or calcium hydroxide paste preceded or not by low-energy laser irradiation.** 2004. 198f. Tese (Doutorado em Odontopediatria). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

## ***ABSTRACT***

The aim of this in vivo study was to evaluate the response of the dental pulp capped with bioactive proteins extracted from rabbit incisors dentin or calcium hydroxide paste, associated or not to a low energy laser irradiation. Thirty-six teeth of four non-human primates were randomly divided in the following groups: G1: calcium hydroxide paste; G 2: laser + calcium hydroxide paste; G3: bioactive proteins; G4: laser + bioactive proteins; G5: laser; G6: sound teeth (control). Deep class V cavities were prepared on the buccal surface of the teeth. The pulp tissue was mechanically exposed and capped with the experimental materials. The cavities were filled-up with zinc-oxide and eugenol cement and amalgam. After the postoperative period of 180 days, the animals were sacrificed and the teeth processed for histological evaluation. The histopathological analysis showed no statistical difference among the experimental groups regarding to the inflammatory cell response, tissue disorganization and stained bacteria. However, pulps capped with calcium hydroxide, regardless the low-energy laser irradiation, exhibited the best responses, with thick and homogeneous hard tissue barriers. It was concluded that the low-energy laser irradiation preceding the direct pulp capping did not improve the pulp tissue healing and dentin matrix deposition. Pulps

capped with calcium hydroxide paste showed better results when compared to those capped with bioactive proteins regarding to the hard tissue barrier formation.

Keywords: Pulpal wound; bioactive proteins; calcium hydroxide; low-energy laser



## *11. Anexos*

---

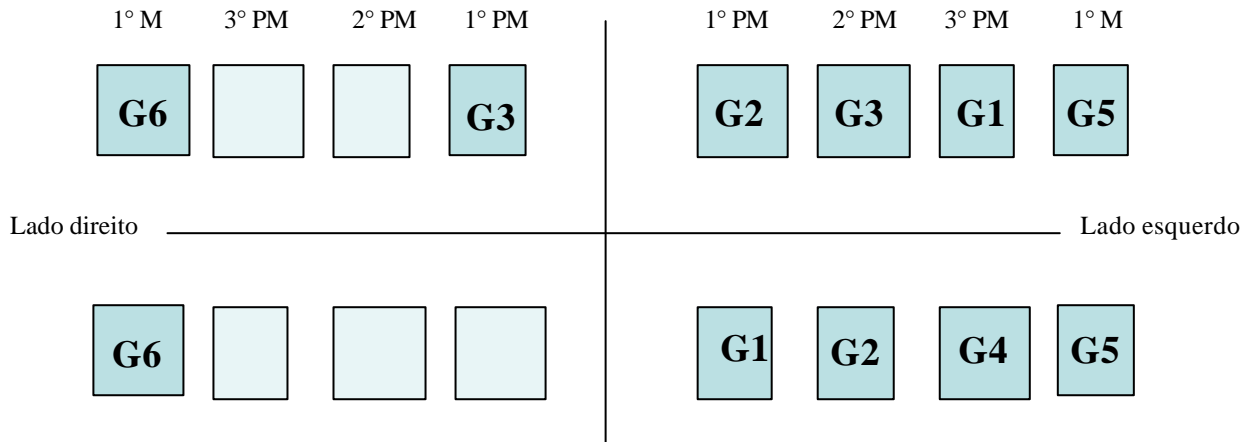
---







---






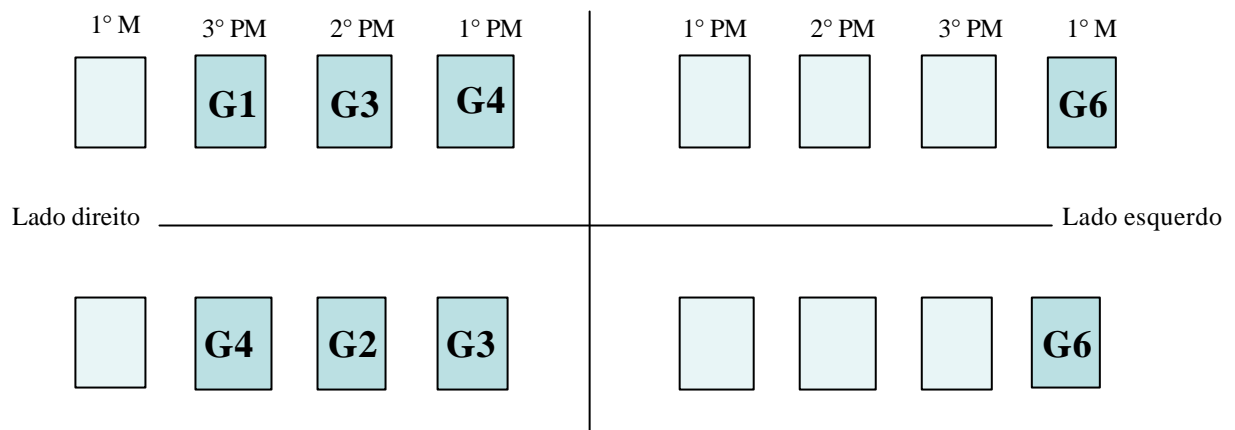
## Macaco #1










-  G1. Hidróxido de cálcio
-  G2. Laser + hidróxido de cálcio
-  G3. Proteína
-  G4. Laser + proteína
-  G5. Laser
-  G6. Controle

 Outro trabalho

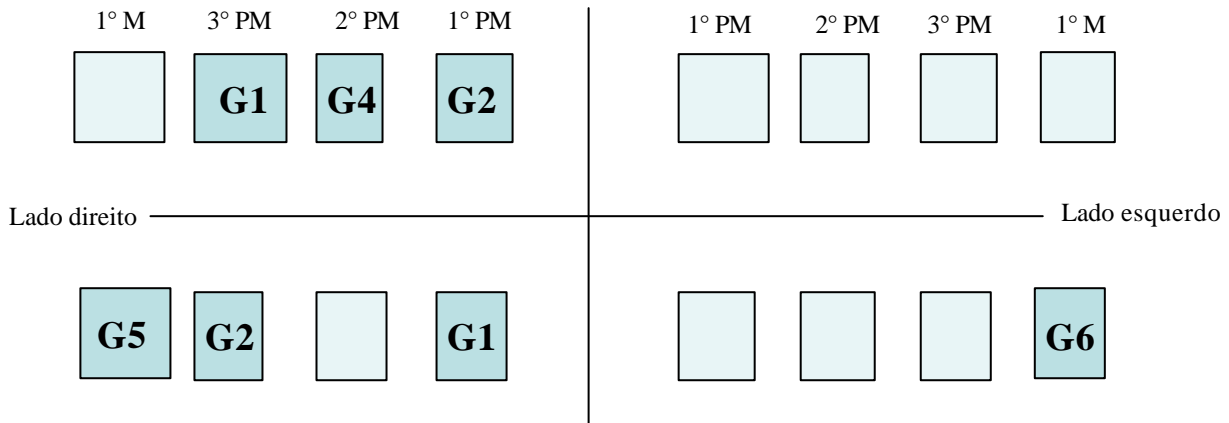
## Macaco #2










-  G1. Hidróxido de cálcio
-  G2. Laser + hidróxido de cálcio
-  G3. Proteína
-  G4. Laser + proteína
-  G5. Laser
-  G6. Controle

 Outro trabalho

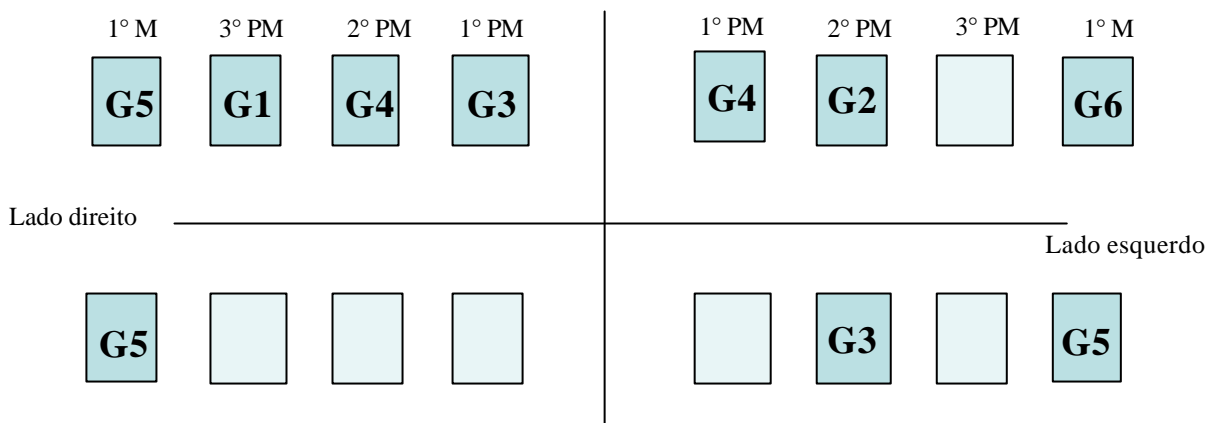
## Macaco #3









-  G1. Hidróxido de cálcio
-  G2. Laser + hidróxido de cálcio
-  G3. Proteína
-  G4. Laser + proteína
-  G5. Laser
-  G6. Controle

 Outro trabalho

## Macaco #4



-  G1. Hidróxido de cálcio
-  G2. Laser + hidróxido de cálcio
-  G3. Proteína
-  G4. Laser + proteína
-  G5. Laser
-  G6. Controle

 Outro trabalho

## Medidas do diâmetro da exposição pulpar em micrômetros

Grupo	Espécime	Medida(um)				Média(um)	Média do Grupo (um)
		1	2	3	4		
G1	1	363.18	361.62	363.44	363.44	362,92	411,87
	2	521.76	521.15	520.06	518.93	520,47	
	3	387.28	395.99	391.63	388.25	390,79	
	4	275,87	269,57	274,68	271,72	272,96	
	5	491.03	456.12	458.77	450.94	464,21	
	6	461.41	451.01	460.66	466.44	459,88	
G2	1	389.56	372.74	379.81	370.72	378,21	368,83
	2	185.17	183.42	199.19	204.58	193,09	
	3	542.45	535.51	533.36	510.73	530,51	
	4	303.56	316.23	311.75	308.05	309,90	
	5	432.52	431.72	432.11	433.52	432,47	
G3	1	456.78	470.05	471.75	481.41	470,00	409,13
	2	361.13	355.45	339.70	311.99	342,07	
	3	320.64	324.47	328.77	323.66	324,38	
	4	501.19	501.73	496.80	500.66	500,09	
G4	1	318.11	305.54	297.04	279.19	299,97	288,88
	2	226.65	232.25	238.00	235.98	233,22	
	3	334,95	338,38	346,99	341,73	340,51	
	4	275.41	279.61	288.59	283.68	281,82	
G5	1	699.75	716.07	706.60	700.10	705,63	426,17
	2	282.74	291.27	289.64	286.63	287,60	
	3	425.78	428.07	407.26	397.00	414,53	
	4	283.28	313.58	293.85	297.04	296,94	