

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DENTÍSTICA**



Tese

Avaliação da expressão da fibronectina e tenascina após capeamento pulpar utilizando diferentes agentes hemostáticos (modelo humano) e diferentes materiais capeadores (modelo animal).

Elaine de Fátima Zanchin Baldissera

Pelotas, 2006

Dados de catalogação na fonte:
Carmen Lúcia Lobo Giusti – CRB-10/813

B175 Baldissera, Elaine de Fátima Zanchin.

Avaliação da expressão da fibronectina e tenascina após capeamento pulpar utilizando diferentes agentes hemostáticos (modelo humano) e diferentes materiais capeadores (modelo animal) / Elaine de Fátima Zanchin Baldissera ; orientadora Sandra Beatriz Chaves Tarquínio ; co-orientadoras Adriana Etges e Ana Paula Neutzling Gomes. – Pelotas, 2006.
146f.

Tese (Doutorado em Odontologia - Dentística) - Programa de Pós-graduação em Odontologia. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal de Pelotas.

1. Capeamento pulpar 2. Fibronectina 3. Tenascina 4. Agentes hemostáticos 5. Imunoistoquímica I. Tarquínio, Sandra Beatriz Chaves, orient. II. Etges, Adriana, co-orient. III. Gomes, Ana Paula Neutzling, co-orient. IV. Título.

CDD: 617.6

ELAINE DE FÁTIMA ZANCHIN BALDISSERA

Avaliação da expressão da fibronectina e tenascina após capeamento pulpar utilizando diferentes agentes hemostáticos (modelo humano) e diferentes materiais capeadores (modelo animal).

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração em Dentística.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

Co-orientadores: Profa. Dra. Adriana Etges

Profa. Dra. Ana Paula Neutzling Gomes

Pelotas, 2006

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ana Paula Nunes

Profa. Dra. Elena Riet Correa Rivero

Prof. Dr. Evandro Piva

Prof. Dr. Flávio Fernando Demarco

Profa. Dra. Sandra Beatriz chaves Tarquinio

Prof. Dr. João Batista César Neto (suplente)

Profa. Dra. Márcia Bueno Pinto (suplente)

*Aos meus pais Gervásio e Audila(in memoriam);
a meu esposo Rudimar,
e aos nossos filhos Vinícius e Pedro,
dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida.

Aos meus pais Gervásio e Audila (*in memoriam*), exemplos de amor, dedicação e vida.

Ao querido Rudimar, sempre paciente, carinhoso e companheiro e aos nossos amados filhos Vinícius e Pedro que, sem dúvida, são a energia de nossas vidas. Vocês são especiais.

A minha orientadora Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio pelos momentos agradáveis de convívio, sua dedicação, incentivo, compreensão e acima de tudo a amizade franca e sincera.

A Dra. Adriana Etges e Dra Ana Paula Neutzling Gomes, co-orientadoras pelo apoio, disponibilidade, colaboração e amizade.

As amigas Mariza Bidese de Pinho e Tânia Clasen Chaves, pela compreensão, incentivo e principalmente por estes anos de amizade fraterna.

Ao coordenador da pós-graduação Dr. Evandro Piva e ao ex- coordenador Dr. Flávio Fernando Demarco, bem como aos professores e alunos do programa.

Ao departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia da USP pela doação dos anticorpos utilizados nesta pesquisa.

Aos professores do departamento de Patologia da PUC-RS, por disponibilizarem o equipamento fotográfico para aquisição das imagens deste estudo.

Aos colegas do doutorado Elenara, Antonio, Sinval, Fábio H. e Fábio L. pela oportunidade de conviver e aprender.

A Adriana e ao Antonio pela inestimável contribuição para a realização deste trabalho.

A Silvana e Ivana, pelo apoio e convívio agradável durante meu trabalho no laboratório de Patologia.

As alunas Carolina e Cássia pela ajuda e incentivo durante a execução do experimento.

A todos os colegas professores desta faculdade, bem como funcionários e alunos, os quais tenho o prazer de conviver todos os dias.

Enfim, a todos que mesmo não sendo mencionados, contribuíram e são estímulos em minha vida.

Meu muito obrigada!

Lista de figuras

Artigo 1

Figuras 1A – 1G - Expressão imunoistoquímica da TN no reparo pulpar humano....84

Figuras 2A – 2F Expressão imunoistoquímica da FN no reparo pulpar humano.... 86

Artigo 2

Figuras 1A – 1D Aspectos histológicos do reparo pulpar em dentes suínos
capeados com Ca(OH)_2 (HE).....106

Figuras 1E – 1H Aspectos histológicos do reparo pulpar em dentes suínos
capeados com MTA (HE).....106

Figuras 2A – 2D Expressão imunoistoquímica da TN no reparo pulpar de suínos,
após capeamento direto com cimento de Ca(OH)_2 108

Figuras 2E – 2I Expressão imunoistoquímica da FN no reparo pulpar de suínos,
após capeamento direto com cimento de Ca(OH)_2 108

Figuras 3A – 3D Expressão imunoistoquímica da TN no reparo pulpar de suínos,
após capeamento direto com MTA..... 110

Figuras 3E – 3H Expressão imunoistoquímica da FN no reparo pulpar de suínos,
após capeamento direto com MTA..... 110

Lista de tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Representação da amostra do estudo em humanos.....	80
Tabela 2	Anticorpos primários - suas especificidades, diluições, fontes e tratamentos prévios.....	.81

Artigo 2

Tabela 1	Representação da amostra do estudo em suínos.....	100
Tabela 2	Anticorpos primários- suas especificidades, diluições, fontes e tratamentos.....	102

Lista de abreviaturas

®	marca registrada
µm	micrometros
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BSA	albumina bovina sérica
Ca(OH) ₂	Hidróxido de Cálcio
Fig.	Figura
FN	Fibronectina
G0	fase do ciclo celular
HE	Hematoxilina-Eosina – Técnica de coloração
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
kDa	kilodalton
LSAB	<i>Labelled Streptavidin Biotin</i>
ME	matriz extracelular
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
MTA	<i>mineral trioxide aggregate</i> – agregado trióxido mineral
NaOCl	hipoclorito de sódio
PBS	solução tampão fosfato
RA	<i>retinoic acid</i>
TGF- β1	<i>transforming growth factor β1</i>
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
TN	tenascina
TRIS	Tris-hidroxi-metil-aminometano
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas

Sumário

Projeto de Pesquisa.....	10
Revisão da Literatura.....	53
Relatório do trabalho de campo.....	72
Artigo 1.....	75
Artigo 2.....	97
Conclusões.....	120
Referências.....	122
Anexos.....	136

PROJETO DE PESQUISA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM DENTÍSTICA**

Avaliação da biocompatibilidade e da genotoxicidade do hipoclorito de sódio e do gluconato de clorexidina utilizados previamente ao capeamento pulpar direto e estudo imunoistoquímico da expressão de componentes da matriz extracelular em polpas humanas expostas a esses agentes hemostáticos.

ELAINE F. ZANCHIN BALDISSERA

PROJETO DE PESQUISA

ORIENTADORA: Prof^ª Dr^ª Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

CO-ORIENTADORAS: Prof^ª Dr^ª Adriana Etges

Prof^ª Dr^ª Ana Paula Neutzling Gomes

Pelotas

Mai 2005

ELAINE DE FÁTIMA ZANCHIN BALDISSERA

Avaliação da biocompatibilidade e da genotoxicidade do hipoclorito de sódio e do gluconato de clorexidina utilizados previamente ao capeamento pulpar direto e estudo imunoistoquímico da expressão de componentes da matriz extracelular em polpas humanas expostas a esses agentes hemostáticos.

Projeto de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração em Dentística.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

Co-orientadores: Profa. Dra. Adriana Etges

Profa. Dra. Ana Paula Neutzling Gomes

Pelotas, 2006

Banca examinadora

Profa. Dra. Maria da Graça Roth

Profa. Dra. Fátima Alves Beira

Profa. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquínio

Lista de abreviaturas

ADA	<i>American Dental Association</i>
β	beta
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
Ca(OH) ₂	Hidróxido de Cálcio
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	do inglês
Fig.	Figura
FNC	Fibronectina
HCl	Ácido clorídrico
kDa	Kilodalton
MB	Membrana basal
ME	Matriz extracelular
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
MTT	Metiltetrazolium
NaOCl	Hipoclorito de sódio
P.A.	Pró-análise
Ph	Potencial hidrogeniônico
®	Símbolo indicativo de marca registrada
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TNC	Tenascina
TRIS	Tris-hidroxil-metil-aminometano

1. RESUMO

O controle do sangramento frente a uma exposição pulpar é de fundamental importância no sucesso do capeamento direto. As soluções de hipoclorito de sódio e de gluconato de clorexidina têm sido utilizadas como agentes de limpeza e hemostasia na terapia pulpar conservadora.

Alguns estudos têm indicado para o controle da hemorragia e sucesso do capeamento pulpar adesivo o hipoclorito de sódio (COX *et al.*, 1998; COX *et al.*, 1999). Além de ser bom agente antimicrobiano, o hipoclorito possui elevado Ph, o que implicaria na solubilização de fatores de crescimento da dentina, e conseqüentemente, na estimulação à formação de dentina (SMITH *et al.*, 2002). No entanto, pesquisas também demonstram a atividade de dissolução tecidual do hipoclorito quando empregado a 5.25%. Porém esta é limitada às células superficiais pulpares sem efeitos adversos sobre o tecido pulpar subjacente (SENIA *et al.*, 1971; ROSENFELD *et al.*, 1978).

Pouco se sabe a respeito da biocompatibilidade da clorexidina (THOMAS *et al.*, 1995). Cox *et al.* (1998) sugeriram que esta substância poderia ser a causa de desastrosos resultados encontrados no estudo de Pameijer & Stanley (1998). Em contrapartida, a clorexidina a 0,2% utilizada no capeamento pulpar direto como agente hemostático e de limpeza, tem demonstrado boa performance em estudos em humanos (HORSTED *et al.*, 2003) e em macacos (MURRAY *et al.* 2004)

Diante das evidências apresentadas, pode-se observar que não há unanimidade entre os pesquisadores a respeito de qual dessas substâncias e suas respectivas concentrações seria mais efetiva na realização das terapias conservadoras vitais, especialmente no capeamento pulpar direto.

Adicionalmente, as alterações na distribuição de componentes da matriz extracelular (ME) têm sido estudadas durante o desenvolvimento dentário e nos processos de reparo pulpar. As duas maiores glicoproteínas da ME, Fibronectina (FNC) e Tenascina (TNC) têm sido descritas como importantes para o estímulo e mobilidade celulares, durante a diferenciação de células odontoblastóides a partir de células multipotentes da polpa. No entanto, a participação da ME e sua interação com as reações celulares têm sido pouco exploradas e compreendidas. Desta forma, tornam-se fundamentais as investigações sobre a expressão dos componentes da

ME durante o processo de reparo pulpar, na tentativa de buscar melhor entendimento dos eventos de resposta deste tecido após o capeamento direto.

O objetivo deste estudo é avaliar a biocompatibilidade do hipoclorito de sódio e do gluconato de clorexidina em diferentes concentrações, através de estudo in vitro de cultivo celular; a genotoxicidade dessas duas soluções, utilizando a reação de Feulgen para detecção e análise de micronúcleos e a expressão de componentes da matriz extracelular, através de estudo imunistoquímico (técnica da estreptoavidina-biotina) em polpas humanas expostas, tratadas com os agentes hemostáticos hipoclorito de sódio a 5,25% e gluconato de clorexidina a 2%, empregados previamente ao capeamento pulpar direto. Para o ensaio de citotoxicidade do MTT será utilizada a linhagem celular NIH/3T3 (fibroblastos de rato). Este ensaio foi escolhido porque estudos prévios (COSTA, 2001; ZHANG et al., 2003) têm mostrado ser o mesmo apropriado para a avaliação da viabilidade ou citotoxicidade celulares, frente a materiais de uso odontológico. Serão testadas em diferentes tempos de exposição, as soluções de hipoclorito de sódio a 0,5%, 1%, 2,5% e 5,25% e de gluconato de clorexidina a 0,12%, 0,2%, 1% e 2%, bem como a solução salina 0,9%, que funcionará como controle negativo dos testes. Para o ensaio de genotoxicidade, será feita a análise semi-quantitativa dos micronúcleos de amostras previamente emblocadas, oriundas de 45 espécimens com polpas humanas tratadas com hipoclorito de sódio a 5,25% (n=16), gluconato de clorexidina (n=15) e solução salina a 0,9% (n=14). A mesma amostra de estudo in vivo também será utilizada para a avaliação da expressão imunistoquímica dos componentes da matriz extracelular.

Palavras chave: 1. Biocompatibilidade 2. Micronúcleos 3. Imunistoquímica
4. Hipoclorito de sódio 5. Clorexidina 6. Fibronectina 7. Tenascina
8. Matriz Extracelular

2. ANTECEDENTES

A preservação da vitalidade pulpar durante o tratamento restaurador é fundamental, pois a polpa mantém sua atividade funcional, proporcionando assim a capacidade de resposta dentinogênica aos estímulos biológicos e patológicos (STANLEY, 1989). Essa capacidade é expressa através da produção de dentina secundária, dentina peritubular, dentina reparativa e reacional (TZIAFAS et al., 2000).

Quando há a exposição do tecido pulpar, as células apresentam potencialidade intrínseca para alongar, polarizar e secretar progressivamente matriz tubular em um padrão similar à pré-dentina, resultando na diferenciação de células e aquisição de fenótipo semelhante a odontoblastos, caracterizando desse modo, o processo de reparo (KAKEHASHI et al., 1965; TSUJI et al., 1987; LESOT et al., 1994).

A polpa por si só possui capacidade de recuperar-se da injúria sobre ela ocorrida, desde que existam condições favoráveis para que isto aconteça (MJÖR, 2002). Sendo a principal condição a não existência de microorganismos no local da exposição.

A substância de limpeza utilizada sobre a exposição pulpar deve possuir propriedades físico-químicas capazes de remover o máximo possível de debris operatórios, incluindo fragmentos de dentina contaminada, onde se alojam milhões de bactérias. Caso isso não seja feito, a presença destes fragmentos de dentina no interior da polpa também colaborará para a permanência do processo inflamatório e para a imperfeição da barreira dentinária (WALTON & LANGELAND, 1978), bem como poderá induzir a formação de calcificações pulpares (HOLLAND *et al.*, 1978).

Schröder (1973), verificou que o maior problema no capeamento de polpas inflamadas é o controle da hemorragia e do exsudato tecidual da superfície pulpar, sendo esta condição muito relevante para o processo de reparo pulpar.

Outra importante evidência a ser considerada é quanto à presença do coágulo sanguíneo entre a superfície da ferida pulpar e o agente capeador. O material capeador não deve ser colocado quando ainda houver sangramento ou pequena quantidade de plasma sanguíneo, pois pode-se criar um espaço entre a superfície pulpar e o mesmo (SCHRÖDER., 1985). Caso haja escoamento de sangue abaixo da cobertura realizada pelo material de proteção pulpar, esse formará

um coágulo ou mesmo espessa membrana fibrino-purulenta, a qual será substituída por tecido de granulação e favorecerá a organização e diferenciação de fibroblastos e células odontoblastóides, produzindo dentina reparativa ectópica. Quando isto ocorre, a polpa é colocada sob máximo esforço desnecessariamente (SCHRÖDER, 1985) e corre-se o risco de contaminação por infecção secundária e da perda da vitalidade pulpar.

Para conseguir o controle da hemorragia pulpar, convencionalmente, os clínicos aplicam pressão no local da exposição com uma bolinha de algodão estéril até que haja hemostasia. Tal prática nem sempre é efetiva (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Ainda, se tal procedimento não for executado eficazmente, permitirá a persistência da resposta inflamatória crônica e, conseqüentemente, prejudicará o reparo pulpar (SCHRÖDER, 1985; COX *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2000).

Muitas vezes, para auxiliar o controle do sangramento pulpar são utilizadas bolinhas de algodão embebidas em soro fisiológico (HOLLAND *et al.*, 1978; HÖRSTED *et al.*, 1981; PITT FORD, 1985; COX *et al.*, 1996; FITZGERALD & HEYS, 1991; HEBLING *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2000; CEHRELI *et al.*, 2000; DEMARCO *et al.*, 2001). Porém esta substância não é capaz por si só de auxiliar na hemostasia (STANLEY, 1989; DEMARCO *et al.*, 2001), principalmente quando o material capeador a ser utilizado é adesivo e exista a necessidade do condicionamento ácido (PAMEIJER & STANLEY, 1998; HAFEZ *et al.*, 2002). Além disso, a dentina contaminada por sangue poderia interferir na adesão por diminuir a área de união viável (KITASAKO *et al.*, 1999).

Desta maneira, outras substâncias tem sido empregadas, como é o caso do peróxido de hidrogênio (HORSTED *et al.*, 1981), de soluções anestésicas que contenham epinefrina (HEBLING *et al.*, 1999), da água de cal (SCHRÖDER *et al.*, 1971; SCHRÖDER 1985), e do sulfato férrico (FEI *et al.*, 1991; ACCORINTE, 2000).

Todavia, essas substâncias foram, com o passar do tempo, dando lugar a clorexidina (PAMEIJER *et al.*, 1998; STANLEY *et al.*, 2001; HÖRSTED *et al.*, 2003), e ao hipoclorito de sódio (COX *et al.*, 1998; COX *et al.*, 1999; HAFEZ *et al.*, 2002; ELIAS *et al.*, 2004), bem como às formas associadas, como é o caso da água oxigenada com o hipoclorito (KITASAKO *et al.* 2002; KIBA *et al.*, 2000; KITASAKO *et al.*, 1999; KITASAKO *et al.* 1998; MATSUO *et al.*, 1996). Mesmo não demonstrando serem prejudiciais ao processo de reparo pulpar, esses agentes são

ainda empregados de forma empírica, pois não existe na literatura nenhum trabalho que avalie o potencial reparador dessas substâncias quando comparadas entre si.

As substâncias mais freqüentemente empregadas como agentes antimicrobianos nos tratamentos das infecções periodontais e endodônticas são o hipoclorito de sódio e a clorexidina (JENKINS *et al.*, 1988; CHANG, *et al.*, 2001; SLOTS, 2002; ESTRELA *et al.*, 2002). Entretanto, recentemente estes agentes passaram também a ser utilizados como soluções de limpeza e hemostasia na terapia pulpar conservadora (COX *et al.*, 1998; PAMEIJER *et al.*, 1998; COX *et al.*, 1999; STANLEY *et al.*, 2001; HAFEZ *et al.*, 2002; HÖRSTED *et al.*, 2003; ELIAS *et al.*, 2004).

2.1. HIPOCLORITO DE SÓDIO

Os hipocloritos são compostos instáveis por serem oxidantes, sendo estabilizados em meio alcalino. A molécula de hipoclorito existe somente em solução aquosa e, através de um equilíbrio dinâmico, origina hidróxido de sódio e ácido hipocloroso. De tal modo que, quando o hipoclorito de sódio é aplicado sobre a matéria orgânica causa a dissolução da mesma (SENIA *et al.*, 1971; ROSENFELD *et al.*, 1978; SPANÓ, 1999; ESTRELA *et al.*, 2002).

Desta forma, a dissolução do tecido pulpar se verifica pelo efeito combinado entre o hidróxido de sódio (base forte) e o ácido hipocloroso (ácido fraco) (SPANÓ, 1999; DIP *et al.*, 2002), cada um reagindo com determinados componentes da polpa dentária, de maneira simultânea. O hidróxido de sódio é uma base forte, altamente reativa, estando praticamente cem por cento dissociado. Esta molécula quimicamente é responsável por uma série de reações de decomposição de compostos orgânicos, principalmente ésteres. Esse grupo de reações recebe o nome de saponificação. Nos tecidos orgânicos vivos, sobretudo no tecido pulpar, encontram-se gorduras (tecido adiposo) e a ação histolítica do hidróxido de sódio é justamente dada pela saponificação dessas gorduras. O hidróxido de sódio também apresenta ação proteolítica, através da hidrólise de proteínas. A molécula de hidróxido de sódio reage com aminoácidos das proteínas, formando sal, água e despolimerizando o ácido hialurônico, um polímero do ácido glicurônico, que mantém a coesão tecidual (DIP *et al.*, 2002). Já o ácido hipocloroso reage com o grupamento amina de proteínas citoplasmáticas, formando cloraminas e água. Cabe ressaltar

que, dependendo do Ph do meio, o ácido hipocloroso pode encontrar-se ionizado (meio alcalino, Ph>9) ou não ionizado.

Além do poder de dissolução química do tecido orgânico necrótico ou vivo, o hipoclorito também possui efeito antimicrobiano. De acordo com Estrela *et al.* (2002), este efeito é dado por seu elevado Ph e pela ação iônica das hidroxilas, de maneira similar ao efeito do hidróxido de cálcio. Ou seja, interferindo na integridade da membrana citoplasmática com inibição enzimática irreversível, que acarretam alterações biossintéticas no metabolismo celular e destruição fosfolipídica. A inativação enzimática pode ser observada na reação de cloro com grupos amino. Esta reação é conhecida como reação de cloraminação aminoácida tendo como produto as cloraminas. Estas moléculas interferem no metabolismo celular, pois promovem oxidação por inibição enzimática irreversível da bactéria, substituindo hidrogênio por cloro. Outro tipo de inativação enzimática promovida pelo cloro é a oxidação irreversível de grupos sulfídricos das enzimas bacterianas. Dessa forma, o hipoclorito de sódio apresenta ação antimicrobiana, essencialmente, em moléculas enzimáticas, promovendo inativação irreversível originada pelos íons hidroxilas e por ação de cloraminação.

2.2. CLOREXIDINA

A clorexidina é uma substância química que apresenta amplo espectro de ação, atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DAVIES *et al.*, 1954), porém as primeiras são geralmente mais sensíveis que as últimas (BOWDEN & EDWARDSSON, 1995). A clorexidina é quimicamente uma biguanidina com propriedades catiônicas. Pode ser encontrada em três formas de acetato, hidróclorido ou de gluconato. Na odontologia a forma empregada é a de gluconato, sendo esta uma molécula estável. Quando em altas concentrações é bactericida (LOEE *et al.*, 1965; SILVA, 2002), pois provoca rapidamente a precipitação de constituintes citoplasmáticos das bactérias. No entanto, quando em baixas concentrações causa o desprendimento de substâncias de pequeno peso molecular, como o potássio e o fósforo, exercendo efeito bacteriostático prolongado, em função de sua elevada substantividade (LEONARDO *et al.*, 1999; KOMOROWSKI *et al.*, 2000).

Devido a sua constituição, a clorexidina possui natureza catiônica, e por esta característica é capaz de promover a união aos elementos aniônicos da superfície

bacteriana, causando alterações na permeabilidade de sua membrana. O mecanismo de ação do gluconato de clorexidina é baseado na adsorção à superfície da célula bacteriana, o que provoca a alteração da permeabilidade celular e conseqüentemente, de constituintes celulares (LASCALA & MOUSSALLI, 1999), especialmente dos ácidos nucléicos e do potássio (JORGE, 1998). Este agente químico promove também a precipitação de proteínas citoplasmáticas, alterações no equilíbrio osmótico celular, além de interferir no metabolismo, crescimento e divisões celulares, bem como inibir a ação da enzima ATPase da membrana citoplasmática e a iniciação do processo anaeróbico (ESTRELA *et al.*, 2003).

2.3. AÇÃO ANTIMICROBIANA

Vários estudos têm testado a eficácia antimicrobiana do hipoclorito e da clorexidina, principalmente quando relacionados às bactérias patogênicas encontradas no interior de canais radiculares (AYHAN *et al.*, 1999; KOMOROWSKI *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2001; FERRAZ *et al.*, 2001; ESTRELA *et al.*, 2003), e outros poucos enfocam a ação dessas substâncias sobre os microorganismos presentes nas lesões de cárie (ZICKERT *et al.*, 1982; BRISENO *et al.*, 1992; HELING *et al.*, 2001).

Ayhan *et al.* (1999) verificaram a ação antimicrobiana do hipoclorito a 0,5 e 5,25%, da clorexidina 2%, do soro fisiológico, e do cresofeno (paramonoclorofenol) em relação a microorganismos presentes no interior de canais: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus salivarius*, *Staphylococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *candida albicans*. A análise foi estudada pelo halo de inibição, sendo que o maior foi atribuído ao cresofeno. Mas, segundo estes autores, esta solução é altamente citotóxica e possivelmente mutagênica e carcinogênica. Portanto, o hipoclorito a 5,25% foi o mais efetivo, depois do cresofeno, em relação às demais substâncias analisadas.

Resultado semelhante, quanto ao hipoclorito a 5,25%, foi verificado com o trabalho de Gomes *et al.* (2001). O estudo comparou diferentes concentrações de clorexidina (tanto sob a forma de gel como a líquida) e de NaOCl, quanto ao tempo necessário para produzir total inibição do crescimento de *Enterococcus faecales*. Após a análise dos resultados verificou-se que existe diferença significativa quanto às formulações, pois a clorexidina a 0,2% na forma líquida necessitou apenas de 30 segundos para evitar o crescimento microbiano. Já na mesma concentração, quando

na forma de gel, a clorexidina necessitou de 2 horas para produzir o efeito similar. As outras concentrações de clorexidina a 1% e 2% na forma líquida necessitaram menos que 30 segundos para neutralizar o crescimento. O mesmo não foi evidenciado com o hipoclorito de sódio quando sua concentração foi igual ou inferior a 4%, pois este necessitou de mais de 5 minutos para impedir o crescimento. Todavia, o hipoclorito a 5,25%, levou também menos de 30 segundos para produzir a inibição completa do crescimento bacteriano. Portanto, concluíram os autores que, a atividade antimicrobiana dos agentes testados, necessária para eliminar *Enterococcus faecales*, foi dependente da concentração e tipo de fórmula utilizadas.

Outros estudos verificaram a incapacidade na destruição de microorganismos cariogênicos (*Streptococcus mutans*), do hipoclorito em baixas concentrações, como a de 1% (D'ARCANGELO *et al.*, 1998) e a de 0,5% (LEONARDO *et al.*, 1999). Contudo, outros trabalhos revelaram resultados opostos quando a metodologia mudou. Heling *et al.* (2001) verificaram que o hipoclorito quando utilizado em concentrações maiores que 0,01% foi eficaz em destruir *Streptococcus mutans*. Assim como, Briseno *et al.* (1992) observaram que a concentração de hipoclorito a 1% foi mais eficaz em destruir *Streptococcus mutans* que a 2% durante a irrigação de canais radiculares.

Estrela *et al.* (2003) analisaram o efeito antimicrobiano em diferentes tempos do hipoclorito a 2% e da clorexidina a 2% através do método de difusão por Agar e teste de exposição direta a cinco microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecales*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. As duas substâncias apresentaram efeito antimicrobiano de acordo com o teste empregado. Para a exposição direta, o hipoclorito apresentou melhores resultados e para o teste de difusão por Agar, a clorexidina. Assim, os autores concluíram que a magnitude do efeito antimicrobiano foi influenciada pelo método experimental, pelos microorganismos e pelo tempo de exposição.

2.4. BIOCAMPATIBILIDADE DAS SUBSTÂNCIAS HEMOSTÁTICAS E DE LIMPEZA PULPAR

Entende-se como biocompatibilidade a habilidade de um material provocar o desfecho de uma resposta específica em um organismo ou tecido vivo (BROWNE, 1994).

Em cultura de células, foi observado severo efeito citotóxico quando usado o hipoclorito em baixas concentrações (COSTA *et al.*, 2001; HELING *et al.*, 2001). Entretanto, para hemostasia das exposições pulpares, quando utilizado hipoclorito a 2,5% (COX *et al.*, 1999) não foi observado nenhum efeito negativo às células pulpares, ou mais especificamente, à formação de células odontoblastóides.

Alguns pesquisadores (COX *et al.*, 1998; COX *et al.*, 1999) têm indicado para o controle da hemorragia e para o sucesso do capeamento pulpar adesivo o NaOCl. Além de ser agente antimicrobiano, o hipoclorito possui elevado Ph, similar ao hidróxido de cálcio (ESTRELA *et al.*, 2002), o que implicaria na solubilização de fatores de crescimento da dentina, e conseqüentemente, na estimulação à formação de dentina (SMITH *et al.*, 2002).

No entanto, pesquisas também demonstram a atividade de dissolução tecidual do hipoclorito quando empregado a 5.25%. Porém esta é limitada às células superficiais pulpares sem efeitos adversos sobre o tecido pulpar subjacente (SENIA *et al.*, 1971; ROSENFELD *et al.*, 1978). Rosenfeld *et al.* (1978) verificaram, em polpas humanas, que 15 minutos de irrigação com hipoclorito a 5,25% promove dissolução pulpar, porém é restrita a abertura do lúmen, sendo que a ação de solubilização é maior que o efeito necrosante e nenhum tecido destruído foi imediatamente removido. Outro fator importante descoberto no estudo, é que esta substância, notadamente nessa concentração, não solubilizou dentina mineralizada, somente a pré-dentina.

A solução de hipoclorito a 6% quando colocada sobre a exposição pulpar com bolinha de algodão, conseguiu remover a maioria das lascas de dentina, bem como o coágulo e as células danificadas e, o mais importante de tudo, controlou a hemorragia na polpa (KATOH *et al.* 1978).

Em estudo semelhante, Hafez *et al.* (2002) analisaram a biocompatibilidade do hipoclorito a 3% em exposições pulpares em macacas. Os resultados demonstraram que o hipoclorito a 3% removeu o coágulo, as lascas de dentina, os debris operatórios, bem como controlou a hemorragia. Entretanto, no grupo controle do estudo não foi utilizado NaOCl, mas soro fisiológico, o qual mostrou resultados bastante semelhantes ao do NaOCl. Assim, estes autores ressaltaram que talvez não exista diferença entre o uso destas duas substâncias, bem como questionaram quanto ao fato das mesmas causarem injúria química adicional à polpa, quase

sempre já lesada, uma vez que isto poderia ser evitado com o uso de substâncias de ação menos lesiva, como seria o caso, por exemplo, da clorexidina.

Vários estudos, *in vitro*, tem demonstrado o efeito citotóxico da clorexidina sob diferentes tempos, concentrações e métodos de avaliação (PUCHER E DANIEL, 1992; WILKEN et al., 2001; CHANG et al., 2001; HIDALGO E DOMINGUES, 2001; ZHANG et al, 2001; HERNANDEZ et al, 2005).

Pouca informação tem-se sobre a biocompatibilidade da clorexidina utilizada como agente hemostático pulpar. Cox *et al.* (1998) sugeriram que esta substância poderia ser a causa de desastrosos resultados encontrados no estudo de Pameijer & Stanley (1998). Esses autores sugeriram que foi o Consepsis (clorexidina a 2%) que causou a irritação da polpa exposta de macacos, e com isto o comprometimento do reparo e a formação de ponte dentinária. Entretanto, Thomas *et al.* (1995) realizaram estudo histológico empregando clorexidina 0,2% ou hidróxido de cálcio como capeadores pulparem em polpas expostas de cães. Os autores concluíram que não houve diferença significativa entre os dois materiais em até 15 semanas de observação.

Horsted *et al.* (2003) utilizaram a clorexidina 0,2% como agente hemostático e de limpeza no capeamento pulpar direto em humanos, utilizando como capeador pulpar sistema adesivo (Single Bond[®]) ou a tradicional terapia de Ca(OH)₂ (Dycal[®]). Os autores verificaram que a clorexidina foi biocompatível, uma vez que efetivou o controle da hemorragia e não interferiu no reparo pulpar. Entretanto, o material capeador adesivo não demonstrou mesma performance, pois este apresentou menor quantidade de formação de barreira do que o Dycal[®].

O reparo periapical e apical de dentes de cães que exibiam polpa necrosada ou com lesão periapical crônica foi avaliado por Tanomaru Filho *et al.* (2002). Após 210 dias da obturação dos canais os animais foram sacrificados. Os dentes tratados com solução irrigante de clorexidina 2% exibiram estatisticamente melhor reparo que os tratados com hipoclorito a 5,25%.

Murray *et al.* (2004) testaram vários agentes hemostáticos antes do capeamento pulpar direto em dentes de macacos. Os pesquisadores não verificaram nenhuma influência significativa desses materiais sobre o sistema pulpar fisiológico ou de reparo. Os autores testaram hipoclorito de sódio a 5,25%, Concepsis (clorexidina a 2%) e epinefrina como agentes hemostáticos.

Entretanto, desde que diferenças foram encontradas entre a resposta em modelos de animais e de humanos (COSTA *et al.*, 1999) existe a necessidade de estudos investigativos sobre a resposta pulpar humana frente às soluções hemostáticas empregadas antes da aplicação do material capeador.

A partir destas evidências apresentadas, pode-se observar a falta de unanimidade entre os pesquisadores a respeito de qual dessas substâncias e suas respectivas concentrações seria mais efetiva no capeamento pulpar direto.

Assim, são necessários estudos, em humanos, que diminuam o máximo possível de variáveis, e levem em consideração a influência das principais soluções empregadas no processo de reparo da polpa mediante o seu capeamento direto. Esta análise deve valorizar além da formação de barreira e a resposta inflamatória apresentada, também, a manutenção da organização tecidual, ou seja, a capacidade da substância em remover lascas de dentina, coágulo sanguíneo, debris operatórios do local e acima de tudo, controlar a hemorragia.

Procurando elucidar essas questões, Silva (2004) realizou estudo avaliando histologicamente a resposta pulpar frente à utilização do hipoclorito de sódio a 5,25%, do gluconato de clorexidina a 2% e do soro fisiológico 0,9% (controle), empregados previamente ao capeamento direto de polpas humanas. Para tal análise foram utilizados os critérios: resposta inflamatória, organização tecidual, formação de dentina reparativa e de dentina reacionária. Com base nos resultados obtidos a autora concluiu que, em linhas gerais, o hipoclorito de sódio a 5.25% e o gluconato de clorexidina a 2% demonstraram comportamento semelhante ao da solução-controle (soro fisiológico 0,9%), segundo os critérios avaliados, o que se traduz em processo de reparo pulpar similar nos espécimens referentes às soluções citadas.

2.5. ENSAIO DE GENOTOXICIDADE — TESTE DE MICRONÚCLEOS

Os testes genotóxicos detectam mutações, tanto a nível cromossômico quanto a nível gênico, responsáveis pelo surgimento de cânceres e outras doenças. A avaliação do dano ao DNA a nível cromossômico é parte da genética toxicológica, considerando que as alterações cromossômicas são eventos importantes no processo de carcinogênese (ROTH *et al.*, 2002).

O teste de micronúcleo consiste na detecção de perdas de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros dispersos no citoplasma, não

incorporados à célula-filha durante a divisão. Detecta tanto a perda como a quebra cromossômica, visto que são biomarcadores que se manifestam a curto prazo após exposição e sua frequência se encontra elevada em tecidos expostos antes que qualquer sinal clínico seja evidente (ROSER *et al.*, 1989; ROTH *et al.*, 2002).

O ensaio de micronúcleos consiste em um método simples, rápido, sensível, não invasivo e que não requer cultivo celular (ARAÚJO, 2001). Apresenta um baixo custo, sendo usado como biomarcador para detecção de pacientes com risco de desenvolvimento de câncer e também para monitorar a ação de quimioprotetores (CARVALHO *et al.*, 2002). A partir da década de 90, novos testes, tais como o teste de trocas entre cromátides-irmãs e o teste de micronúcleo, foram sendo realizados nos estudos *in vivo* utilizando linfócitos periféricos.

O teste requer no mínimo uma divisão celular para se mostrar sensível à avaliação genotóxica de qualquer substância (ARAÚJO, 2001), pois os micronúcleos são fragmentos de DNA não incorporados ao núcleo na divisão celular que apresentam relação com agentes genotóxicos. Podem ser detectados mediante o uso de diferentes técnicas e a determinação de sua frequência pode demonstrar a ação citogenética de um determinado fator ao qual a célula foi exposta (DIETZ *et al.*, 2000).

A presença destes no citoplasma celular é caracterizada pelo aparecimento de fragmentos acêntricos ou cromátides/cromossomos inteiros que se atrasam na anáfase do ciclo celular, os quais são incorporados dentro de núcleos secundários, representando 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo. A evidenciação dos micronúcleos mede a extensão em que um determinado agente ambiental está associado a dano ao DNA dos tecidos e, de certa forma, indicando um potencial ao desenvolvimento de câncer (DIETZ *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2002).

Araújo (2001) avaliou a genotoxicidade do etil-cianoacrilato quando empregado diretamente sobre a gengiva humana, para fixar o dique de borracha durante o isolamento absoluto em tratamentos endodônticos. A análise baseou-se na observação microscópica realizada em amostras de raspagens das áreas em questão. Foram observadas 2000 células por indivíduo, nos intervalos de 15, 30 e 45 dias após o tratamento endodôntico, período que permite a renovação celular da mucosa oral. A taxa de micronúcleos espontânea em grupos controle em várias espécies de mamíferos está abaixo de 0,5% (SCHMID, 1975), sendo que esse

estudo não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo experimental e o grupo controle.

2.6. MATRIZ EXTRACELULAR

Os componentes da ME participam na manutenção do arcabouço tecidual, influenciando também a dinâmica de adesão celular e, dessa forma, os processos de mobilidade das células, principalmente nos primeiros estágios de diferenciação celular. A ME também possui importante papel na manutenção e regulação da homeostase celular e tecidual. As fibras colágenas e polímeros solúveis funcionam como uma reserva de citocinas, como TGF β e BMP. As citocinas, por sua vez, consistem em um grupo de proteínas glicosiladas, estão envolvidas na sinalização celular, e sua liberação está diretamente relacionada com o processo de reparo (ALBERTS et al., 1994).

Entre os componentes da matriz extracelular, a fibronectina (FNC) e a tenascina (TNC) destacam-se como as duas maiores glicoproteínas (CHIQUET-EHRISMANN, 1990).

Essas glicoproteínas com conhecidas propriedades adesivas têm importância reconhecida nos processos de reparo tecidual (CHIQUET-EHRISMANN, 1990) e na odontogênese (THESLEFF *et al.*, 1987; LESOT *et al.*, 1993). A FNC e a TNC fazem parte das proteínas não-colagênicas e constituem 10% da matriz, enquanto as fibrilares como o colágeno tipo I dominam o restante da matriz. (LINDE, 1989).

2.6.1. Fibronectina (FNC)

FNC é uma glicoproteína da matriz, com atividade multifuncional, associada à regulação de adesão celular, migração e diferenciação durante o desenvolvimento e reparo. É classificada como um dímero de 450 Kd (Kilodaltons), composto por duas extensas subunidades, cada uma com peso molecular de 225 Kd, ligadas por um par de pontes dissulfídicas através de seus terminais carboxílicos (ALBERTS *et al.*, 1994; MOHRI *et al.*, 1996). Possuem múltiplas formas que se originam de *splicings* alternativos de um único mRNA que pode gerar mais de 20 variantes em humanos (KOSMEHL *et al.* 1996). A sua forma solúvel está presente no plasma, cuja maior fonte parece ser os hepatócitos, entretanto células endoteliais e macrófagos podem também contribuir para a sua produção (ALITALO *et al.*, 1980; MOHRI *et al.*, 1996).

As outras formas são todas insolúveis e filamentosas, encontram-se presentes nos tecidos e são sintetizadas principalmente por fibroblastos e células endoteliais (MOHRI *et al.*, 1996).

A FNC tem papel importante na cicatrização de feridas (KOUKOULIS *et al.*, 1991; AUKHIL *et al.*, 1996; WILLEMS *et al.*, 1996; LARJAVA *et al.*, 1993), inicialmente facilitando a agregação plaquetária através de sua deposição no colágeno e/ou fibrina. Também atua na neovascularização, pela estimulação da migração de células endoteliais, servindo como guia para o movimento das células epiteliais através do tecido de granulação e auxiliando no reconhecimento da MB subjacente, de tal forma que a ceratinização normal possa ocorrer (GRINNEL, 1984).

Esta glicoproteína está envolvida em inúmeras funções celulares incluindo adesão e espraiamento celular a outras células ou substrato promovendo, portanto, migração na matriz, organização de microfilamentos no citoplasma influenciando na morfologia celular e diferenciação, assumindo um papel importante no desenvolvimento embrionário (YAMADA & OLDEN, 1978; RUOSLAHTI, 1981; DUFOUR *et al.* 1986; DUBAND *et al.*, 1986; STEELE *et al.*, 1992). Furcht *et al.* (1978) sugeriram que após uma transformação maligna, ocorre diminuição da expressão de fibronectina celular, sendo esta, portanto, responsável pela tumorigênese e capacidade de metástase do tumor.

2.6.2. Tenascina (TNC)

A molécula de TNC constitui-se de um hexâmero, razão pela qual é também conhecida como “hexabrachion”, cujo aspecto assemelha-se às hastes de uma roda (CHIQUET-EHRISMANN, 1990; SAGE & BORNSTEIN, 1991; ALBERTS *et al.*, 1994, CHIQUET-EHRISMANN, 1995). A molécula de TNC é morfológicamente caracterizada por um domínio globular terminal em cada braço, compartilhado com os fibrinogênios, um espesso segmento distal composto por repetidas unidades de FNC III, um fino segmento proximal, constituído por domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico, uma junção T onde os braços unem-se para formar um trímero e um domínio globular central, onde os dois trímeros unem-se para formar uma hexâmero (CHIQUET-EHRISMANN, 1990; CHIQUET-EHRISMANN, 1995).

Como a molécula de FNC, mais da metade de sua molécula é formada por repetidas unidades de FNC III, do que se conclui que essas duas glicoproteínas podem ser não apenas estruturalmente semelhantes, mas funcionalmente também

(CHIQUET-EHRISMANN, 1990).

Como se espera de uma molécula da matriz extracelular, a TNC tem um papel estrutural e pode servir como moduladora da função da célula via interações com seus receptores.

Com base em dados experimentais, várias funções têm sido propostas para a TNC (CHIQUET-EHRISMANN, 1990; SAGE & BORNSTEIN, 1991): inibição de contato célula-célula, promoção de adesão e não espraiamento de células em cultura (SHRESTHA *et al.*, 1996), e atividade antiadesiva, que em conjunto com a atividade adesiva e de espraiamento da FNC permite a movimentação celular, com a manutenção da integridade de seu citoesqueleto, durante a migração (SAGE & BORNSTEIN, 1991; AUKHIL *et al.*, 1996).

2.6.3. Papel dos componentes da ME na odontogênese e no processo de reparo pulpar

TNC e FNC têm sido relacionadas com eventos morfogenéticos, sendo detalhadamente estudadas durante o desenvolvimento dental. A TNC foi abundantemente observada no mesênquima da papila dental no estágio de formação de botão epitelial em ratos (THESLEFF *et al.*, 1987). A FNC é também encontrada na porção mesenquimal do germe dental em desenvolvimento durante a diferenciação odontoblástica. Os autores especularam que a expressão de TNC na MB entre o epitélio do órgão do esmalte e o mesênquima da papila dental, e também na MB do epitélio bucal e no mesênquima de suporte da lâmina dental, poderia estar envolvida com a estimulação da proliferação celular. A pronunciada expressão de TNC pelas células pulpares pode estar envolvida, segundo os autores, com a manutenção da capacidade de diferenciação das mesmas em células formadoras de tecido mineralizado, como a dentina. Porém, as duas glicoproteínas não foram encontradas na matriz dentinária de ratos adultos (TUCKER *et al.*, 1991).

A participação de moléculas adesivas da matriz extracelular também tem sido relacionada ao processo de diferenciação dos odontoblastos. Entretanto, as bases moleculares para os eventos que tomam parte na dentinogênese durante o reparo pulpar não têm sido suficientemente investigadas. As poucas observações e hipóteses correntes têm focalizado o papel das moléculas adesivas e dos fatores de crescimento da dentina circumpulpar (LESOT *et al.*, 1994). Acredita-se que o papel fundamental da FNC, como molécula adesiva, proporcione a interação operacional

das células pulpares com a zona necrótica ou matriz fibrodentinal primitiva (VEIS, 1985).

Martinez *et al.* (2000) identificaram, através de marcação imunoistoquímica, a distribuição de TNC, FNC e colágeno tipo III em polpas humanas. Em polpas hialinizadas e inflamadas com presença de exudato inflamatório, não foram encontradas essas proteínas da matriz extracelular. Em polpas normais verificou-se uma forte marcação para FNC e TNC na periferia do tecido pulpar. Os autores sugeriram que a função da FNC e TNC, localizadas na zona acelular subodontoblástica, seria facilitar a formação de dentina secundária pela migração e diferenciação celular das células de camadas adjacentes.

Em recente trabalho, Martinez (2002) investigou a expressão de componentes da ME (FNC, TNC, Osteonectina, Colágeno tipo I e tipo III) em linhagens celulares de fibroblastos de polpa e de mucosa gengival humana. Os resultados obtidos revelaram que a FNC e o colágeno tipo I estiveram presentes em ambos os tipos celulares, enquanto o colágeno tipo III esteve ausente em ambos os tipos celulares estudados. Entretanto, a TNC e a Osteonectina expressaram-se somente nos fibroblastos pulpares, sugerindo uma provável importância dessas glicoproteínas na mediação da formação de tecidos mineralizados.

Além da participação dos componentes da matriz durante a odontogênese, também há o envolvimento desses durante a resposta de reparo pulpar frente a diferentes injúrias e estímulos locais. Os componentes da matriz dentinária também podem estimular a atividade odontoblástica através do estímulo à formação da dentina reacional (LESOT *et al.*, 1994).

Tziafas *et al.* (1995), estudaram o papel da FNC no processo da dentinogênese pós-desenvolvimento. Nesse estudo, os autores implantaram cimento de hidróxido de cálcio no parênquima pulpar, para avaliar a interação material-célula. Os autores concluíram que a resposta para a indução inespecífica do hidróxido de cálcio parece ser mediada por uma progressiva síntese de FNC pelas células pulpares. Essa interação adesiva, entre FNC e cimento de hidróxido de cálcio é que permite a ligação e a expressão do fenótipo de diferenciação das células, polarização e síntese de um modelo de pré-dentina que irá ser calcificada e formará a barreira dentinária.

Ao avaliar dentes humanos submetidos ao capeamento com hidróxido de cálcio, Yoshida *et al.*, (1996), observaram a localização imunoistoquímica da FNC durante o processo de reparo pulpar. Um dia após o capeamento, precipitações de estruturas cristalinas foram observadas em associação com “debris” celulares entre a zona de necrose superficial e a polpa subjacente. A zona de calcificação distrófica mostrou marcação positiva para a FNC e as células pulpares apareceram estritamente associadas com essa camada, após 7 e 10 dias. Aos 14 dias, células odontoblasto-símiles foram visualizadas em área adjacente à matriz positiva para FNC, havendo a presença de fibras fluorescentes entre essas células. Aos 28 dias, a matriz irregular foi seguida pela formação de dentina tubular em contato com células semelhantes a odontoblastos.

De acordo com os autores, a FNC associada à camada de calcificação inicial, parece ter um papel importante como mediador na diferenciação de células pulpares em odontoblastos, durante o processo de dentinogênese após o capeamento da polpa com HC. Também, a matriz rica em FNC pode servir como um reservatório de fatores de crescimento ou como um substrato para a migração e adesão celular (YOSHIDA *et al.*, 1996).

Piva (2002) estudou a expressão de FNC e TNC durante o reparo pulpar induzido por HC P.A. Observou-se padrão de marcação imunoistoquímica semelhante entre TNC e FNC em toda a polpa, sendo mais proeminente ao redor dos vasos sanguíneos, acompanhando as fibras colágenas e na região da pré-dentina. No sítio da exposição, com 1 dia, observou-se fraca imunorreatividade para TNC, a qual foi aumentando, estando aos 30 dias, mais espessada. Concluiu-se que a FNC esteve envolvida em todos os estágios da formação da dentina reparativa, estimulada pela ação do HC, enquanto que a TNC demonstrou expressão diferenciada na área de exposição, sendo mais evidente nos estágios mais avançados da formação da barreira dentinária.

3. JUSTIFICATIVA

A avaliação biológica de materiais odontológicos é classificada em três níveis de testes pré-clínicos: 1) testes iniciais; 2) testes secundários e 3) testes de uso

(STANLEY, 1992). (American National Standard/American Dental Association —ADA e a International Organization for Standardization /ISO 7405).

Os testes de citotoxicidade *in vitro*, como o de Cultivo Celular, considerado inicial ou de “screening” apesar de suas limitações como a dificuldade de extrapolação dos resultados para estudos da resposta pulpar *in vivo*, dadas as suas diferenças metodológicas, são um importante recurso investigativo a ser utilizado, em função de seu baixo custo, praticidade, rápida performance e minimização dos problemas éticos (SCHMALZ, 1994).

Ademais, o trabalho de dissertação de Silva (2004), a qual avaliou histologicamente a resposta pulpar frente à aplicação de diferentes substâncias hemostáticas (Hipoclorito de sódio a 5,25% e Gluconato de Clorexidina a 2%) empregadas diretamente sobre a polpa exposta, despertou alguns questionamentos que precisam ser elucidados, dando continuidade à linha de pesquisa da coordenadora deste projeto:

- As diferentes concentrações dessas substâncias e o tempo de exposição a estes agentes hemostáticos poderiam ter influência sob o reparo pulpar? Para tentar responder esta pergunta, é pertinente a utilização de metodologia de Cultivo Celular, consideradas as suas vantagens citadas e a inviabilidade de um novo estudo *in vivo*, com *n* amostral necessariamente impraticável.

- Podem estes agentes de hemostasia e limpeza pulpar, nas concentrações utilizadas no estudo de Silva (2004), ser considerados genotóxicos? Para esclarecer esta dúvida um teste também simples, barato, prático e rápido como a Reação de Feulgen para detecção e análise semi-quantitativa de micronúcleos pode ser utilizado.

Por outro lado, mesmo com a obtenção dos resultados dos testes de citotoxicidade e de genotoxicidade, tornam-se fundamentais as investigações sobre a expressão de componentes da matriz extracelular, como as glicoproteínas adesivas TNC e FNC, durante o processo de reparo pulpar, na tentativa de buscar melhor entendimento dos eventos de resposta do tecido pulpar após o capeamento pulpar direto, utilizando diferentes agentes de limpeza e hemostasia, com vistas ao desenvolvimento de novas estratégias de terapia pulpar.

É comprovada a participação da TNC nos processos de reparo e sua expressão associada a FNC durante determinados processos. Também, tem sido

amplamente estudada a participação da FNC durante a diferenciação odontoblástica. Se por um lado, as reações celulares envolvendo o processo de reparo pulpar têm sido investigadas e descritas, a participação da matriz extracelular (ME) e sua interação com as reações celulares têm sido pouco exploradas e compreendidas.

A FNC e a TNC são importantes para o estímulo e mobilidade celular durante a diferenciação de células odontoblastóides a partir de células multipotentes da polpa. Desta forma, é de grande importância o conhecimento dos fatores biológicos e moleculares responsáveis pelo sucesso da terapia pulpar vital realizada com diferentes materiais.

Explorando as diferenças e semelhanças na bioestimulação celular, através de uma avaliação temporo-espacial, será possível obter bases científicas para a obtenção de biomateriais que atuem com o máximo de estimulação com o mínimo de perda de tecido.

4. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é avaliar a biocompatibilidade do hipoclorito de sódio e do gluconato de clorexidina em diferentes concentrações, através de estudo in vitro de Cultivo Celular; a genotoxicidade dessas duas soluções, respectivamente a 5,25% e a 2%, utilizando a técnica de Feulgen para detecção e análise de micronúcleos e a expressão de componentes da matriz extracelular (Fibronectina e Tenascina), através do estudo imunoistoquímico da estreptoavidina-biotina, em polpas humanas expostas, tratadas com os agentes hemostáticos hipoclorito de sódio a 5,25% e gluconato de clorexidina a 2%, empregados *previamente ao capeamento pulpar direto*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Delineamento das amostras e aspectos éticos

Este projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, sob registro CEP nº 08/05, tendo sido o mesmo aprovado pela referida comissão, conforme documento nº 01/05, em anexo (anexo A).

5.1.1. Estudo in vitro: Teste de Citotoxicidade – Linhagem celular e Materiais testados

Para os testes de citotoxicidade será utilizada a linhagem celular NIH/3T3 (fibroblastos de rato), proveniente do laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Décio Pinto Jr. Os testes de citotoxicidade serão realizadas em capela de fluxo laminar, no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Biologia (IB)/UFPEL e do Curso de Doutorado em Odontologia/UFPEL. A maioria dos equipamentos e materiais de consumo, necessários para a realização do referido teste, encontram-se disponíveis no laboratório acima citado, exceto algumas soluções, as quais estão listadas no item orçamento. Os fibroblastos NIH/3T3 serão cultivados utilizando o meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), o qual será acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab Ltda, Campinas, SP, Brasil) e 1% de solução antibiótica (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)

Serão testadas as soluções de hipoclorito de sódio a 0,5%, 1%, 2,5% e 5,25% e de gluconato de clorexidina a 0,12%, 0,2%, 1% e 2%, constituindo os grupos conforme tabela 1, mostrada abaixo. A solução salina 0,9% funcionará como controle negativo dos testes. Os tempos de exposição das drogas testadas serão de 30, 60 e 120 minutos (COSTA *et al.*, 2001).

Tabela 1 – Descrição das soluções testadas e controle negativo e dos tempos de exposição das mesmas.

Tempo Exposição	Grupo I (30 minutos)	Grupo II (60 minutos)	Grupo III (120 minutos)
Concentração Soluções			
Hipoclorito de sódio a 0,5%	GI a- Hipo	GII a- Hipo	GIII a- Hipo
Hipoclorito de sódio a 1%	GI b- Hipo	GII b- Hipo	GIII b- Hipo
Hipoclorito de sódio a 2,5%	GI c- Hipo	GII c- Hipo	GIII c- Hipo
Hipoclorito de sódio a 5,25%	GI d- Hipo	GII d- Hipo	GIII d- Hipo
Gluconato de Clorexidina a 0,12%	GI a — Clor	GII a — Clor	GIII a — Clor
Gluconato de Clorexidina a 0,2%	GI b — Clor	GII b — Clor	GIII b — Clor
Gluconato de Clorexidina a 1%	GI c — Clor	GII c — Clor	GIII c — Clor
Gluconato de Clorexidina a 2%	GI d — Clor	GII d — Clor	GIII d — Clor
Solução Salina a 0,9%	GI — SF	GII — SF	GIII — SF

• Solução de Hipoclorito de sódio – Farmácia de Manipulação *Uso Indicado*®

* Solução de Gluconato de Clorexidina — Farmácia de Manipulação *Uso Indicado*®

□ Soro Fisiológico – *Áster Produtos Médicos*®

5.1.2. Estudo in vivo: Teste de Genotoxicidade e Teste Imunoistoquímico:

O presente trabalho utilizará, para os estudos de genotoxicidade e imunoistoquímico as amostras já emblocadas do estudo de Silva (2004), que realizou avaliação histológica do capeamento pulpar em humanos, caracterizado como um teste de nível 3, de acordo com a American National Standard/American Dental Association (ADA) e a International Organization for Standardization (nº 7405). Tal estudo será orientado pela coordenadora e responsável pelo presente projeto.

O trabalho de Silva (2004), por se tratar de uma pesquisa “in vivo” e em humanos, foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, sob registro CEP nº 049/2002, tendo sido o mesmo considerado Aprovado pela referida comissão, conforme documento nº 048/2002, em anexo (anexo B e C).

Para os testes de genotoxicidade e imunoistoquímico, serão utilizados os espécimens referentes aos 45 terceiros molares hígidos indicados para extração,

provenientes de alunos de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas- FOUFPel, com faixa etária média de 23 anos (SILVA, 2004) (Figura 1). Tais testes serão realizados no Laboratório de Anatomia Patológica do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB), contando com os equipamentos e materiais de consumo do mesmo.

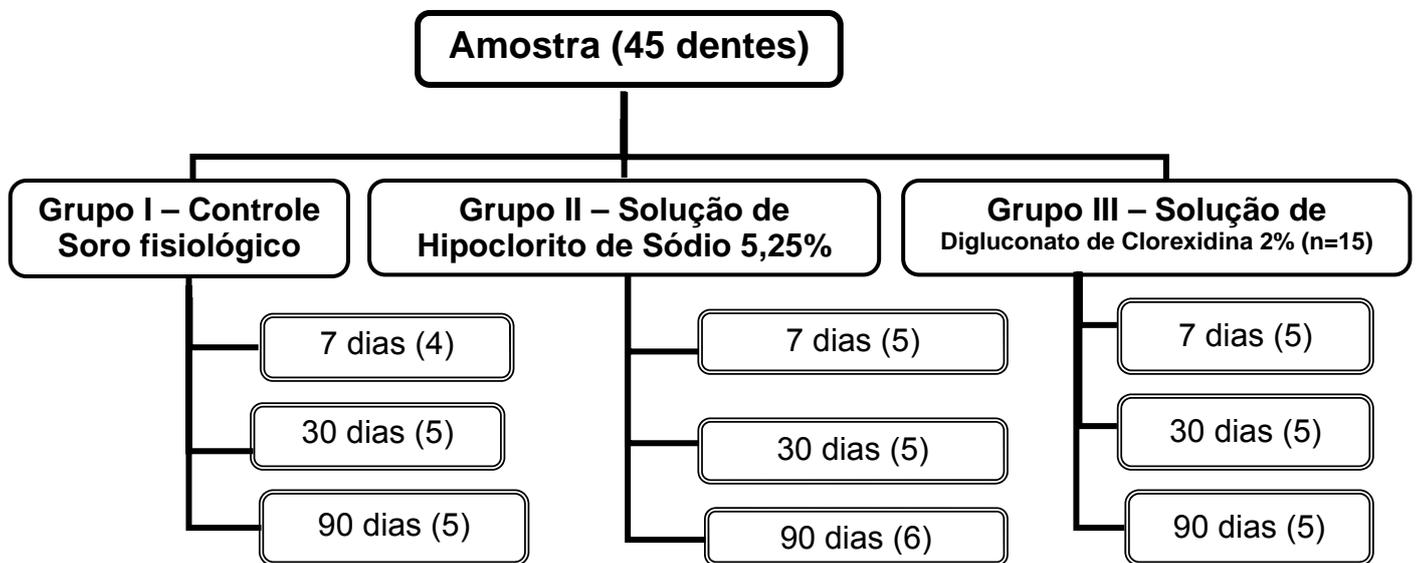


Figura 1 (organograma) – Demonstrando o delineamento da amostra para os estudos de genotoxicidade e imunoistoquímico.

5.2. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro* (Cultivo Celular) do Hipoclorito de Sódio e do Gluconato de Clorexidina em diferentes concentrações

5.2.1. *Cultivo Celular*

As células NIH/3T3, serão cultivadas em frascos de 50ml, em meio DMEM, conforme anteriormente descrito, mantidas em estufa a 37°C, contendo 95% de ar e 5% de CO₂. Os sub-cultivos serão realizados quando as células atingiram a sub-confluência. O meio do frasco será então aspirado e a monocamada celular lavada com uma solução tampão fosfato-salina (PBS), com Ph 7,2. A seguir as células serão separadas com 5 ml de solução de tripsina 0,25% (Sigma), durante 5 minutos a 37°C. A tripsina será inativada com 5 ml de meio de cultura contendo soro fetal bovino. As células em suspensão serão transferidas para um tubo de ensaio e centrifugadas a 200g durante 5 minutos, à temperatura ambiente. O precipitado celular será ressuspense em 1 ml de meio fresco, sendo então as células replaqueadas em novos frascos de cultivo. Com vistas a preservar a vitalidade celular, a troca de meios de cultivo dos frascos será realizada a cada dois dias (RUANO et al, 1996).

5.2.2. *Ensaio de Citotoxicidade / Avaliação da Atividade Metabólica Celular pelo ensaio do MTT (methyltetrazolium)*

Para o ensaio de citotoxicidade do MTT serão utilizadas células em crescimento exponencial, as quais serão expostas às diferentes diluições das drogas testadas e à solução-controle. Utilizando uma placa de 24 poços, serão plaqueadas 30 x 10³ células/ml, as quais estarão suspensas em 1 ml de meio de crescimento. Após incubação em atmosfera umidificada e a 37°C por 1 a 3 dias, período em que as células estarão em fase de crescimento exponencial, poderá então o teste ser realizado. Para tal as células 3T3 serão contadas com o auxílio de um hematocítmetro em microscópio de luz invertido.

Posteriormente, em cada poço serão colocados 980 µl de meio novo, acrescido de 20 µl de solução experimental, sendo expostas as NIH/3T3 nos períodos de 30, 60 e 120 minutos. Em cada placa serão testadas as concentrações a, b, c e d do hipoclorito de sódio de cada grupo (GI GII e GIII, relativos aos tempos de exposição), além da solução-controle (20 µl de solução salina). Haverá na

mesma placa outro controle, contendo apenas células e meio de cultivo, com quatro repetições para cada solução. A coluna 1 será o controle negativo contendo apenas meio e células, as colunas 2 a 5 serão referentes às diluições das soluções testadas e a coluna 6 a da solução-controle (salina). Para cada tempo de exposição e solução testada serão realizados testes em triplicatas. Assim sendo, procedimento similar será executado para a solução de gluconato de clorexidina.

Após os períodos de exposição, as soluções experimentais e controle serão substituídas por meio sem aditivos, por um período adicional de 4 horas, quando será realizada nova contagem celular como a anteriormente descrita. Após 2 a 3 passagens, alimentando sempre as placas com DMEM acrescido de soro fetal bovino, será acrescentada a solução de MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2y1-]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), para avaliação da atividade da enzima desidrogenase succínica mitocondrial, em todos os poços das placas e o ensaio procedido conforme descrito previamente (FRESHNEY, 1994), consistindo em 1 mg/ml de succinato de sódio tamponado (Sigma, St. Louis, MO), incubada a 37°C por 45 min. Durante este tempo, a mitocôndria ativa converterá a solução amarela e solúvel do MTT em cristais de MTT-formazan insolúveis. As células serão fixadas em solução de formalina tamponada em TRIS (4%, Ph 7,2) e lavadas em água. Finalmente, o MTT-formazan será dissolvido em dimetilsulfóxido (Sigma) e a densidade ótica da solução resultante será lida a 562 nm, utilizando um leitor de placa (Vmax; Molecular Devices, Mento Park, Califórnia).

Este ensaio foi escolhido porque estudos prévios (Costa *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003) têm mostrado ser o mesmo apropriado para a avaliação da viabilidade ou citotoxicidade celulares, frente aos materiais de uso odontológico.

5.3. Reação de Feulgen para detecção de Micronúcleos e Análise Semi-quantitativa dos Micronúcleos

O protocolo de processamento das lâminas seguirá a ordem descrita: de cada bloco de parafina serão obtidos cortes de 5 µm, os quais serão estendidos em lâminas de vidro previamente lavadas em álcool absoluto e secas.

Posteriormente os cortes serão submetidos a diafanização, sendo desparafinados em dois banhos de xilol: o primeiro a 60° C por 30 minutos, e o

segundo a temperatura ambiente (TA) por 20 minutos. A seguir, serão reidratados em série decrescente de etanóis, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95%, 85% e 80%, durante 5 minutos cada.

Após, será efetuada a oxidação em solução de ácido clorídrico 1N a temperatura ambiente durante 1 minuto. As lâminas serão escorridas e colocadas em ácido clorídrico por 12 min em estufa (acima de 63°C), deixando esfriar posteriormente à temperatura ambiente durante 10 minutos. A seguir serão novamente imersas em HCl por 5 min. Em seguida será realizada a lavagem das lâminas em água destilada (três passagens de 5 minutos cada). Após será feita a secagem das mesmas à temperatura ambiente.

Proceder-se-á a realização da coloração com reagente de Schiff por 2 horas e trinta minutos à temperatura ambiente, em ambiente escuro. A seguir, o reagente será removido e as lâminas serão cobertas por água destilada tamponada por 4 minutos. Após será feita a lavagem em água destilada e a secagem. Vinte e quatro horas depois as lâminas serão imersas no corante fast-green por 10 segundos sendo então lavadas em álcool (3 frascos diferentes e 10 segundos cada)

Na seqüência, os cortes sofrerão desidratação em cadeia ascendente de etanol, diafanizados em dois banhos de xilol e serão montados em resina Permout (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA), para exame ao microscópio de luz.

As amostras serão analisadas ao microscópio óptico para a determinação da proporção de micronúcleos encontrados no citoplasma celular mediante a contagem visual de micronúcleos em 1000 células por campo, utilizando microscopia de luz e aumento de 1000x, bem como retículo de contagem.

Os critérios adotados para caracterizar a formação de um micronúcleo serão os seguintes: (a) deve ter um contorno regular, redondo ou oval e estar dentro do citoplasma da célula; (b) apresentar coloração semelhante ao núcleo principal; (c) seu diâmetro deve ser menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal; (d) deve estar no mesmo plano de foco do principal; (e) deverá estar separado ou marginalmente justaposto ao núcleo principal, de modo que haja identificação clara do limite nuclear de ambos (PICKER E FOX, 1986; FENECH et al., 1999).

5.4. Técnica imunoistoquímica e Análise do Perfil Imunoistoquímico

Os espécimens emblocados em parafina serão submetidos a cortes de 5 μ m e estendidos em lâminas de vidro, previamente limpas, desengorduradas e preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma, St. Louis, USA).

Os cortes inicialmente serão desparafinizados em 2 banhos de xilol, o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente, por 20 minutos. A seguir, os cortes serão reidratados em cadeia descendente de etanol, a partir de 3 passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95%, 85% e 80%, durante 5 minutos cada. Posteriormente, se realizará a retirada do pigmento formólico, e as secções serão submetidas à solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol a 95%, durante 10 minutos. Em seguida, os cortes serão lavados em água corrente por 10 minutos e em duas passagens de água destilada.

As secções teciduais serão submetidas, a seguir, aos tratamentos para recuperação antigênica. Para os cortes histológicos que receberam os dois anticorpos primários, anti-fibronectina e anti-tenascina, o tratamento prévio será a pepsinização. Essa etapa consistirá na imersão das amostras histológicas em uma solução composta de 1g de pepsina (Ph 1,8), 10 ml de HCl 1N e 90 ml de água destilada, durante 60 minutos, à temperatura de 37°C. Porém, para a anti-tenascina será usada a pepsina a 0,5%, com o tempo de incubação de 30 minutos.

Na seqüência, o próximo procedimento será o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, com a incubação em peróxido de hidrogênio a 6% + metanol (1:1, v/v), em duas trocas de 5 minutos. Após esses passos, todos os procedimentos a seguir serão sempre precedidos de lavagens em solução tampão de TRIS, Ph 7,4 (Sigma, St. Louis, USA).

Os anticorpos primários serão diluídos em solução tampão TRIS-HCl, Ph 7,4, contendo albumina bovina a 1%, acrescida de azida sódica, com o objetivo de reduzir a coloração inespecífica de fundo. Realizar-se-á, em seguida, a incubação das amostras histológicas com os anti-soros, por 120 minutos à temperatura ambiente para os anticorpos antifibronectina e por 18h a 4°C, para o anticorpo antitenascina. As diluições, especificidades, fontes, tratamentos prévios e tempos de incubação de cada anticorpo utilizado estão relacionados na Tabela 2.

TABELA 2 — Soros primários — suas especificidades, diluições, fontes e tratamentos prévios

Ac. CLONE	ESPECIFICIDADE	DIL.	FONTE	TRATAMENTO PRÉVIO	INC.
APA	Fibronectina	1:1200	Dako*	Pepsina 1%, 37°C, 60'	120', 37°C
BC-24	Tenascina	1:3000	Sigma**	Pepsina 0,5%, 37°C, 30'	18h, 4°C

10. Dako, AIS, Glostrup, Denmark

** Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

Após duas lavagens em solução tampão de TRIS, se fará a incubação dos cortes com o anticorpo secundário biotilado polivalente, cabra anti-coelho/camundongo, à temperatura ambiente e na diluição de 1/100 (Dakopatts), por 30 minutos. Em seguida, será efetuada a adição do complexo streptoavidina-biotina (Dako, AIS, Glostrup, Denmark), na diluição de 1/100 por 30 minutos. Tanto o anticorpo secundário, quanto o terciário, serão diluídos em solução tampão de TRIS-HCl, Ph 7,4.

A reação será revelada pela utilização de solução cromógena, contendo 30 mg de diamino-benzidina (3,3' — diamino-benzidina, Sigma, St. Louis, USA), diluída em 100 ml de TRIS, acrescida de 0,6 ml de água oxigenada a 6%, num período de 3 minutos.

Posteriormente, os cortes serão lavados em água corrente por 10 minutos, passados duas vezes em água destilada, sendo em seguida contra-corados com Hematoxilina de Mayer por 10 minutos. Após nova lavagem, seguirão-se os passos de desidratação, diafanização e montagem das lâminas em Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

A análise descritiva do padrão de marcação imunoistoquímica, identificação e a distribuição dos antígenos fibronectina e tenascina será realizada através da microscopia óptica. Os achados serão anotados individualmente por dois observadores. Posteriormente à leitura de cada uma das lâminas, será estabelecido o padrão de marcação para cada antígeno pesquisado, bem como a localização nos tecidos dentários estudados, nos diferentes tempos de observação. As informações serão agrupadas para descrição dos resultados.

5.5. Análise Estatística

Os dados obtidos do teste de citotoxicidade do ensaio do MTT e do teste de genotoxicidade serão submetidos à análise estatística, através da Análise de Variância (ANOVA), complementada pelo Teste Exato de Fisher, para que sejam feitas as comparações entre os grupos experimentais e controle, com nível de confiança de 95%.

6. RESULTADOS ESPERADOS

Das três metodologias que serão empregadas no presente estudo, pode-se esperar os seguintes resultados:

Avaliação da Citotoxicidade in vitro (Cultivo Celular) do Hipoclorito de Sódio e do Gluconato de Clorexidina em diferentes concentrações:

1. As soluções mais diluídas de Hipoclorito de sódio e Gluconato de Clorexidina possivelmente apresentem-se menos citotóxicas, sendo este fator dependente ainda do tempo de exposição às substâncias experimentais.

Estudo in vivo da Genotoxicidade das soluções de Hipoclorito de sódio a 5,25% e Gluconato Clorexidina a 2%, através da Reação de Feulgen para detecção de Micronúcleos e Análise Semi-quantitativa dos Micronúcleos:

1. Possivelmente as substâncias testadas apresentarão números de micronúcleos semelhantes aos da solução salina a 0,9%, utilizada como controle, nos diferentes tempos de avaliação estudados, não sendo consideradas genotóxicas

Estudo in vivo — Avaliação da resposta pulpar através da Análise do Perfil Imunoistoquímico das soluções de Hipoclorito de sódio a 5,25% e Gluconato Clorexidina a 2%:

1. A expressão dos componentes da matriz extracelular auxiliará na avaliação da biocompatibilidade dos diferentes agentes hemostáticos aplicados sobre a polpa.

2. As glicoproteínas da ME, TNC e FNC participam do estágio de formação da barreira mineralizada. Pressupõe-se que a FNC aparecerá mais cedo nos espécimes onde ocorrerá a polarização de células odontoblastóides e formação de dentina reparativa com aspecto tubular.
3. Nos casos de presença de infiltrado inflamatório mononuclear associado ao tempo mais precoce de avaliação, provavelmente ocorrerá uma ausência de marcação para TNC, e uma marcação ausente ou fraca para FNC, de acordo com o estudo de Piva (2002).
4. Nos intervalos de tempo mais tardios deverão ser observados padrões mais pronunciados de expressão de TNC, independente da solução hemostática analisada.
5. Possíveis correlações poderão ser feitas com o estudo morfológico descritivo de Silva (2004).

7. POSSIBILIDADE DE ESTUDOS ADICIONAIS

Paralelo aos objetivos propostos, serão elaborados artigos baseados na revista da literatura sobre os dois agentes hemostáticos estudados e sobre seus empregos fundamentados na concepção da terapia pulpar conservadora. As informações coletadas possibilitarão ainda elaboração de projetos complementares, com afinidade à proposta principal desse estudo.

O *design* metodológico proposto proporcionará possíveis estudos adicionais.

A partir da avaliação da citotoxicidade das soluções hemostáticas estudadas nas diferentes concentrações testadas poderá surgir a necessidade de analisar outras diluições e tempos de exposição, bem como outras substâncias de efeito similar sobre a polpa. Tal metodologia, por ser rápida, de fácil execução e adequar-se aos princípios éticos da análise de materiais odontológicos, pode ser prontamente realizada. Soma-se a estes fatos a facilidade de acesso atualmente verificada ao Laboratório de Cultivo Celular, o qual foi montado através da parceria do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do IB/UFPel, com o Curso de Doutorado em Odontologia da mesma Instituição.

Além da obtenção de lâminas para análise histopatológica, e análise imuno-histoquímica, poderá ser investigada a expressão de outros componentes da matriz extracelular como; Colágeno tipo I e tipo III, Osteonectina, BMP (proteína

morfogenética óssea), TGF-B (família de fatores modificadores de crescimento) entre outros componentes da ME, provavelmente relacionados com a resposta de reparo pulpar. O estágio de conhecimento atual fornece evidências do papel de várias moléculas bioativas, na regulação de eventos de diferenciação celular, durante a odontogênese e dentinogênese reparativa. Desse modo, uma mudança espaço-temporal de membros da superfamília dos fatores modificadores de crescimento beta (TGF- β) e seus receptores regulariam a diferenciação de células pulpares (TOYONO *et al.*, 1997).

A interpretação desses resultados proporcionará informações científicas relevantes para uma nova abordagem da terapia pulpar vital, baseada nos mecanismos de sinalização celular e demais eventos moleculares responsáveis pela estimulação celular, diferenciação e atividade de dentinogênese reparativa.

8. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA

Tempo total estimado para realização do projeto: 18 meses

ANO	1° SEMESTRE	2° SEMESTRE
2005	<ul style="list-style-type: none"> - Elaboração do plano de trabalho e levantamento bibliográfico. - Encaminhamento do projeto à Comissão de Ética em Pesquisa da FO/UFPel. - Divulgação do projeto na comunidade acadêmica. - Compra dos materiais de consumo solicitados. - Realização do piloto do projeto e ajuste das metodologias empregadas. - Padronização da Técnica Imunoistoquímica para estudo dos componentes da Matriz Extracelular, utilizando as amostras emblocadas provenientes do estudo de Silva, e início das reações do teste imunoistoquímico . 	<ul style="list-style-type: none"> - Início e término da análise descritiva dos resultados do teste imunoistoquímico. - Redação do artigo científico e envio para publicação em periódico Qualis A Internacional. - Início e conclusão dos ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i> do Hipoclorito de Sódio e do Gluconato de Clorexidina em diferentes concentrações (Cultivo Celular).
2006	<ul style="list-style-type: none"> - Redação de artigo científico do teste de citotoxicidade e envio para publicação. - Início e conclusão das atividades laboratoriais relativas aos testes de genotoxicidade pela Reação de Feulgen . <li style="padding-left: 20px;">- Calibragem dos examinadores e realização da Análise Semi-quantitativa dos Micronúcleos. -Redação de artigo científico , com envio para publicação. - Defesa da Tese 	

9 . ORÇAMENTO

Para a realização dos testes de genotoxicidade e imunistoquímico, executados no Laboratório de Anatomia Patológica do CDDB, serão utilizados equipamentos e materiais de consumo do mesmo.

A maioria dos equipamentos e materiais de consumo, necessários para a realização do teste de citotoxicidade, encontram-se disponíveis no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Fisiologia Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (IB)/UFPel e do Curso de Doutorado em Odontologia/UFPel , porém, algumas soluções, listadas abaixo, serão adquiridas com recursos próprios:

<i>Solução</i>	<i>Valor- R\$</i>
500 mg de MTT (methylnitrosotetrazolium)	273,00
50g de Hipoclorito de sódio a 0,5%	4,00
50g de Hipoclorito de sódio a 1%	4,00
50g de Hipoclorito de sódio a 2,5%	4,00
50g de Hipoclorito de sódio a 5,25%	4,00
50g gluconato de clorexidina 0,12%	4,00
50g gluconato de clorexidina 0,2%	4,00
50g gluconato de clorexidina 1%	4,00
50g gluconato de clorexidina 2%	4,00
TOTAL	305,00

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSON, D.R. Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J Pathol*, v. 149, n. 4, p. 257-78. Aug. 1986.

ACCORINTE, MLR. **Avaliação da biocompatibilidade do hidróxido de cálcio, de agentes hemostáticos e de componentes de um sistema adesivo como capeadores direto sem polpas humanas** (Tese – Doutorado) São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de São Paulo, 2000.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, Inc. 1994. 1294p.

ALITALO, K., HOVI, T., VAHERI, A. Fibronectin is produced by human macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 151, v. 3, p. 602-613, 1980.

ARAÚJO, G.G. Avaliação da genotoxicidade do etil-cianoacrilato quando usado junto ao isolamento absoluto, através do teste de micronúcleo, (um estudo “in vivo”). **Dissertação de Mestrado, Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 2001, pp 119.**

AUKHIL, I., SAHLBERG, C., THESLEFF, I. Basal layer of epithelium expresses tenascin Mrna during healing of incisional skin wounds. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 105-112, 1996

AYHAN, H; SULTAN, N; CIRAK, M; RUHI, MZ; BODUR, H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. **Int Endod J**, v. 32, n. 2, p. 99-102, 1999.

BECKER, J.; SCHUPPPAN, D.; HAHN, E. G.; ALLBERT, G.; REICHART, P. The immunohistochemical distribution of collagens type IV, V, VI and of laminin in the human oral mucosa. **Arch Oral Biol.** , v.31, n.3, p. 179-86. 1986.

BOWDEN, G; EDWARDSSON, S. Ecologia Oral e a Cárie dentária. In: **Cariologia Clínica**. 2ª ed. São Paulo: Santos, 1995:45-70.

BRISENO, BM; WIRTH, R; HAMM, G; STANDHARTINGER, W. Efficacy of different irrigation methods and concentrations of root canal irrigation solutions on bacteria in the root canal. **Endod Dent Traumatol** , v. 8, n. 1, p. 6-11, 1992.

CARVALHO, M.B.; RAMIREZ, A.; GATTÁS, G.J.F.; GUEDES, A.L.; AMAR, A.; RAPAPORT, A.; BARAUNA NETO, J.C., CURIONI, O.A . Correlação entre a evolução clínica e a frequência de micronúcleos em células de pacientes portadores de carcinomas orais e da orofaringe. **Rev Assoc Med Bras**, v. 48, n. 4, p. 317-22, 2002.

CEHRELI, ZC; TURGUT, M; OLMEZ, S; DAGDEVIREN, A; ATILLA, P. Short term human primary pulpal response after direct pulp capping with fourth-generation dentin adhesives. **J Clin Pediatr Dent** , v. 25, n. 1, p. 65-71,2000.

CHANG, YC; HUANG, FM; TAI, KW; CHOU, MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod** , v. 92, n. 4, p. 446-450,2001.

CHIQUET-EHRISMANN, R. What distinguishes tenascin from fibronectin? **The FASEB Journal**, v. 4, n.9, p. 2598-2604, 1990.

CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. **Experientia Basel**, v. 51, n. 9-10, p. 853-862, 1995.

COSTA, CA; EDWARDS, CA; HANKS, CT. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. **American Journal Dentistry**, v.14, p.25-30, 2001.

COSTA, CA; HEBBLING, J; HANKS, CT. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. **Dental Materials**, v. 16, p.188-197, 2000.

COSTA, CA; TEIXEIRA, HM; DO NASCIMENTO, AB; HEBBLING, J. Biocompatibility of an adhesive system and 2-hydroxyethylmethacrylate. **ASDC Journal Dental Children**, v. 66, p. 337-42, 1999.

COX, CF; HAFEZ, AA; AKIMOTO, N; OTSUKI, M; MILLS, JC. Biological basis for clinical success: Pulp protection and the tooth-restoration interface. **Pract Periodontics Aesthetic Dent**, v. 11, n.7, p. 819-26, Sep,1999.

COX, CF; HAFEZ, AA; AKIMOTO, N; OTSUKI, M; SUZUKI, M; TARIM, B. Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. **Am J Dent**, v. 11 Spec No: S, p. 55-63. Jan, 1998.

COX, CF; SUBAY, RK; OSTRO, E; SUZUKI, S. Tunnel defects in dentin bridges: Their formation following direct pulp capping. **Operative Dentistry**, v. 21, p. 4-11, 1996.

D'ARCANGELO, C; DI NARDO DI MAIO, F; VARVARA, G. Alpha-hemolytic streptococci and root canal irrigants. An evaluation of the bactericidal efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine

gluconate plus cetrimide. **Minerva Stomatol** , v. 47, n. 9, p. 367-371, 1998.

DAVIES, G. E et al. Laboratory investigation of a new anti-bacterial agent of a high potency. *British J Pharmacol* , v. 2, n. 9, p. 192-196, 1954.

DEMARCO, FF; TARQUINIO, SB; JAEGER, MM; DE ARAUJO, VC; MATSON E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. **Quintessence International**, v. 32, p. 211-20, 2001.

DIETZ, J.; DIEHL, A.S.; PROLLA, J.C.; FURTADO, C.D.; FURTADO, A.D. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago, **Ver Ass in Brasil**, v. 46, n. 3, p. 207-11, 2000.

DIP, EC; MIRANDA, RC; LOPES, HP; SIQUEIRA JR, JF. Hipoclorito de sódio: influência da alcalinidade cáustica na dissolução do tecido pulpar. **APCD** , v. 56, n. 5. 2002.

ELIAS, RV; DEMARCO, FF; TARQUINIO, SBC; PIVA, E. Pulp response to the application of a self-etching adhesive in human pulps, using sodium hypochlorite to control bleeding. **Quintessence Int** , 2004; In press.

ESTRELA, C; ESTRELA, CRA; BARBIN, EL; SPANÓ, JC; MARCHESAN, MA; PÉCORÁ, JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. **Braz Dent J**, v. 13, n. 2, p. 113-117, 2002.

ESTRELA, C; RIBEIRO, RG; ESTRELA, CRA; PÉCORÁ, JD; SOUSA-NETO, MD. Antimicrobial effect of 2% Sodium Hypochlorite and 2 % Chlorhexidine tested by different methods. **Braz Dent J** , v.14, n. 1, p. 58-62, 2003.

FEI, AL; UDIN, RD; JOHNSON, R. A clinical study of ferric sulfate as a pulpotomy agente in primary teeth. **Pediatr Dent** , v. 13, n. 6, p. 327-332,1991.

FENECH, M et al. The human micronucleus project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, v. 428, n. 2, p. 271-283, 1999.

FERRAZ, CCR; GOMES, BPFA; ZAIA, AA; TEIXEIRA, FB; SOUZA-FILHO, FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and teeth mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **J Endod**, Chicago, v. 27, n. 7, p. 452-455, 2001.

FITZGERALD, M; HEYS, RJ. A clinical and histological evaluation of conservative pulpal therapy in human teeth. **Operative Dentistry**, v.16, p. 101-112, 1991.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animals cells. A manual of basic technique**. 4 ed. New York: Wiley-liss, Inc. 1994. 577p.

GOMES, BPFA; FERRAZ, CCR; VIANNA, ME; BERBER, VB; TEIXEIRA, FB; SOUZA-FILHO, FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and Chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **Inter Endod J** , v. 34, n. 6, p. 424-428, 2001.

GRINNELL, F. Fibronectin and wound healing. *Journal of Cellular Biochemistry*, New York, v. 26, n. 2, p.107-116. 1984.

HAFEZ, AA; COX, CF; TARIM, B; OTSUKI, M; AKIMOTO, N. An in vivo evaluation of hemorrhage control using sodium hypochlorite and direct capping with a one-or two-component adhesive system in exposed nonhuman primate pulps. **Quintessence Int** , v. 33, n. 4, p. 261-272, 2002.

HEBLING, J; GIRO, E; COSTA, C. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. **J Endod**, v. 25, n.10, p. 676-82, Oct, 1999.

HELING, I; ROTSTEIN, I; DINUR, T; SZWEC-LEVINE, Y; STEINBERG, D. Bactericidal and cytotoxic

effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions *in vitro*. **J Endod** , v. 27, n. 4, p. 278-280, 2001.

HERNANDEZ, EP; BOTERO, TM; MANTELLINI, MG; MCDONALD, NJ; NOR, JE. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages *in vitro*. **Int Endod J** . v. 38, p. 137-143, 2005.

HIDALGO, E; DOMINGUEZ.C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. **Toxicology inVitro** . v. 15, p. 271-276, 2001.

HOLLAND, R; SOUZA, V; MELLO, W; NERY, MJ; BERNABÉ, PFE. Influência dos fragmentos de dentina no resultado do tratamento conservador da polpa dental exposta ou inflamada. **Rev Gaucha Odont**, v. 26, n. 2, p. 98-102, 1978.

HORSTED, P; EL ATTAR, K; LANGELAND, K. Capping of monkey pulps with Dycal and a Ca-eugenol cement. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 52, n. 5, p. 531-553, 1981.

HORSTED, P; VILKINIS, V; SIDLAUKAS, A. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system our with calcium hydroxide cement. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** , v. 96, n. 5, p. 591-600, 2003.

IMANISHI, K; MATSUO, T; NAKAHASHI, Y; SAMEJIMA, Y; EBISU, S; OKADA, H. Clinical findings in relation to the success rate of direct pulp capping. **Jpn J Conserv Dent** , v. 32, p. 1745-1750, 1989.

ISO 7405 Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry; test methods for dental materials. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization; 1997.

JENKINS, S; ADDY, M; WADE, W. The mechanism of action of Chlorhexidine. **J Clin Peiodontol** , v. 15, n. 7, p. 415-424, 1988.

JORGE, A. O. C. **Princípios de biossegurança em odontologia**. Apostila. Taubaté, 1998. 39 p.

KAKEHASHI, S; STANLEY, HR; FITZGERALD, RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** , v. 20, n. 3, p. 340-349, 1965.

KATOH, M; KIDOKORO, S; KUROSU, K. A study on the amputation of pulp using sodium hypochlorite (NaOCl). **Jpn J Pediat Dent** , v. 16, p. 107-116, 1978.

KIBA, H; HAYAKAWA, T; NAKANUMA, K; YAMAZAKI, M; YAMAMOTO, HJ. Pulpal reactions to two experimental bonding systems for pulp capping procedures. **J Oral Sci** , v. 42, n. 2, p. 69-74, 2000.

KITASAKO, Y; INOKISHI, S; FUJITANI, M; OTSUKI, M; TAGAMI, J. Short-tem reaction of exposed monkey pulp beneath adhesive resins. **Oper Dent**, v. 23, n. 6, p. 308-317, Nov/Dec, 1998.

KITASAKO, Y; INOKISHI, S; TAGAMI, J. Effect of direct resin pulp capping techniques on short-term response of mechanically exposed pulps. **Jornal of dentistry**, v. 27, p. 257-263, 1999.

KITASAKO, Y; INOKOSHI, S; TAGAMI, J. Effects of direct resin pulp capping techniques on short-term response of mechanically exposed pulps. **J Dent** , v. 27, n. 4, p. 257-263, 1999.

KITASAKO, Y; MURRAY, PE; TAGAMI, J; SMITH, AJ. Histomorphometric analysis of dentinal bridge formation and pulpal inflammation. **Quintessence Int**, v. 33, n. 8, p. 600-608, 2002.

KOMOROWSKI, R; GRAD, H; WU, XY; FRIEDMAN, S. Antimicrobial Substantivity of Chlorhexidine-treated bovine root dentin. **J Endod** , v. 26, n. 6, p. 315-317, 2000.

KOSMEHL H.; BERNDT A.; KATENKAMP D. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological □ingival□e and histopathological aspects. **Virchows Arch** . , v..429, p..311-322, 1996.

KOUKOLIS, G. K., GOULD, V. E., BHATTACHARYYA, A., GOULD, J. E., HOWEEDY, A. A. VIRTANEN, I. Tenascin in normal, reactive, hyperplastic and neoplastic tissues: biological and pathologic implications. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 22, n. 7 p. 636-643, 1991.

LARJAVA, H., SALO, T., HAAPASALMI, K., KRAMER, R. H., HEINO, J. Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. **The Journal of Clinical Investigation**. Ann Arbor, v. 92, n. 3, p. 1425-1435, 1993.

LASCALA, NT; MOUSSALLI, NH. Higienização Bucal. In: **Compêndio terapêutico periodontal**. 3ª ed. São Paulo: Artes médicas, 1999:240-72.

LEONARDO, MR; TANOMARU FILHO, M; SILVA, LAB; NELSON FILHO, N; BONIFÁCIO, KC; ITO, IY. In vivo antimicrobial activity of 2% Chlorhexidine used as a root canal irrigating solution I. **J Endod**, v. 25, n. 3, p. 167-171, 1999.

LESOT, H.; BÈGUE-KIRN, C; KUBLER, M. D.; MEYER, J. M.; SMITH, A. J.; CASSIDY, N.; RUCH, J.V. Experimental induction of odontoblast differentiation and stimulation during reparative processes. **Cells and Materials**, v. 3, n. 2, p. 201-217, 1993.

LESOT, H.; SMITH, A. J.; TZIAFAS, D.; BÈGUE-KIRN, C.; CASSIDY, N.; RUCH, J.V. Biologically active molecules and the dental tissue repair: a comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation in vitro. **Cells and Materials**, v. 4, n. 3, p. 199-218, 1994.

LINDE, A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. **The Anatomical Record**, v. 224, n. 2, p. 154-166, 1989.

LIOTTA, L.A. Tumor invasion and metastases: role of the basement membrane. Warner-Lambert Parke-Davis Award lecture. **Am J Pathol**, v. 117, n. 3, p. 339-48. Dec. 1984

LOEE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S.B. Experimental gingivitis in man. **J Periodontol**, v. 36, n. 3, p. 177-187, May. 1965.

MARINCOVICH, M.P. The molecular genetics of basement membrane diseases. **Arch Dermatol**, v. 129, n. 12, p. 1557- 65. Dec. 1993.

MARTINEZ, E. F. **Estudo in vitro de proteínas da matriz extracelular (tenascina, fibronectina, colágenos I e III e osteonectina) de fibroblastos de polpas dentárias humanas e de mucosa gengival**. São Paulo, 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração : Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, USP, 2002.

MARTINEZ, E. F.; de SOUZA, S. O. M.; CORRÊA, L.; de ARAÚJO, V. C. Immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin, and type III α 1(I) collagen in human dental pulp. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 12, p. 708-711, 2000.

MATSUO, T; NAKANISHI, T; SHIMIZU, H; EBISU, S. A clinical study of direct pulp capping applied to carious-exposed pulps. **J Endod**, v. 22, n. 10, p. 551-556, 1996.

MJOR IA. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 7: The exposed pulp. **Quintessence Inter**, v.33(2), p.113-135, Feb, 2002.

MOHRI, H. Fibronectin and integrins interactions. **Journal of Investigative Medicine**, Thoro Fane, v. 44, n. 8, p. 429-441, 1996.

MURRAY, PE; HAFEZ, AA; BAILEY, JH; WINDSOR, JL; STEVENSON, RG; COX, CF. Systemic evaluation of various haemostatic agents following local application prior to direct pulp capping. **J Dent**, 2004 (in press).

PAMEIJER, CH; STANLEY, HAROLF. The disastrous effects of the "total Etch" technique in vital pulp capping in primates. **Am J Dent** , 1998; 11(Spec Issue):S45-SS54.

PEREIRA, JC; SEGALA, AD; COSTA, CA. Human pulpal response to direct pulp capping with an adhesive system. **Am J Dent** . v. 13, n. 3, p. 139-147, 2000.

PEREIRA, JC; SEGALA, AD.; COSTA, CA. Human pulpal response to direct pulp capping with an adhesive system. **Am J Dent**, v. 13, p. 139-147, 2000.

PICKER, JD; FOX, DP. Do curried foods produce micronuclei in buccal epithelial cell? **Mutation Research**, v. 171, p. 185-188, 1986.

PITT FORD, TR. Pulpal response to a calcium hydroxide material for capping exposures. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** , v. 59, n. 2, p. 144-147, 1985.

PIVA, E. **Avaliação de componentes da matriz extracelular (Fibronectina e Tenascina) após capeamento direto com hidróxido de cálcio em polpas humanas.** (Dissertação — Mestrado) Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia, 2002.

PUCHER, JJ; DANIEL, JC. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. **J Periodontol**, v. 63, p. 526-532, 1992.

ROSENFELD, EF; JAMES, GA; BURCH, BS. Vital pulp tissue response to sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 4, n. 5, p. 140-146, May, 1978.

ROSER, M.; BÖHM, A.; OLDIGS, M.; WEICHENTHAL, M.; REIMERS, U.; SCHMIDT-PREUSS, U.; BREITBART, E.W.; RÜDIGER, H.W. Ultraviolet-Induced formation of micronuclei and sister chromatid exchange in cultured fibroblasts of patients with cutaneous malignant melanoma. **J Genet Cytogenet**, v. 41, p. 129-37, 1989.

ROTH, D.M.; ZEHLINSKI, G.; MARTINO-ROTH, M.G. Avaliação da genotoxicidade em Cirurgiões-Dentistas da cidade de Pelotas-RS através do teste de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal. **Ver Fac Odontol Bauru**, v. 10, n. 4, p. 204-14, 2002.

RUANO, R.; JORGE, ^aG.; JAEGER, M.M.M. Estudo in vitro da biocompatibilidade da hidroxiapatita utilizada em implantodontia. **RPG**, v.3, n.2, p. 135-141, abr/jun. 1996.

SAGE, E.H., BORNSTEIN, P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, n. 23, p.14831-14834, 1991.

SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. **J Det**, v. 22, n. 2, p. S6-S11. 1994.

SCHMID W. The micronucleus test. **Mutat Res**, v. 31, n. 1, p. 9-15, Feb. 1975.

SCHRÖDER, U; GRANATH, LE. Early reaction of inert human teeth to calcium hydroxide following experimental pulpotomy and its significance to the development of the hard tissue barrier. **Odont Rev**, v. 22, p. 379-395, 1971.

SCHRODER, U. Effect of an extra-pulpal blood clot on healing following experimental pulpotomy and capping with calcium hydroxide. **Odontol Rev**, v. 24, n. 3, p. 257-268, 1973.

SCHRÖDER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. **J Dent Res**, v. 64(Spec Issue) p. 541-548, 1985.

SENIA, ES; MARSHALL, FJ; ROSEN, S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 31, n. 1, p. 96-103, Jan, 1971.

SHRESTHA, P., SUMITOMO, S., LEE, C. H., NAGAHARA, K., KAMEGAI, A., YAMANAKA, T., TAKEUCHI, H., KUSAKABE, M., MORI, M. Tenascin: growth and adhesion modulation – extracellular matrix degrading function: an in vitro study. **European Journal of Cancer**. Part B: Oral Oncology, Oxford, v. 32B, n. 2, p. 106-113, 1996.

SILVA, A.F. **Avaliação histológica da resposta pulpar frente à aplicação de diferentes agentes hemostáticos empregados diretamente sobre a polpa exposta** (Dissertação — Mestrado) Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia, 2004.

SILVA, J. H. Avaliação clínica do Noplak em pacientes portadores de aparelhos fixos: estudo clínico Noplak, 2002.

SLOTS, J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. **J Periodont Res**, v. 37, n. 5, p. 389-398, 2002.

SMITH, AJ; MURRAY, PE; LUMLEY, PJ. Preserving the vital pulp in operative dentistry: Part I. A biological approach. **Dent Update**, v. 29, n. 2, p. 64-69, 2002.

SPANÓ, JC. E. **Estudo in vitro das propriedades físico-químicas das soluções de hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, antes e após a dissolução de tecido pulpar bovino** (Dissertação – Mestrado). Ribeirão Preto : Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Departamento de Dentística Restauradora, 1999.

STANLEY, HR. Pulp capping: conserving the dental pulp – can it be done? Is it Worth it? **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol**, Orlando, v. 68, n. 5, p. 628-639, 1989.

STANLEY, HR; CLARK, AE; PAMEIJER, CH; LOUW, NP. Pulp capping with a modified Bioglass formula (#A68-Modified). **Am J Dent**, v. 14, n. 4, p. 227-232, 2001.

TANOMARU, FILHO M; LEONARDO, MR; SILVA, LAB. Effect of irrigating solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. **J End**, v. 28, n. 4, p. 295-299, 2002.

TEIXEIRA, LS; DEMARCO, FF; COPPOLA, MC; BONOW, ML. Clinical and radiographic evaluation of pulpotomies performed under intrapulpal injection of anaesthetic solution. **Inter Endod J**, v. 34, n. 6, p. 440-6, Sep, 2001.

THESLEFF, I.; BARRACH, H.J.; FOLDART, J.M.; VAHERI, A.; PRATT, R.M.; MARTIN, G.R. Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. **Dev Biol**, v. 81, n. 1, p. 182-192, Jan. 1981.

THESLEFF, I.; MACKIE, E.; VAINIO, S.; CHIQUET-EHRISHMANN, R. Changes in the distribution of tenascin during tooth development. **Development**, v.101, n. 2, p. 289-296, 1987.

THOMAS, GP; BOYD, JB; SONI, NN; PALMER, JE. Histologic study of pulp capping using chlorhexidine in dogs. **NDA Journal**, v. 46, n. 1, p. 17-20, 1995.

TOYONO, T., NAKASHIMA, M., KUHARA, S., AKAMINE, A. Temporal changes in expression of transforming growth factor- β Superfamily members and their receptors during bovine preodontoblast differentiation in vitro. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 42, n. 7, p. 481-488, 1997.

TSUJI, T; TAKEI, K; INOUE, T; SHIMONO, M; YAMAMURA, T. An experimental study on wound healing of surgically exposed dental pulps in germ-free rats. **Bull Tokyo Dent Col**, v. 28, n. 1, p. 35-38, 1987.

TUCKER, J. E., LEMON, R., MACKIE, E. J., TUCKER, R. P. Immunohistochemical localization of tenascin and fibronectin in the dentine and gingiva of *Canis familiaris*. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 165-170, 1991.

TZIAFAS, D; SMITH, AJ; LESOT, H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. **J Dent**,

v. 28, n. 2, p. 77-92, 2000.

TZIAFAS, D.; ALVANOU, A.; PANAGIOTAKOPOULOS, N.; SMITH, A. J.; LESOT, H.; KOMNENOU, A.; RUCH, J. V. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. **Archives of Oral Biology**, v. 40, n. 10, p. 883-893, 1995.

VEIS, A. The role of dental pulp—thoughts on the session on pulp repair processes. **J Dent Res**, v. 64, (Spec No), p. 552-554. Apr. 1985.

WALTON RE, LANGELAND K. Migration of materials in the dental pulp of monkeys. **J Endod**, v.4, n.6, p. 167- 77, Jun. 1978

WILKEN, R; BOTHE, SJ; GROBLER, A; GERMISHUYS, PJ. In vitro cytotoxicity of clorehexidine gluconate, benzydamine-HCl and povidone iodine mouthrinses on human gingival fibroblasts. **SADJ**, v. 10, n. 56, p. 455-460, 2001.

WILLEMS, I. E., ARENDS, J. W., DAEMEN, M .J. Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. **The Journal of Pathology**, West Sussex, v. 179, n. 3, p. 321-325, 1996.

YOSHIBA, K.; YOSHIBA, N.; NAKAMURA, H.; IWAKU, M; OAWA, H. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. **J Dent Res**, v. 75, n.8, p. 1590-1597, Aug. 1996.

ZHANG, W.; TORABINEJAD, M.; Li, Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. **J Endod**, v. 29, n. 10, p. 654-657, Oct. 2003.

ZICKERT, I; EMILSON, GC; KRASSE, B. Effect on caries activity in 13-14year old Swedish children of measures against Streptococcus mutans. **Arch Oral Biol**, v. 27, n. 10, p. 861-868, 1982.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Entende-se como biocompatibilidade a habilidade de um material provocar o desfecho de uma resposta específica em um organismo ou tecido vivo (BROWNE, 1994). O ideal seria avaliar estas respostas diretamente em modelos humanos. Entretanto, atualmente, considerações éticas dificultam o uso de tais modelos (GOLDBERG; SMITH, 2004). Desta forma modelos animais tornam-se uma alternativa aceitável ao modelo humano, embora diferentes espécies devam ser levadas em consideração na interpretação das respostas teciduais (COSTA et al. 2000).

Diversos animais têm sido usados como modelos experimentais na terapia pulpar vital, incluindo macacos (COX; BERGENHOLTZ, 1986), cães (TZIAFAS et al., 1998), furão (SMITH et al., 1990), ratos (SIX et al., 2000), carneiros (ERSIN; ERONAT, 2005) e suínos (OGUNTEBI et al., 1995). Provavelmente, diferentes capacidades para cicatrização pulpar entre dentes humanos e de outros animais sejam responsáveis pelos resultados distintos (COSTA et al., 2000).

Embora existam estas diferenças, os resultados de estudos realizados em animais proporcionam maior similaridade com a experiência clínica do que os estudos *in vitro*. Entretanto, os resultados observados em modelos animais têm limitações e não devem ser extrapolados diretamente para as condições humanas, não dispensando a execução de estudos clínicos para a confirmação final da evidência científica (COSTA et al., 2000; FREIRE; PATUSSI, 2001).

COMPLEXO DENTINO-PULPAR E REPARO

A maioria das informações a respeito dos eventos de reparo pulpar fundamenta-se em experimentos baseados na odontogênese. A caracterização dos processos de sinalização, responsáveis pela indução da diferenciação dos odontoblastos, é fundamental para o entendimento tanto da dentinogênese fisiológica bem como do reparo do tecido (GOLBERG; SMITH, 2004).

No início da odontogênese, as células ectomesenquimais que se originam da crista neural e interagem com células epiteliais da lâmina dentária, sofrem migração, formando o folículo dentário. Neste estágio, essas células ectomesenquimais da papila dental que formarão a polpa dental dividem-se várias vezes, até que aquelas localizadas próximo à membrana basal diferenciam-se em pré-odontoblastos (TORNECK; TORABINEJAD, 1997), formando, posteriormente, a camada de

odontoblastos (GOLDBERG; LASFARGUES, 1995). O curso desses eventos é regulado temporo-espacialmente por interações epitélio-mesenquimais (TEN CATE, 1998).

A diferenciação dos odontoblastos é, portanto, resultado de contínuas interações epitélio-mesenquimais recíprocas, sendo constituída por várias etapas. Após sofrerem mitose, as células permanecem em G₀, alongam-se e polarizam-se, tornando-se aptas a depositar componentes da pré-dentina (RUCH; LESOT; BEGUE-KIRN, 1995). De acordo com esses autores, uma rede funcional constituída de moléculas da matriz, que incluem fibronectina e fatores de crescimento, como membros da superfamília do *transforming growth factor-β* (TGF-β), e seus receptores, pode estar envolvida na diferenciação terminal dos odontoblastos, ao menos no controle da polarização funcional.

Após a diferenciação e polarização, os odontoblastos iniciam síntese e secreção de matriz extracelular que constituirá a pré-dentina e a dentina (KATCHBURIAN; ARANA, 1999).

A polpa dental é um tecido conjuntivo frouxo especializado que apresenta uma população heterogênea de células, incluindo os odontoblastos, fibroblastos, células mesenquimais indiferenciadas, células endoteliais e perivasculares, células nervosas, macrófagos, linfócitos T, mastócitos, entre outras. Estas células estão localizadas em uma matriz extracelular rica em colágeno tipo I e III, algumas fibras reticulares e substância fundamental constituída por glicosaminoglicanos, proteoglicanos, glicoproteínas, fosfolípídeos e água (WALTON; PASHLEY; OGILVIE, 1989; GOLDBERG ; LASFARGUES, 1995; TORNECK ; TORABINEJAD, 1997).

A cooperação entre as várias populações de células na polpa, pode ser uma característica essencial da homeostase do tecido normal, incluindo a dinâmica das células pulpares, e tais interações podem ser elucidadas se entendermos o comportamento fisiológico da polpa e sua resposta a injúria (GOLDBERG; SMITH, 2004).

A polpa dentária não tem somente as funções nutricional e sensorial para a dentina, mas também tem uma capacidade reparativa nata. Este potencial tem importante implicação para a terapia dental (GOLDBERG; SMITH, 2004).

O objetivo da terapia pulpar vital é tratar a injúria pulpar reversível sempre que dentina e polpa são afetadas por cáries, procedimentos restauradores ou trauma. A

injúria pode ou não envolver exposição pulpar e é seguida por um clássico processo de cicatrização do tecido conjuntivo (TZIAFAS,2004). No caso de exposição pulpar, a polpa amputada pode ser reparada por si só ou após a aplicação de materiais capeadores (KAKEHASHI et al, 1965; YAMAMURA, 1985).

A preservação da vitalidade pulpar, durante o tratamento restaurador, é fundamental, pois a polpa mantém sua atividade funcional, proporcionando assim a capacidade de resposta dentinogênica aos estímulos biológicos e patológicos (STANLEY, 1989). Essa capacidade é expressa através da produção de dentina secundária, dentina peritubular, dentina reparativa e reacional (TZIAFAS et al., 2000). A dentina terciária formada por odontoblastos primários, após um leve estímulo tal como é a atrição, tem sido referida como dentina reacional, enquanto que a formada por uma nova geração de odontoblastos tem sido denominada de dentina reparativa (SMITH et al. 1995).

Um ponto importante neste contexto, é que os odontoblastos primários mantêm sua habilidade de formar dentina em dente vital através de toda a sua vida útil e, se eles são destruídos, células precursoras mesenquimais na polpa são capazes de diferenciarem-se em novas células odontoblastóides (MJÖR, 2001).

A polpa por si só possui capacidade de recuperar-se da injúria sobre ela ocorrida, desde que existam condições favoráveis para que isto aconteça (MJÖR, 2002). As condições para reparo pulpar, após exposição, implicam em um ambiente livre de bactérias, ausência de severas mudanças hemodinâmicas e ausência de severo infiltrado celular inflamatório (TZIAFAS, 2004). A natureza dos mecanismos de cicatrização da ferida pulpar depende da reação de defesa, da possível contaminação bacteriana, do sangramento durante a cirurgia e da introdução de lascas de dentina no interior do tecido pulpar (HEYS et al., 1981,1990; CVEK et al., 1987; COX et al., 1987; STANLEY, 1989).

Como parte do processo de cicatrização no reparo pulpar, o potencial dentinogênico das células pulpares pode ser expresso. Proliferação, migração e diferenciação das células progenitoras podem levar à nova geração de células formadoras de dentina (células odontoblastóides), reconstituindo a continuidade da interface dentino-pulpar (FITZGERALD, 1979; FITZGERALD et al., 1990; MJÖR et al., 1991).

Assim, o objetivo final na estratégia do tratamento regenerativo em situações de capeamento pulpar direto ou pulpotomia é induzir a diferenciação das células odontoblastóides, formadoras de dentina reparativa, na interface material capeador-polpa e estimular a atividade biossintética dos odontoblastos primários vizinhos à área da exposição (MJÖR, 2002).

É desta forma importante, a existência de uma matriz intermediária, como a fibrodentina, atuando como a membrana basal da odontogênese, para que ocorra a diferenciação odontoblástica, durante a formação da barreira dentinária (RUCH, 1985).

Inicialmente, acreditava-se que as progenitoras das células odontoblastóides estavam localizadas no interior da camada subodontoblástica, rica em células. Entretanto, o estudo de Fitzgerald *et al.* (1990) mostrou que no mínimo duas replicações de DNA são necessárias para que se sejam obtidas as células odontoblastóides funcionais no sítio de exposição pulpar. A primeira replicação acontece antes da migração celular e a segunda, no sítio de expressão do fenótipo do novo odontoblasto formado. Esta migração celular sugere que as células progenitoras são derivadas de outras populações celulares, localizadas no interior da polpa. Os fibroblastos localizados no interior da polpa parecem ser a mais provável população de células progenitoras (FITZGERALD *et al.* 1990).

Estas células necessitam aderir em uma superfície apropriada, antes de iniciarem a diferenciação celular e a formação da ponte de dentina (VEIS, 1985). Esta superfície faria o papel da membrana basal, remetendo então aos eventos iniciais da dentinogênese primária.

Tem sido postulado que uma rede de interações entre moléculas da matriz extracelular, incluindo fibronectina (YOSHIBA *et al.*, 1996; TZIAFAS *et al.*, 1995) e fatores de crescimento, regulam a diferenciação de células odontoblastóides e a dentinogênese reparativa no ambiente do reparo pulpar (LESOT *et al.* 1994, GOLDBERG; SMITH, 2004).

Fatores de crescimento representam um grupo de moléculas-chave, responsáveis por sinalizar uma variedade de processos celulares após injúria dental (SMITH, 2003).

O reparo pulpar, caracterizado pela formação de barreira dentinária, tem sido relatado depois do capeamento de polpas dentais expostas, usando materiais

contendo hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) (SCHRODER; GRANATH, 1971; COX et al., 1996).

Em estudos animais, a aplicação de fatores de crescimento biologicamente ativos e de moléculas da matriz extracelular como capeadores resultaram na formação de tecidos duros. Tais fatores são BMPs (NAKASHIMA, 1994; RUTHERFORD et al. 93; JEPSEN et al. 1997; SIX et al., 2002) insulin-like growth factor-I (LOVSCHELL et al. 2001), sialoproteína óssea (DECUP et al. 2000), derivados da matriz de esmalte (NAKAMURA et al. 2001), constituintes da dentina solubilizados em EDTA (TZIAFAS et al. 1995), TGF- β 1 (TZIAFAS et al. 1998; HU et al. 1998), fator de crescimento de fibroblastos e insulin-like growth factor-II (TZIAFAS et al. 1998)

O resultado de sucesso para terapia vital da polpa é muito dependente do tipo e localização da injúria, idade do dente, modalidade de tratamento (Material) e integridade da cavidade restaurada (MJÖR, 2002; TZIAFAS, 2004).

MATERIAIS CAPEADORES

Durante anos, uma variedade de materiais foram propostos como candidatos para capeamento pulpar direto, mas o hidróxido de cálcio e seus compostos ainda são o padrão-ouro, contra o qual diferentes materiais são testados (HORSTED-BINSLEV et al., 2003). O Ca(OH)_2 foi introduzido na odontologia por Hermann em 1920 (SCHRODER, 1985; STANLEY, 1989) e devido ao sucesso clínico nestas várias décadas, tem sido aceito como medicação de capeamento direto ideal para cicatrização pulpar e formação da ponte de dentina (COX et al. 1998).

A ISO(7405) estabelece que seja usado para o teste de materiais capeadores como grupo controle, na avaliação da resposta pulpar (SCHRÖDER, 1985; COX; BERGENHOLTZ, 1986; D'SOUZA et al, 1995), e o Ca(OH)_2 tem sido usado para tal, uma vez que apresenta-se como uma referência para a indução de dentinogênese reparativa (MURRAY et al., 2003)

Várias evidências científicas, ao longo dos anos, consolidaram o tratamento conservador pulpar, demonstrando o reparo e formação de barreira dentinária quando o Ca(OH)_2 foi usado sobre a polpa exposta (STANLEY; LUNDY, 1972; HOLLAND et al., 1979; HEYS et al., 1990; ÇALISKAN, 1995; PEREIRA; SEGALA; COSTA, 2000; DEMARCO et al., 2001; ERSIN; ERONAT, 2005).

Apesar disso, o mecanismo de ação deste material ainda não está totalmente esclarecido (GRAHAM et al, 2006). Seu efeito inicial sobre a polpa é conhecido por ser destrutivo (GLASS; ZANDER, 1949). Em contra-partida, o sucesso do tratamento com Ca(OH)_2 tem sido atribuído à liberação de íons hidroxila, responsáveis pelo pH alcalino, que induz a necrose local do tecido pulpar exposto, o que causa discreta irritação, estimulando a resposta de reparo pulpar (YAMAMURA, 1985; SCHRODER, 1985; STANLEY, 1989). Adicionalmente, tem sido postulado que o pH alcalino, mantido na região, cria condições favoráveis para a formação de dentina (JAVALET; TORABINEJAD; BACKLAND, 1985) e, que a elevada concentração de íons cálcio aumenta a expressão de genes promotores da mineralização nas células pulpares (RASHID et al, 2003). Assim, o sinergismo entre pH elevado e a presença dos íons cálcio, contribui para a formação da ponte de dentina (DAVIDSON E GUO, 2000).

O Ca(OH)_2 , embora não seja ácido, tem algum efeito solubilizante sobre a matriz de dentina (SMITH et al, 1995). em especial sobre o TGF- β 1, que quando liberado, pode contribuir para a iniciação da formação da barreira dentinária, após o capeamento pulpar. De acordo com Smith (2003), esta pode ser a explicação biológica mais racional para a ação do Ca(OH)_2 , do que a visão mais tradicional de sua ação como “irritante” das células pulpares. Graham et al (2006) demonstraram que o Ca(OH)_2 pode exercer efeito sobre a regeneração da dentina, por mecanismos ainda desconhecidos, envolvendo sinalização celular e liberação de moléculas bioativas da matriz dentinária.

De acordo com Holland et al. (1982), o cálcio do material capeador reage com dióxido de carbono do tecido formando grânulos de carbonato de cálcio (cristais de calcita). Estas grânulos podem desempenhar um importante papel iniciando a mineralização do colágeno. A superfície do Ca(OH)_2 representa um apropriado substrato para adsorção das moléculas adesivas como a fibronectina (FN), tanto *in vivo* (TZIAFAS, et al, 1994; YOSHIBA et al, 1996) quanto *in vitro* (SEUX et al, 1991).

O estudo de Seux et al.(1991) em cultura de células, demonstrou que a integração com a FN fortalece as evidências sobre o importante papel dos cristais de calcita como primeiro passo para a formação da barreira de tecido mineralizado.

Um estudo *in vivo* analisou as interações iniciais entre células pulpares e cimento de Ca(OH)_2 . Os autores observaram que a FN exibiu uma alta afinidade por microcristais produzidos na interface do cimento. Células odontoblastóides ricas em FN foram associadas com o cimento e estruturas cristalinas (TZIAFAS,et al., 1995).

A Universidade de Loma Linda, nos Estados Unidos da América, em 1993, desenvolveu o agregado de trióxido mineral (MTA), para selar as comunicações entre os sistemas de canal radicular e superfície externa dos dentes (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993). Posteriormente, este material foi utilizado para tratamento pulpar e capeamento pulpar direto (PITT FORD et al, 1996; HOLLAND et al., 2001). Em relação às propriedades físicas e químicas do MTA, os resultados mostraram que todo o MTA era dividido em duas fases específicas, constituídas pelo óxido de cálcio e fosfato de cálcio. O pó do MTA (Loma Linda University) consiste de finas partículas hidrofílicas, que endurecem na presença da água e os principais compostos presentes nesse material são o silicato tricálcico, aluminato tricálcico, óxido tricálcico e óxido de silicato, bem como pequenas quantidades de outros minerais estão presentes, sendo responsáveis pelas propriedades físicas e químicas do material. Também foi constatado que o pó óxido de bismuto é adicionado ao agregado para deixá-lo radiopaco e que as principais moléculas presentes no cimento são íons cálcio e fósforo. O pH inicial do MTA foi de 10,2, o qual aumentou para 12,5, três horas após ser misturado e então permaneceu constante. O MTA neste estudo não mostrou solubilidade (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993; TORABINEJAD et al., 1995b).

Várias pesquisas têm aplicado MTA diretamente sobre exposições pulpares em capeamento direto ou pulpotomia demonstrando formação de ponte de dentina bem como ausência de resposta inflamatória (PITT-FORD et al, 1996; FARACO Jr ; HOLLAND, 2001; HOLLAND et al. 2001; TZIAFAS, 2002; DOMINGUEZ et al. 2003; SALAKO et al., 2003; AGAMY et al., 2004; FARSI et al., 2005; QUEIROZ et al, 2005). Tem sido demonstrado que este material exibe melhores resultados do que o cimento de Ca(OH)_2 quando comparadas as respostas pulpares em estudos animais (FARACO Jr ; HOLLAND, 2001).

HOLLAND et al. (1999) examinando a ação do MTA após a implantação de túbulos de dentina preenchidos com MTA ou pasta de Ca(OH)_2 em tecido conjuntivo subcutâneo de ratos observaram depósitos de granulações birrefringentes próximos a abertura dos túbulos e do lado dentinário do tubo. Estas granulações correspondiam a cristais de calcita originados a partir da reação do Ca(OH)_2 com dióxido de carbono do tecido, o qual associados a FN, são precursores da barreira de tecido mineralizado. Estes cristais foram encontrados tanto para Ca(OH)_2 quanto para MTA. Os autores observaram que MTA não contém hidróxido de cálcio na sua

composição. No entanto, contém óxido cálcio, que em contato com os fluidos do tecido forma hidróxido de cálcio. Este, por sua vez, reage com o dióxido do tecido produzindo cristais de calcita. O tecido em contato com estes cristais forma uma rede de FN extracelular. Então, os autores concluíram que MTA tem mecanismo de ação similar à do Ca(OH)_2 .

Também foi avaliada a resposta pulpar, em estágio inicial da formação de dentina, em cavidades classe V de dentes de cães com polpas expostas capeadas com MTA (Dentsply) nos períodos de tempo de uma, duas e três semanas, através de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. O estudo indicou que o MTA é um material capeador pulpar efetivo, capaz de estimular formação de dentina reparativa, pelo estereotípico mecanismo de defesa pulpar, onde a matriz primitiva (fibrodentina) desencadeia a expressão de células pulpares de potencial odontoblástico (TZIAFAS et al., 2002).

Aeinehchi et al. (2003) realizaram pesquisa em terceiros molares humanos comparando os agentes capeadores MTA (Dentsply) e cimento contendo hidróxido de cálcio. O quadro histológico mostrou menos inflamação, hiperemia e necrose, barreira dentinária mais espessa e formação de camada odontoblástica mais freqüente, com MTA, do que com Ca(OH)_2 . As amostras de uma semana dos dois materiais não apresentaram formação de barreira sendo observada leve inflamação crônica no local da exposição para o MTA e inflamação crônica e aguda com Ca(OH)_2 . As amostras de 2 meses do MTA apresentaram formação de barreira e leve inflamação crônica subjacente e as do HC não tiveram formação de barreira e inflamação crônica e aguda importante.

A biocompatibilidade do MTA (Dentsply) também foi avaliada após proteção pulpar direta em dentes de cães adultos (QUEIROZ et al. 2005). Após 90 dias, os animais foram mortos e os dentes extraídos e avaliados histologicamente. A resposta do tecido pulpar e periapical ao MTA neste estudo foi semelhante à observada para o Ca(OH)_2 , com formação de barreira dentinária, camada odontoblástica íntegra e ausência de células inflamatórias, bem como ausência de alterações periapicais e ósseas. Assim, os autores concluíram que o MTA, como o Ca(OH)_2 , apresentou excelente biocompatibilidade

AGENTES HEMOSTÁTICOS

Vários fatores têm influência no sucesso do capeamento pulpar, dentre eles o efetivo controle do sangramento, o qual é necessário para melhorar o prognóstico da terapia vital conservadora (STANLEY, 1989). Favoráveis condições para o reparo pulpar após exposição pulpar requerem um ambiente livre de bactérias, ausência de mudanças hemodinâmicas severas e ausência de infiltrado celular inflamatório severo (TZIAFAS, 2004).

De acordo com Schröder (1985), o material capeador não deve ser colocado quando ainda houver sangramento ou pequena quantidade de plasma sanguíneo, pois pode ser criado um espaço entre a superfície pulpar e o mesmo (SCHRÖDER, 1985). Caso haja escoamento de sangue abaixo da cobertura realizada pelo material de proteção pulpar, esse formará um coágulo ou mesmo espessa membrana fibrino-purulenta, a qual será substituída por tecido de granulação e favorecerá a organização e diferenciação de fibroblastos e células odontoblastóides, produzindo dentina reparativa ectópica. Quando isto ocorre, a polpa é colocada sob máximo esforço desnecessariamente e corre-se o risco de contaminação por infecção secundária e da perda da vitalidade pulpar.

Para conseguir o controle da hemorragia pulpar, convencionalmente, os clínicos aplicam pressão no local da exposição com uma bolinha de algodão estéril até que haja hemostasia. Tal prática nem sempre é efetiva (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Ainda, se tal procedimento não for executado eficazmente, permitirá a persistência da resposta inflamatória crônica e, conseqüentemente, prejudicará o reparo pulpar (SCHRÖDER, 1985; COX *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2000; PEREIRA *et al.*, 2000).

Muitas vezes, visando auxiliar o controle do sangramento pulpar são utilizadas bolinhas de algodão embebidas em soro fisiológico (HOLLAND *et al.*, 1978; HÖRSTED *et al.*, 1981; PITT FORD, 1985; COX *et al.*, 1996; FITZGERALD; HEYS, 1991; HEBLING *et al.*, 1999; DEMARCO *et al.*, 2001). Contudo esta substância não é capaz por si só de auxiliar na hemostasia (STANLEY, 1989; DEMARCO *et al.*, 2001)

Devido a isso, outras substâncias têm sido empregadas, como é o caso do peróxido de hidrogênio (HÖRSTED *et al.*, 1981), de soluções anestésicas que contenham epinefrina (HEBLING *et al.*, 1999), da água de cal (SCHRÖDER *et al.*, 1971; SCHRÖDER 1985), e do sulfato férrico (FEI *et al.*, 1991; ACCORINTE *et al.*, 2005).

Todavia, essas substâncias, com o passar do tempo, estão dando lugar à clorexidina (PAMEIJER *et al.*, 1998; STANLEY *et al.*, 2001; HÖRSTED *et al.*, 2003), e ao hipoclorito de sódio (COX *et al.*, 1998; COX *et al.*, 1999; HAFEZ *et al.*, 2002), bem como às formas associadas, como é o caso da água oxigenada com o hipoclorito (KITASAKO *et al.* 2002; KIBA *et al.*, 2000; KITASAKO *et al.* 1998; MATSUO *et al.*, 1996).

Alguns estudos têm indicado para o controle da hemorragia e sucesso do capeamento pulpar adesivo o hipoclorito de sódio (COX *et al.*, 1998; COX *et al.*, 1999). Além de ser bom agente antimicrobiano, o hipoclorito possui elevado pH, o que implicaria na solubilização de fatores de crescimento da dentina, e conseqüentemente, na estimulação à formação de dentina (SMITH *et al.*, 2002). No entanto, pesquisas também demonstram a atividade de dissolução tecidual do hipoclorito quando empregado a 5.25%. Porém esta é limitada às células superficiais pulpares sem efeitos adversos sobre o tecido pulpar subjacente (SENIA *et al.*, 1971).

Em cultura de células, foi observado severo efeito citotóxico quando usado o hipoclorito em baixas concentrações (COSTA *et al.*, 2001; HELING *et al.*, 2001). Entretanto, para hemostasia das exposições pulpares, quando utilizado hipoclorito a 2,5% (COX *et al.*, 1999) não foi observado nenhum efeito negativo às células pulpares, ou mais especificamente, à formação de células odontoblastóides.

A solução de hipoclorito a 6% quando colocada sobre a exposição pulpar com bolinha de algodão, conseguiu remover a maioria das lascas de dentina, bem com o coágulo e as células danificadas e o mais importante de tudo, controlou a hemorragia na polpa (KATOH *et al.* 1978).

Em estudo semelhante, Hafez *et al.* (2002) analisaram a biocompatibilidade do hipoclorito a 3% em exposições pulpares em macacos. Os resultados demonstraram que este hemostático removeu o coágulo, as lascas de dentina, os debris operatórios, bem como controlou a hemorragia. Entretanto, no grupo controle do estudo não foi utilizado NaOCl, mas soro fisiológico, o qual mostrou resultados bastante semelhantes ao do NaOCl. Dessa forma, estes autores ressaltaram que talvez não exista diferença entre o uso destas duas substâncias, bem como questionaram quanto ao fato das mesmas causarem injúria química adicional à polpa, quase sempre já lesada, uma vez que isto poderia ser evitado com o uso de substâncias de ação menos lesiva, como seria o caso, por exemplo, da clorexidina.

Com relação ao uso da clorexidina, Cox *et al.* (1998) sugeriram que esta substância poderia ser a causa de desastrosos resultados encontrados no estudo de Pameijer & Stanley (1998). Em contrapartida, a clorexidina a 0,2% utilizada no capeamento pulpar direto como agente hemostático e de limpeza, tem demonstrado boa performance. (HORSTED *et al.*, 2003).

Diversos estudos, *in vitro*, tem demonstrado o efeito citotóxico da clorexidina sob diferentes tempos, concentrações e métodos de avaliação (PUCHER E DANIEL, 1992; WILKEN *et al.*, 2001; CHANG *et al.*, 2001; HIDALGO E DOMINGUES, 2001; HERNANDEZ *et al.*, 2005).

Horsted *et al.* (2003) utilizaram como agente hemostático e de limpeza a clorexidina a 0,2% no capeamento pulpar direto em humanos. Os autores verificaram que a clorexidina foi biocompatível, uma vez que efetivou o controle da hemorragia e não interferiu no reparo pulpar. Já o material capeador adesivo não demonstrou mesma performance, pois este apresentou menor quantidade de formação de barreira do que o Dycal[®] ($p < 0,05\%$).

Silva *et al.* (2006) realizaram estudo avaliando histologicamente a resposta pulpar frente à utilização do hipoclorito de sódio a 5,25%, do gluconato de clorexidina a 2% e do soro fisiológico 0,9% (controle), empregados previamente ao capeamento direto de polpas humanas. Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que, em linhas gerais, o hipoclorito de sódio a 5.25% e o digluconato de clorexidina a 2% demonstraram comportamento semelhante ao da solução-controle (soro fisiológico 0,9%), segundo os critérios avaliados, o que se traduz em processo de reparo pulpar similar nos espécimens referentes às soluções citadas. Embora tenha observado uma tendência a formação de barreira mais organizadas quando utilizadas as soluções testadas.

Accorinte *et al.* (2005) avaliaram a resposta pulpar em dentes humanos capeados com agentes adesivos e $(CaOH)_2$ após controle de hemorragia com os agentes hemostáticos solução salina, sulfato férrico, hipoclorito de sódio a 2,5% e solução de $Ca(OH)_2$. Os autores concluíram que mesmo realizando o controle do sangramento o capeamento com adesivos é contra-indicado, $Ca(OH)_2$ apresentou melhores resultados.

MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular (ME) não é simplesmente um arcabouço para estabilizar a estrutura física do tecido pulpar (VAN AMERONGEN et al. 1983; HILLMANN; GEURTSSEN, 1997) mas ela também tem um papel ativo influenciando o desenvolvimento, migração, proliferação, forma e função de todas as células pulpares (LESOT et al., 1981; LUKINMAA et al, 1991). Esta matriz atua como uma entidade de informação uma vez que detecta, traduz e coordena os sinais originados provenientes do microambiente tecidual e células adjacentes (JONES; JONES, 2000).

Uma rede de proteínas da matriz e receptores da superfície celular associados exerce uma profunda influência sobre a expressão de genes e comportamento celular, incluindo crescimento, motilidade, diferenciação e sobrevivência (JONES; JONES, 2000).

As principais classes de moléculas que fazem parte da matriz da polpa dentária são proteínas colagênicas (colágenos tipo I e III), proteínas não colagênicas (fibronectina, tenascina, osteonectina, sialoproteína, osteocalcina), proteoglicanas incluindo-se o ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de heparana e fosfolípídeos, constituindo um gel característico que embebe os elementos celulares e fibrilares (LINDE, 1985; ALBERT *et al.*, 1994; GOLDBERG; LASFARGUES, 1995).

Entre os componentes da matriz extracelular, a fibronectina (FN) e a tenascina (TN) destacam-se como as duas maiores glicoproteínas (CHIQUET-EHRISMANN, 1990).

Tenascina

A TN é considerada uma ampla glicoproteína oligomérica multifuncional da matriz extracelular, sendo também um hexâmero dissulfeto-ligado, que dependendo da espécie possui pesos moleculares que variam de 190 a 320kD (SPRING et al., 1989). As TNs são sintetizadas primariamente por células nos tecidos conjuntivos (CHIQUET-EHRISMANN, 2004).

Em vertebrados, são uma família de 4 glicoproteínas da matriz extracelular que estão presentes em diferentes tecidos conjuntivos. As tenascinas contribuem para a estrutura da matriz e influenciam o comportamento das células em contato com a matriz extracelular (CHIQUET-EHRISMANN, 2004).

Os quatro tipos de TN descritos são: TN-C (também conhecida como proteína mesenquimal da matriz extracelular do glioma GEM (BOURDON et al, 1983), antígeno miotendinoso (CHIQUET; FRAMBROUGH, 1984), Hexabrachion (ERIKSON; IGLESIAS, 1984) Citotactina (GRUMET et al. 1985), J1220/200 (KRUSE et al. 1985), tenascina (CHIQUET-EHRISMANN et al, 1986), e neuronectina (RETTIG et al., 1989) e está presente em inúmeros tecidos de desenvolvimento, incluindo sistema nervoso e também em tecidos cicatriciais e tumorais), TN-R (restrictin , janusin - especificamente no sistema nervoso central e periférico, principalmente na fase embrionária) e TN-X (gene X - mais proeminente nas células musculares esquelética e cardíaca) (ERICKSON, 1993; CHIQUET-EHRISMANN, 1995) e TN-W (tenascina-N – desenvolvimento do esqueleto e no periósteo em adultos, bem como no rim e em certos músculos)(SCHERBERICH et al., 2004).

A TN é induzida por uma complexa rede de sinais como fatores de crescimento, forças mecânicas (FLUCK; TUNC-CIVELEK; CHIQUET, 2000; CHIQUET- EHRISMANN, 2004) e proteinases (JONES; JONES, 2000).

A expressão da TN é célula tipo-específica e pode ser induzida por fibroblastos e células gliais com envolvimento de fatores de crescimento. Em muitos sistemas experimentais têm-se mostrado que as células epiteliais secretam um ou mais fatores de crescimento que estimulam os fibroblastos dos tecidos conjuntivos adjacentes a sintetizarem e secretarem TN (ERICKSON; BOURDON, 1989; CHIQUET-EHRISMANN, 1990). No caso de tumores epiteliais parece que há envolvimento do fator beta de transformação do crescimento (TGF-beta) (ERICKSON; BOURDON, 1989).

Horibe et al. (2004) investigaram o efeito dos fatores de crescimento sobre a expressão da TN e a função adesiva em cultura de célula. Os dados sugerem que TGF-beta1, HGF e RA podem regular a adesão das células pulpares a superfícies tratadas com FNC e que este efeito é mediado por TNC.

TN-C é altamente expressada durante a embriogênese e é transitoriamente expressada durante organogênese, e está ausente ou muito reduzida nos órgãos desenvolvidos, mas reaparece sob condições patológicas causadas por infecções, inflamações ou durante a tumorigênese (CHIQUET-EHRISMANN; CHIQUET, 2003). Sendo observada, portanto, em uma variedade de neoplasias malignas e processos cicatriciais (BOURDON et al., 1983; MACKIE et al., 1987). Heikinhemo et al. (1991) e

Mori et al. (1995) demonstraram a presença de TN no estroma de alguns tumores odontogênicos benignos.

Com base em dados experimentais, várias funções têm sido propostas para a TN (CHIQUET-EHRISMANN, 1990; SAGE E BORNSTEIN, 1991). Alguns experimentos de cultura celular revelaram ação anti-adesiva da TN quando em conjunto com a FN. Isto implica em uma possível função da TN em mediar a migração celular durante a embriogênese, reduzindo assim a adesão celular a fibronectina (CHIQUET-EHRISMANN et al., 1988). Além disso, a TN tem atividade imunossupressora por inibir a ativação de linfócitos T, diferentemente da fibronectina que em contraste estimula a proliferação dos mesmos (RUEGG et al., 1989). Possui também atividade de hemaglutinação (CHIQUE-EHRISMANN et al., 1986)

É sugerido um papel principal para TN-C na modulação da adesão por suas propriedades adesiva e antiadesiva. Esta proteína pode antagonizar o efeito adesivo de proteínas da matriz tais como FN e pode causar mudanças na organização do citoesqueleto de actina e na formação de adesão focal (CHIQUET-EHRISMANN et al 1988; SPRING et al., 1989; OREND E CHIQUET-EHRISMANN, 2000). Na embriogênese a TN está intensivamente expressa no mesênquima de órgãos em desenvolvimento tais como glândulas mamárias, dentes, rins, cartilagens embrionárias, ossos e sistema nervoso (CHIQUET-EHRISMANN, 1990).

Thesleff et al. (1987, 1991) realizaram estudos de imunofluorescência e imunoperoxidase em dentes de camundongos desde o estágio de broto dentário até a erupção dental. Os resultados demonstraram que as células dentais mesenquimais expressam a TN em diferentes intensidades durante a odontogênese. Na fase de botão, a TN se acumulou no mesênquima da papila dental. Durante a fase de capuz há redução da expressão da TN, pois nesta fase as células estão em intensa mudança morfogênética e rápida proliferação, não estando em ativa deposição de matriz, diferentemente do estágio de campânula onde a marcação da TN foi intensa e manteve-se presente na polpa dental mesmo após o desenvolvimento e erupção da coroa. No momento de diferenciação dos odontoblastos, a TN se mantém expressa na membrana basal, sendo que após a sua completa diferenciação, as células da papila dental deixam de produzi-la. Após a erupção dentária, a TN se mostra intensamente presente apenas na polpa dentária, estando ausente da dentina e pré-dentina. Os resultados sugerem que a TN possui uma importante

função na morfogênese dentária e na interação célula-matriz, estando envolvida, juntamente com outras moléculas da matriz extracelular, no controle da diferenciação de odontoblastos.

Lukinmaa et al. (1991) analisaram a expressão da TN em terceiros molares não erupcionados de adolescentes, aparentemente não associados a nenhum processo patológicos. Os resultados sugeriram que a TN tem duas funções distintas nos tecidos dentais; uma é a associação com a regulação da diferenciação celular envolvida na formação de matrizes mineralizadas, já que a TN se expressou na polpa, zona cementária e zona osteogênica do osso alveolar. A outra, sugere que a TN está funcionalmente associada com pressões mecânicas, uma vez que se acumulou na interface tecidos mineralizados e não mineralizados. Já Thesleff et al. (1987) consideraram que a manutenção da expressão da TN nas células mesenquimais pulpares está associado com a capacidade destas células em se diferenciarem em células formadores de tecidos duros, uma vez que após a injúria as células pulpares podem se diferenciar em odontoblastos.

Martinez et al. (2000) sugeriram que o acúmulo de TN na periferia do tecido pulpar está associado com a produção de dentina secundária, mediando assim, a migração e diferenciação celular.

Além de possuir um importante papel na organogênese dentária, a TN está envolvida nos processos iniciais de osteogênese e condrogênese, assumindo um papel importante na diferenciação de células mesenquimais formadoras de tecidos duros (MACKIE et al. 1987; THESLEFF et al, 1988).

No reparo pulpar a expressão da TN foi avaliada por Piva et al. (2006) em polpas humanas mecanicamente expostas e capeadas com pasta de Ca(OH)_2 . Os autores evidenciaram uma marcante expressão desta glicoproteína na área de exposição adjacente à barreira dentinária, aos 30 dias pós capeamento, fortalecendo a provável relação da TN com a diferenciação odontoblástica e mineralização dos tecidos.

Desde que TNs são conhecidas por ter uma influencia sobre forma, migração e crescimento celular elas são atrativas moléculas candidatas para ser usadas em engenharia tecidual (CHIQUET-EHRISMANN, 2004).

Fibronectina

A FN é uma glicoproteína da matriz com atividade multifuncional, associada à regulação de adesão celular, migração e diferenciação durante o desenvolvimento e reparo (HYNES, 1985; JUHASZ et al. 1993; POTTS AND CAMPBELL, 1994, THESLEFF et al. 1979; LESOT OSMAN E RUCH, 1981; ALBERT et al., 1994; MORI et al., 1996). É classificada como um dímero de 450kD, composto por duas extensas subunidades, cada uma com peso molecular de 225 kD, ligadas por um par de pontes dissulfídicas através de seus terminais carboxílicos (ALBERT et al., 1994; MOHRI et al., 1996).

A FN possui múltiplos isomorfos, sendo reconhecidos 20 subtipos em humanos. A forma solúvel está presente no plasma, cuja maior fonte parece ser os hepatócitos, entretanto células endoteliais e macrófagos podem contribuir para a sua produção (ALITALO et al, 1980; MOHRI et al., 1996). As outras formas são todas insolúveis e filamentosas, encontram-se presentes nos tecidos e são sintetizadas principalmente por fibroblastos e células endoteliais (MOHRI et al, 1996)

A FN se liga à fibrina, células em cultura, bactérias, colágeno (especialmente o tipo III), glicosaminoglicanas e proteoglicanas (RUOSLAHTI, 1981), estando distribuída em três compartimentos diferentes: intracelular, na superfície da célula e na matriz extracelular (FURCHT et al., 1978). É sintetizada por vários tipos celulares como células epiteliais, células mesenquimais (fibroblastos), células de Schwann, células endoteliais e astrogliais (RUOSLAHTI, 1981; CASELITZ, 1987) .

A FN tem papel importante na cicatrização de feridas (KOUKOULIS et al., 1991; AUKHIL et al., 1996; WILLEMS et al., 1996; LARJAVA et al., 1993), inicialmente facilitando a agregação plaquetária através de sua deposição no colágeno e/ou fibrina. Também atua na neovascularização, pela estimulação da migração de células endoteliais, servindo como guia para o movimento das células epiteliais através do tecido de granulação e auxiliando no reconhecimento da MB subjacente, de tal forma que a ceratinização normal possa ocorrer (GRINNEL, 1984).

Está envolvida em inúmeras funções celulares incluindo adesão e espraiamento celular a outras células ou substrato, promovendo, portanto, migração na matriz, organização de microfilamentos no citoplasma influenciando na morfologia celular, e diferenciação, assumindo um papel importante no desenvolvimento embrionário (YAMADA & OLDEN, 1978; RUOSLAHTI, 1981; DUFOUR et al. 1986; DUBAND et al., 1986; STEELE et al., 1992). Furcht et al. (1978) sugeriram que após

uma transformação maligna, ocorre diminuição da expressão de fibronectina celular, sendo esta portanto responsável pela tumorigênese e capacidade de metástase do tumor. A FN plasmática assume um importante papel de molécula opsonizadora, uma vez que, após uma injúria tecidual, mobiliza células fagocitárias para remoção de debris do sistema sanguíneo (YAMADA & OLDEN, 1978)

Na odontogênese, a FN é considerada uma glicoproteína mediadora da adesão entre células e matriz extracelular, sendo que esta adesão, determina a polaridade das células da papila dentária, induzindo, portanto, juntamente com a membrana basal, a diferenciação de células mesenquimais em odontoblastos (LESOT et al., 1981; THESLEFF & HURMERINTA, 1981; YOSHIBA et al., 1994), ação esta semelhante quando da formação de dentina reparativa (YOSHIBA et al., 1996).

Diversos estudos tem demonstrado a distribuição da FN em polpas dentárias humanas (VAN AMERONGEN et al., 1984; KARJALAINEN et al., 1986; LUKINMAA et al., 1991; GARBARSH et al., 1994; YOSHIBA et al., 1994; FARGES et al. 1995, MARTINEZ et al., 2000, PIVA et al, 2006).

Lukinmaa et al. (1991) e Martinez et al. (2000) demonstraram a distribuição da FN em polpas dentárias humanas, estando mais fortemente expressa na interface tecido mineralizado e não-mineralizado. Sugeriram que a manutenção da expressão desta glicoproteína estaria relacionada com uma provável função desta em mediar a diferenciação celular, envolvida na formação de matrizes mineralizadas, quando ocorre uma injúria pulpar. Para Martinez et al. (2000), a forte expressão da FN na periferia de polpas dentárias humanas está associada com a elaboração da dentina secundária, facilitando desta forma a migração e diferenciação celular.

Wang , Hao e Shi (2000) reportaram o papel crucial da FN na diferenciação odontoblástica, durante o reparo dentinário e pulpar. Os autores investigaram a resposta das células pulpares à ação da FN plasmática bovina. Os resultados sugeriram que as células pulpares utilizam FN para ligar-se à ME e subsequentemente expandirem-se. A FN poderia, segundo eles, ter atividade mitogênica e algum papel na regulação da diferenciação das células pulpares em odontoblastos.

Lesot et al. (2001) observaram que as diferenciações citológicas implicam em mudanças na organização do citoesqueleto, sendo controladas por interações da ME com o mesmo, via membrana plasmática. A FN é redistribuída durante a

polarização odontoblástica e interage com moléculas da superfície celular, facilitando a diferenciação odontoblástica.

RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO

RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO

Este estudo sofreu modificações da proposição do projeto original. Tais mudanças ocorreram por problemas técnicos, uma vez que houve retardo na aquisição de equipamentos como a incubadora de CO₂, indispensável à execução do cultivo celular, e os mesmos foram entregues em tempo inviável à execução do experimento.

Cabe ressaltar, que para o teste de genotoxicidade foi sugerido bela banca examinadora do projeto, que fosse executado em células pulpares em cultivo, tendo em vista a dificuldade da análise de micronúcleos em material parafinado. Assim, esta análise também dependia do pleno funcionamento do Laboratório de Cultivo Celular, não podendo ser efetuada a contento.

Desta forma, optou-se por ampliar o estudo imunoistoquímico, a fim de poder analisar a expressão de componentes da matriz também na cicatrização pulpar em modelo animal (suíno), além do modelo humano proveniente do estudo de Silva *et al.* (2006), que já constava no projeto original.

O experimento imunoistoquímico presente no projeto de pesquisa intitulado “Avaliação da biocompatibilidade e da genotoxicidade do hipoclorito de sódio e do gluconato de clorexidina utilizados previamente ao capeamento pulpar direto e estudo imunoistoquímico da expressão de componentes da matriz extracelular em polpas humanas expostas a esses agentes hemostáticos” aconteceu da forma planejada, sendo utilizados para o estudo em humanos, os espécimes referentes à pesquisa de Silva *et al.* (2006), cuja amostra foi de 45 dentes. Entretanto, foram utilizados para o presente estudo 42 espécimes, existindo, portanto, perda de 3 espécimens (tabela 1). Estas perdas no n amostral são justificadas porque após o estudo histológico, após cortes seriados da área da exposição alguns espécimes esgotaram-se, ou seja, nestes dentes não haviam mais cortes desta área para serem utilizados na técnica de imunoistoquímica. Assim, o n amostral ficou estabelecido conforme a Tabela 1.

As 40 amostras referentes ao estudo histológico do reparo pulpar em suínos, utilizadas por Leites (2006) foram aproveitadas integralmente nesta pesquisa (vide tabela 2).

Tabela 1. Representação da amostra do estudo em humanos (Silva et al., 2006).

Grupos	Número de espécimes (n)/dias			Total espécimes(n)
	7dias	30 dias	90dias	
Solução salina	4	5	5	14
Hipoclorito de sódio	4	5	6	15
Digluconato de clorexidina	4	5	4	13
Total de espécimes (n)	12	15	15	42

Solução salina (grupo controle): cloreto de sódio 0,9% - Áster Produtos Médicos, SP, Brasil; Hipoclorito de sódio 5,25%: Uso Indicado (Farmácia de Manipulação) Digluconato de Clorexidina 2%: FGM Produtos Odontológicos, SC, Brasil

Tabela 2. Representação da amostra do estudo em suínos (Leites 2006).

Grupos	Número de espécimes (n)/dias		Total espécimes(n)
	7dias	70dias	
Hidróxido de cálcio*	8	6	14
MTA**	13	13	26
Total de espécimes	21	19	40

* Dycal[®], Denstply Caulk, Milford, EUA.

** Angelus[®], Londrina, PR, Brasil.

Pequenas modificações na execução da técnica imunoistoquímica também ocorreram, visando apenas simplificar e aprimorar os passos desta técnica. Tais alterações foram: utilização do complexo LSAB (Labelled Streptavidin Biotin DAKO[®]) e a solução substrato cromógeno DAKO[®].

O estudo imunoistoquímico foi executado pela doutoranda. A mesma recebeu treinamento para realização da técnica no laboratório de imunoistoquímica desta Faculdade de Odontologia sob os cuidados das professoras orientadora e co-orientadoras.

ARTIGO 1

ARTIGO 1

Formatado para a revista – International Endodontic Journal

Expressão imunoistoquímica da tenascina e fibronectina no reparo pulpar em humanos, após capeamento com Ca(OH)_2 utilizando diferentes agentes hemostáticos.

Resumo

Objetivo Com base na reconhecida importância da matriz extracelular (ME) no desenvolvimento e reparo teciduais, o presente estudo objetiva investigar a expressão de suas duas maiores glicoproteínas, tenascina (TN) e fibronectina (FN), na cicatrização de polpas humanas capeadas com cimento de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), após uso de diferentes agentes hemostáticos.

Metodologia Utilizando a técnica imunoistoquímica, foi analisada a expressão de TN e FN em 42 dentes humanos provenientes de estudo prévio. Tal expressão foi avaliada nos períodos de 7, 30 e 90 dias após exposição e capeamento pulpares, seguindo a hemostasia efetuada com diferentes agentes (solução salina 0,9%, digluconato de clorexidina 2% ou hipoclorito de sódio 5,25%).

Resultados Considerando cada intervalo de tempo, não houve diferença quanto ao padrão de expressão da TN e FN entre os diferentes agentes hemostáticos estudados. As duas glicoproteínas distribuíram-se sempre por todo o tecido pulpar, acompanhando a fibra colágena e estiveram ausentes em todos os tecidos mineralizados. Aos 7 dias, observou-se imunorreatividade positiva discretamente mais acentuada no sítio da exposição pulpar. Após 30 dias de reparo, as duas glicoproteínas demonstraram expressão mais pronunciada ao redor da barreira dentinária e a TN expressou-se ainda em áreas focais no interior da dentina reparativa em fase de mineralização. Aos 90 dias, foi observada marcação linear da TN e FN, delimitando a barreira dentinária. Na pré-dentina a TN revelou-se fortemente positiva, exibindo este sítio padrão de expressão variável para a FN.

Conclusão Com base nos resultados pode-se concluir que, não houve diferença quanto ao padrão de expressão das glicoproteínas estudadas entre os diferentes agentes hemostáticos. Além disso, TN e FN estiveram presentes no reparo pulpar, confirmando sua ativa participação neste evento. Sugere-se que ambas glicoproteínas devam ser responsáveis pela diferenciação e manutenção da morfologia das células odontoblastóides, bem como tenham importante atuação na mineralização da matriz dentinária neoformada.

Palavras-chave: reparo pulpar, capeamento pulpar, agentes hemostáticos, imunoistoquímica, tenascina, fibronectina.

Tenascin and fibronectin expression in human pulp repair after capping with calcium hydroxide and homeostasis with different agents.

Abstract

Aim Based on the great importance of the extracellular matrix (EM) in tissue development and repair, the aim of this study was to investigate the expression of their major glycoproteins, tenascin (TN) and fibronectin (FN) in the human pulp repair.

Methodology Using immunohistochemistry, the expression of TN and FN was analyzed in forty-two human teeth, which were taken from a previous study. TN and FN profiles were evaluated after 7, 30, and 90 days after pulp capping with calcium hydroxide, being used three different haemostatic agents (0.9% saline solution, 5.25% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine digluconate) before pulp capping.

Results There was no difference in the expression of TN and FN among the distinct haemostatic agents being all the time intervals taken into consideration. Both glycoproteins were found in all the pulp tissue, accomplishing the collagen fiber, and they were absent in all the mineralized tissues. Within 7 days post-treatment, it was observed a slightly more pronounced immunostaining on the exposure pulp site. Within 30 days, TN and FN demonstrated a stronger expression around the dentin barrier. TN also showed focal staining inside the reparative dentin, which was in mineralization. Within 90 days, it was observed a thin and linear expression of TN and FN delimitating the reparative dentin. In the predentin, TN showed strong immunostaining, and FN had a variable expression.

Conclusions Based on the results, it may be concluded that there was no difference in the expression of TN and FN among the distinct haemostatic agents being all the time intervals taken into account. Moreover, TN and FN were present in pulp repair, confirming their active participation in this event. It might also be suggested that both glycoproteins are responsible for the odontoblastic differentiation and for the maintenance of the cell shape. It can also be concluded that TN and FN are important factors in the mineralization of the newly-formed dentin matrix.

Keywords: pulp repair, pulp-capping, haemostatic agents, immunohistochemistry, tenascin, fibronectin.

Expressão imunoistoquímica da tenascina e fibronectina no reparo pulpar em humanos, após capeamento com Ca(OH)₂ utilizando diferentes agentes hemostáticos.

Introdução

Os componentes da matriz extracelular (ME) do tecido conjuntivo pulpar participam ativamente dos processos fisiológicos e patológicos que nele ocorrem (Linde 1985). A fibronectina (FN) e a tenascina (TN) destacam-se como as duas maiores glicoproteínas da ME (Chiquet-Ehrismann 1990), mediando uma variedade de interações celulares com a mesma e desempenhando importantes funções no desenvolvimento, adesão, migração, morfofisiologia, proliferação e diferenciação celulares (Hynes 1985, Yamada & Clark 1996).

A TN é um hexâmero cujas unidades são unidas por pontes dissulfídicas, com pesos moleculares variando de 190 a 320kDa, conforme a espécie (Spring *et al.* 1989). Nos vertebrados são observadas quatro tenascinas (TN-C, R, X e W), (Chiquet-Ehrismann 2004), sendo a TN-C amplamente expressada durante a embriogênese e transitoriamente expressada durante a organogênese. A TN está ausente ou muito reduzida nos órgãos desenvolvidos, mas reaparece sob condições patológicas causadas por infecções, inflamações ou durante a tumorigênese (Chiquet-Ehrismann & Chiquet 2003,). Sua indução ocorre por múltiplos fatores extrínsecos, incluindo fatores de crescimento, proteinases e forças mecânicas (Jones & Jones 2000,).

FNs são uma classe de glicoproteínas adesivas de alto peso molecular (220 kDa), constituídas por duas cadeias de polipeptídeos unidas por pontes dissulfídicas (Hynes & Yamada 1982). Estão presentes no plasma, tecido conjuntivo e na superfície celular (Ruoslahti 1981). Possuem múltiplas formas que se originam de *splicings* alternativos de um único mRNA que pode gerar mais de 20 variantes em humanos (Kosmehl *et al.* 1996). Está envolvida na adesão, migração e diferenciação celulares, organização do citoesqueleto, assumindo um importante papel no desenvolvimento embrionário (Yamada & Olden 1978, Ruoslahti 1981, Dufour *et al.* 1986, Duband *et al.* 1986, Steele *et al.* 1992), bem como na transformação neoplásica (Labat-Robert *et al.* 1980), fagocitose (van de Water *et al.* 1981) e hemostasia (Mosher *et al.* 1979).

No desenvolvimento dentário, TN e FN estão presentes na membrana basal dental (Thesleff *et al.* 1979, 1981, 1987, Lesot *et al.* 1981, Linde *et al.* 1982), tendo sido sugerido o envolvimento dessas glicoproteínas na polarização e diferenciação odontoblástica e na deposição de matriz dentinária a ser mineralizada (Lesot *et al.* 1981, Thesleff *et al.* 1981, Ruch 1987, Thesleff *et al.* 1989, Garbarsch *et al.* 1994), as quais devem ter sua expressão estimulada por fatores de crescimento (Sahlberg *et al.* 2001).

Esses eventos sinalizadores parecem ser recapitulados na dentinogênese reparativa (Magloire *et al.* 1988, Smith & Lesot 2001). Esta inicia com o recrutamento de células progenitoras ou células-tronco, que diferenciam-se em uma nova geração de células odontoblastóides, as quais substituem a população odontoblástica injuriada e têm capacidade formadora de barreira dentinária (Smith 2003).

Dentre os materiais bioestimuladores do reparo pulpar, o hidróxido de cálcio Ca(OH)_2 tem sido um dos mais utilizados com sucesso no capeamento direto (Schröder 1972, 1985, Horsted-Bindslev *et al.* 2003). Apesar de sua ampla utilização por mais de 60 anos (Zander, 1939), seu mecanismo de ação na indução da dentinogênese reparativa e na formação da barreira dentinária ainda não está completamente elucidado (Stanley 1998, Graham *et al.* 2006, Piva *et al.* 2006). Recentemente, Piva *et al.* (2006) investigaram a expressão imunoistoquímica da TN e da FN, nos estágios iniciais do reparo pulpar, seguindo o capeamento pulpar com Ca(OH)_2 e sugeriram que a diferenciação das células pulpares em células odontoblastóides pode ser regulada pela expressão coordenada dessas glicoproteínas. Há fortes evidências de que o Ca(OH)_2 tem a capacidade de solubilizar componentes da ME, liberando moléculas bioativas como TGF- β 1, presentes na dentina e com capacidade para desencadear a diferenciação odontoblástica e a deposição de dentina reparativa (Graham *et al.* 2006).

Para o sucesso do capeamento pulpar é também importante o controle do sangramento (Stanley 1989, 1998). Assim, diversas substâncias hemostáticas têm sido colocadas sobre a exposição pulpar como solução salina (Hebling *et al.* 1999, Horsted *et al.* 1981, Kitasako *et al.* 1998), peróxido de hidrogênio (Horsted *et al.* 1981), digluconato de clorexidina (Pameijer & Stanley 1998, Horsted-Bindslev *et al.* 2003, Silva *et al.* 2006) e hipoclorito de sódio (Cox *et al.* 1998, 1999, Hafez *et al.* 2002, Silva *et al.* 2006), sendo avaliados os seus efeitos no processo de cicatrização

pulpar (Horsted-Bindslev *et al.* 2003, Accorinte *et al.* 2005, Silva *et al.* 2006). Apesar de não apresentarem diferenças entre a resposta pulpar dos materiais em estudo histológico (Silva *et al.*, 2006) e tendo em vista que os procedimentos de exposição pulpar já seriam fatores de agressão à polpa, deveria-se evitar o uso de qualquer outro agente que pudesse ter um efeito deletério (Horsted-Bindslev *et al.* 2003). No entanto, a diferente capacidade de solubilização dos tecidos dentários pelos diferentes agentes de hemostasia poderia ter um efeito diverso sobre a expressão da matriz extracelular e isto não foi ainda determinado.

Baseados nestas evidências, o presente estudo se propôs a investigar a expressão imunistoquímica das glicoproteínas TN e FN em polpas humanas expostas, tratadas com diferentes agentes hemostáticos e capeadas com cimento de Ca(OH)_2 .

Materiais e métodos

Obtenção dos espécimes

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (no.01/05) (Anexo 1) e utilizou espécimes emblocados do estudo de Silva *et al.* (2006) (Anexo 2), referentes aos 42 terceiros molares humanos de indivíduos com idade média de 23 anos, extraídos por razões ortodônticas. Nesses dentes foram preparadas cavidades de classe I, sendo realizada a exposição pulpar com broca carbide #330 (KG Sorensen Ind. & Com. Ltda.). O controle do sangramento foi realizado através de solução salina 0,9% (controle), digluconato de clorexidina 2% ou hipoclorito de sódio 5,25% (Tabela 1), os dentes capeados com cimento de Ca(OH)_2 (Dycal Advanced formula II, Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) e restaurados com resina composta (Filtek Z250, 3M ESPE). De acordo com as instruções da International Standardization Organization (ISO-7405 1997) os dentes foram extraídos após 7, 30 ou 90 dias (Tabela 1), fixados em solução de formol 10% por 48h, desmineralizados em ácido fórmico a 20% e emblocados em parafina.

Tabela 1. Representação da amostra do estudo

Grupos	Número de espécimes (n)/dias			Total espécimes(n)
	7dias	30 dias	90dias	
Solução salina	4	5	5	14
Hipoclorito de sódio	4	5	6	15
Digluconato de clorexidina	4	5	4	13
Total de espécimes (n)	12	15	15	42

Solução salina (grupo controle): cloreto de sódio 0,9% - Áster Produtos Médicos, SP, Brasil; Hipoclorito de sódio 5,25%: Uso Indicado (Farmácia de Manipulação) Digluconato de Clorexidina 2%: FGM Produtos Odontológicos, SC, Brasil.

Método imunoistoquímico

Após microtomia realizada a 3µm de espessura, os cortes foram desparafinizados e reidratados, sendo em seguida procedida a recuperação antigênica com pepsina (Tabela 2). Posteriormente, as secções foram imersas em peróxido de hidrogênio 6%, acrescido de metanol (1:1), para o bloqueio da peroxidase endógena. Após lavagem em Tris-hidroxi-metil-aminometano (TRIS, Sigma, St. Louis, USA), pH 7.4, as secções foram incubadas com os anticorpos primários anti-TN e anti-FN, os quais foram diluídos em solução tampão fosfato (PBS) contendo 0,1% de albumina bovina sérica (BSA). As diluições, especificações, fontes, tratamentos prévios e tempo de incubação de cada anticorpo utilizado estão relacionados na tabela 2.

Após a incubação com anticorpo primário, as secções foram lavadas e expostas ao complexo LSAB (Labelled Streptavidin Biotin DAKO®), com 30 min de incubação do anticorpo secundário biotilado e a seguir, por mais 30 min, o conjugado Streptoavidina- peroxidase, conforme especificações do fabricante.

Para revelação da reação foi utilizado o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAKO®), sendo os cortes contracorados com hematoxilina de Mayer. Foram procedidas, em seguida a desidratação, diafanização e montagem em Permount® das secções histológicas.

Em cada reação foram incluídos controles negativos, substituindo os anticorpos anti-TN e anti-FN por BSA. Tecidos referentes à mucosa bucal em processo de reparo (épulis fissurados ulcerados) e também a marcação perivascular já conhecida da TN e FN, foram utilizados como controles positivos externos e internos, respectivamente.

Tabela 2 – Anticorpos primários - suas especificidades, diluições, fontes e tratamentos prévios

Ac. CLONE	ESPECIFICIDADE	DIL.	FONTE	TRATAMENTO PRÉVIO	INC.
APA	Fibronectina	1:1200	Dako*	Pepsina 1%, 37°C, 60'	120', 37°C
BC-24	Tenascina	1:3000	Sigma**	Pepsina 0,5%, 37°C, 30'	18h, 4°C

* Dako, AIS, Glostrup, Denmark

** Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

Análise do perfil imunoistoquímico

Realizou-se a análise descritiva, de todos os espécimes referentes aos três agentes hemostáticos empregados, nos intervalos de 7, 30 e 90 dias de pós-operatório. Foi investigado o padrão de marcação imunoistoquímica dos antígenos FN e TN e a localização destas glicoproteínas nos tecidos dentários (tecido pulpar, área de exposição, barreira dentinária, dentina reacional, pré-dentina, bem como dentinas mineralizadas primária e secundária). Esta análise foi realizada utilizando microscopia óptica, por dois examinadores experientes devidamente calibrados.

Resultados

Para todos os espécimes, em cada intervalo de tempo avaliado, o padrão de marcação para TN foi semelhante, independente do agente hemostático utilizado. Também para FN, o perfil de marcação imunoistoquímica não apresentou diferença entre as amostras referentes aos agentes hemostáticos solução salina 0,9%, digluconato de clorexidina 2,0% e hipoclorito de sódio 5,25%, utilizados neste estudo, em 7, 30 e 90 dias pós-capeamento.

Tecido pulpar, sítio da exposição, barreira dentinária e dentina reacional

As glicoproteínas FN e TN, distribuíram-se, em todos os intervalos de tempo, por todo o tecido pulpar, sempre acompanhando as fibras colágenas e ao redor da parede dos vasos sanguíneos presentes (controles positivos internos), exibindo um padrão de marcação reticular (Figs. 1A a 1G e Figs 2A a 2F). Quando foram observadas áreas de maior condensação das fibras colágenas, especialmente na região imediatamente subjacente à exposição pulpar, a TN e a FN também demonstraram padrão de marcação mais espessado. No entanto, cabe ressaltar que o padrão de marcação imunoistoquímica da FN mostrou-se mais delicado do que o da TN, sendo fibrilar e também sempre acompanhando as fibras colágenas.

Aos sete dias TN (Figs. 1A e 1B) e FN (Figs. 2A e 2B) apresentaram marcação imunoistoquímica discretamente mais acentuada na região subjacente à exposição pulpar.

Na maioria das amostras do intervalo de 30 dias, a barreira dentinária (preferencialmente constituída por osteodentina ou fibrodentina) e a dentina reacional foram encontradas, freqüentemente contínuas uma à outra, com a TN delimitando-as subjacentemente, contornando essas dentinas terciárias e estando muitas vezes espessada nessas áreas (Figs 1C a 1E). Também foram observadas áreas focais de imunorreatividade para a TN no interior das dentinas reparativa e reacional (Figs 1C a 1E), tecidos esses, neste período, em fase de mineralização. Em um espécime em que alguns fragmentos dentinários estavam incluídos no interior do tecido pulpar, observou-se que a fibrodentina depositada ao seu redor demonstrou o mesmo padrão de marcação imunoistoquímica descrito para a barreira dentinária e para a dentina reacional, sendo espessado ao redor desses sítios.

Neste mesmo período, para FN, a dentina terciária não exibiu imunorreatividade (Figs 2C e 2D). Entretanto, o tecido pulpar visto de permeio a ela e o imediatamente subjacente, foi fortemente imunorreativo (Figs 2C e 2D), especialmente as áreas em que as células odontoblastóides se alinhavam. No espécimes em que alguns fragmentos dentinários estavam incluídos no interior do tecido pulpar, a fibrodentina também não exibiu marcação imunoistoquímica para FN, sendo notado contorno linear delicado circundando este tecido.

Aos noventa dias após o capeamento pulpar, foi observada marcação linear fina e delicada delimitando a barreira dentinária, subjacentemente, tanto para TN (Figs. 1F e 1G) quanto para FN (Figs. 2E e 2F). Entretanto, as duas glicoproteínas não expressaram imunorreatividade nas áreas das dentinas reparativa e reacional (Figs. 1F e 1G; Figs. 2E e 2F).

Pré-dentina, dentina primária e secundária

Em todos os períodos avaliados a TN mostrou forte imunorreatividade na pré-dentina (Figs 1A a 1C). Em contraste, para o antígeno FN, a pré-dentina revelou padrão de marcação fraco (Fig 2E), estando muitas vezes ausente (Figs. 2A e 2B). Em todos os intervalos de tempo não se observou imunorreatividade nas dentinas primária e secundária, tanto para TN (Figs 1A a 1D e 1F) quanto para FN (Figs 2A a 2C e 2E).

Figuras 1A – 1G – Expressão imunoistoquímica da TN no reparo pulpar humano:

Fig. 1A – Expressão de TN em todo o tecido pulpar, aos 7 dias de pós-operatório (solução salina a 0,9%), acompanhando a fibra colágena e exibindo padrão levemente mais pronunciado no sítio da exposição pulpar. (X40).

Fig. 1B – Maior aumento de 1A no sítio da exposição. Note a imunorreatividade positiva para este marcador também presente na pré-dentina (seta) e ao redor dos vasos sanguíneos (controle positivo). Ausência de marcação nas dentinas primária e secundária (X100).

Fig. 1C – Intervalo de 30 dias de pós-operatório, hipoclorito de sódio a 5,25%. Barreira dentinária demonstrando vários focos de imunorreatividade para a TN no seu interior, sendo também presente em todo o tecido conjuntivo pulpar e na pré-dentina. Dentinas fisiológicas negativas para TN (X40).

Fig 1D – Maior evidência para a expressão imunoistoquímica da TN na barreira dentinária e no tecido conjuntivo imediatamente subjacente (X100).

Fig. 1E - Em destaque, a dentina reparativa vista em 1C e 1D, ressaltando a marcação positiva da TN em áreas focais (*) (X200).

Fig. 1F – Noventa dias de pós-operatório (solução salina a 0,9%), revelando ausência de imunorreatividade para a TN nos tecidos mineralizados das dentinas reparativa e fisiológicas. Positividade restrita ao tecido conjuntivo pulpar subjacente e à pré-dentina (X40).

Fig. 1G – Maior aumento de 1F, ressaltando a barreira dentinária tunelizada negativa para a TN e a imunorreatividade do tecido pulpar na sua vizinhança (X100). Hidróxido de cálcio (*).

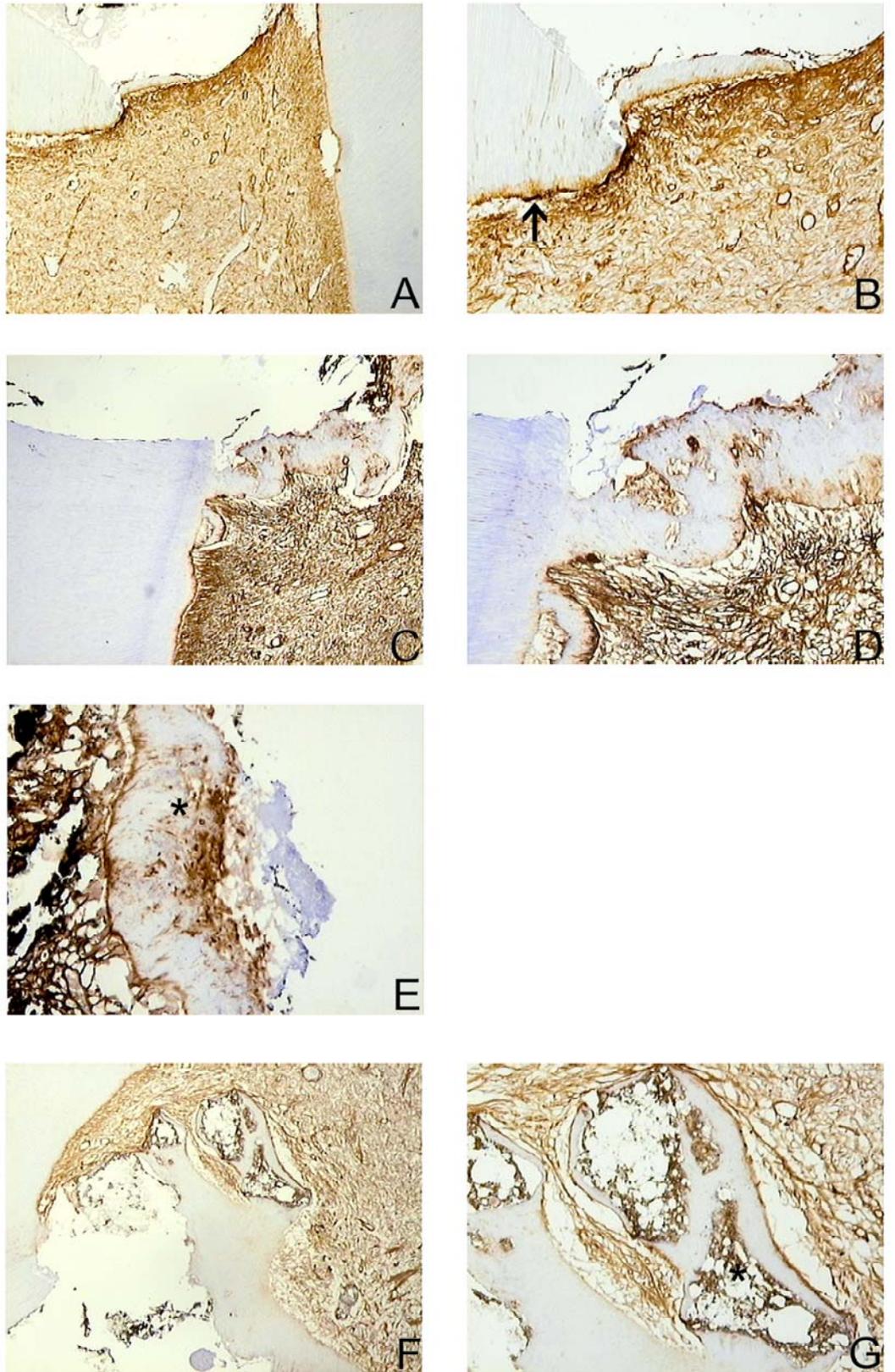


Figura 1

Figuras 2A – 2F - Expressão imunoistoquímica da FN no reparo pulpar humano:

Fig.2A – Marcação imunoistoquímica da FN em espécimes de 7 dias de pós-operatório, com hemostasia feita com (hipoclorito de sódio a 5,25%), revelando padrão fibrilar delicado presente por todo o tecido pulpar. (X40).

Fig. 2B – Maior aumento de 2A, com evidência para a interface entre o material capeador e a área da exposição pulpar. Controles internos perivasculares positivos. Dentinas mineralizadas sem imunorreatividade. Pré-dentina negativa para a FN (seta) (X100).

Fig. 2C – FN aos 30 dias (digluconato de clorexidina a 2%), revelando padrão delicado de expressão no tecido pulpar, sendo mais espessado na vizinhança da barreira dentinária e ao redor dos vasos sanguíneos. Dentinas reparativa e fisiológicas negativas (X40).

Fig. 2D – Maior aumento de 2C, com destaque para o padrão mais condensado da FN no tecido conjuntivo pulpar de permeio à barreira de osteodentina (*) e nos sítios perivasculares (seta) (X100).

Fig 2E – Intervalo de 90 dias, solução salina a 0,9%. Marcação linear fina e delicada da FN, a qual delimita a barreira dentinária subjacentemente, sendo notada fraca imunorreatividade na área da pré-dentina e marcação mais forte na região interodontoblástica (seta). Esta glicoproteína não demonstra imunorreatividade na área da dentina reparativa.

Fig 2F – Ampliação de 2E, ressaltando a ausência de marcação da barreira dentinária para a FN (X100).

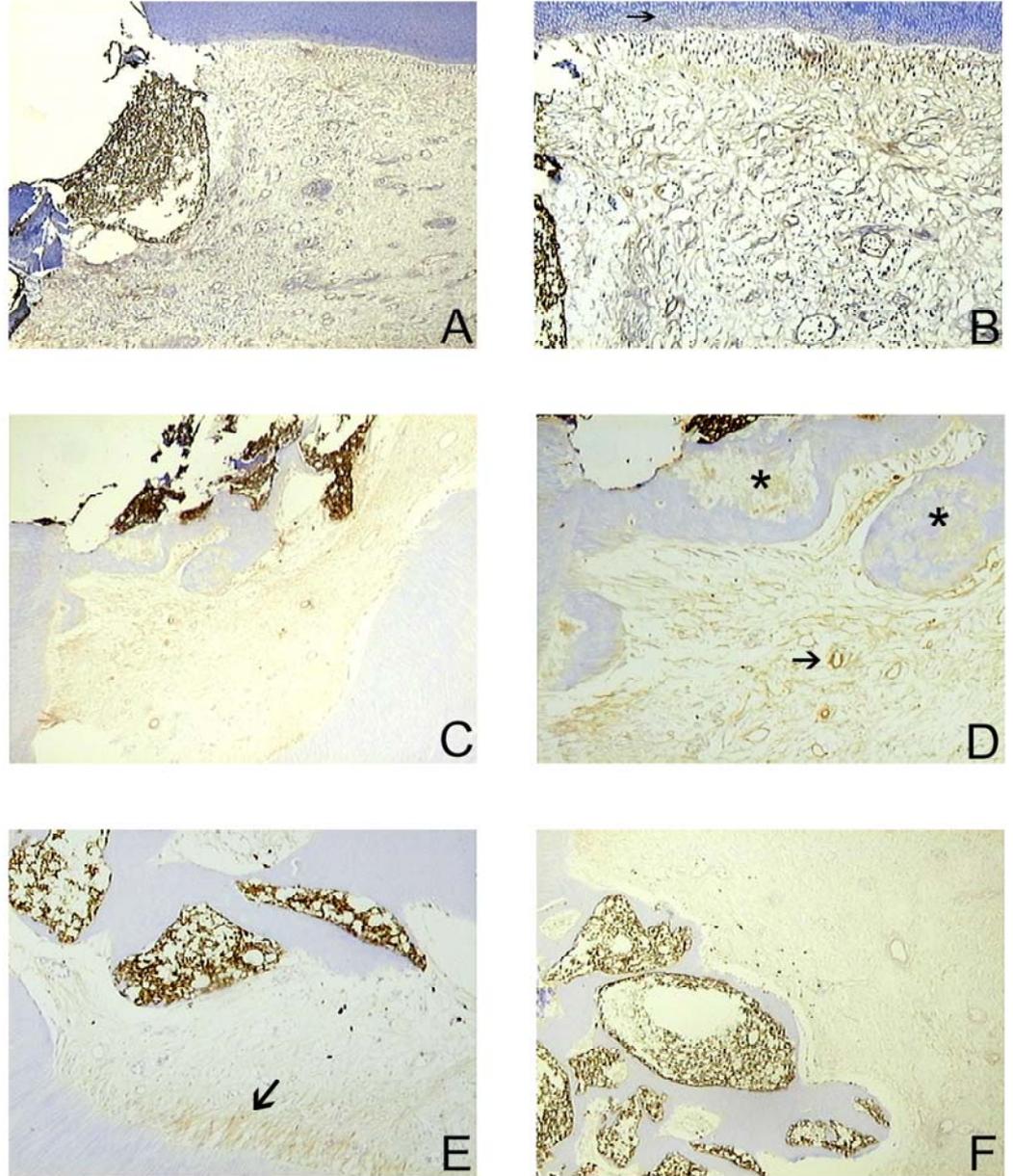


Figura 2

Discussão

A terapia pulpar vital tem por objetivo manter a integridade morfofuncional da polpa (Tziafas *et al.* 2001). O Ca(OH)_2 vem sendo usado como material de capeamento pulpar e ainda é considerado o padrão-ouro (Goldberg & Smith 2004) contra o qual outros materiais são avaliados (Stanley 1998, Horsted-Bindslev *et al.* 2003, Graham *et al.* 2006). Mesmo assim, ainda não está totalmente esclarecido seu mecanismo de ação na indução da dentinogênese (Graham *et al.* 2006). O efeito do Ca(OH)_2 tem sido considerado como resultado da injúria química causada por ele, a qual leva a uma irritação do tecido vital abaixo da camada necrótica, estimulando o processo de reparo na polpa, através de mecanismos ainda pouco esclarecidos (Graham *et al.* 2006). Essa irritação, segundo Smith (2003), poderia ser explicada pelo efeito solubilizante do Ca(OH)_2 sobre a dentina, liberando moléculas bioativas e resultando na sinalização celular que levaria à regeneração da dentina (Smith *et al.* 1995, Graham *et al.* 2006).

A resposta da polpa ao Ca(OH)_2 previamente descrita (Schröder 1985, Stanley 1989, Mjör *et al.* 1991) foi igualmente observada nas amostras do estudo de Silva *et al.* (2006), que foram analisadas também no presente estudo, sendo demonstrado que os agentes hemostáticos utilizados não prejudicaram o processo de reparo. Apesar do estudo histológico destes espécimes ter revelado uma tendência à formação de uma barreira dentinária mais organizada, quando as soluções testes foram utilizadas (digluconato de clorexidina 2,0% e hipoclorito de sódio 5,25%), não foram observadas diferenças na expressão da TN e da FN no reparo, mediante estes agentes hemostáticos, comparados à solução salina (controle).

As glicoproteínas estudadas demonstraram padrão de expressão semelhante por todo o tecido conjuntivo pulpar, acompanhando sempre a fibra colágena, num padrão reticular e concentrando-se ao redor dos vasos sanguíneos, como já foi observado em estudos prévios, em dentes humanos permanentes (van Amerongen *et al.* 1984, Yoshida *et al.* 1996, Martinez *et al.* 2000). A TN demonstrou, porém, padrão de marcação menos delicado e mais pronunciado. Tal padrão de marcação imunistoquímica é esperado, uma vez que essas glicoproteínas adesivas são constituintes da matriz da polpa dental adulta (van Amerongen *et al.* 1984, Karjalainen *et al.* 1986, Lukinmaa *et al.* 1991, Martinez *et al.* 2000). Também tem sido documentada na literatura a limitada distribuição da TN, estando a mesma ausente

em muitos tecidos conjuntivos maduros (Chiquet *et al.* 1986, Chiquet-Ehrismann & Chiquet 2003). Entretanto, na polpa dental, sua expressão está bem estabelecida (van Amerongen *et al.* 1984, Karjalainen *et al.* 1986, Lukinmaa *et al.* 1991, Martinez *et al.* 2000). A relativa quantidade dessas duas glicoproteínas pode ter significado na regulação da estrutura tecidual (Lukinmaa *et al.* 1991). Thesleff *et al.* (1987) sugeriram que a abundância de TN no tecido pulpar está associada com a manutenção da capacidade deste tecido em diferenciar-se em células formadoras de tecidos mineralizados.

Este estudo também demonstrou marcação imunoistoquímica das duas glicoproteínas na região interodontoblástica, para todos os intervalos de tempo e substâncias estudados, como tem sido relatado na literatura (Linde *et al.* 1982, Farges *et al.* 1995, van Amerongen *et al.* 1984, Karjalainen *et al.* 1986, Lukinmaa *et al.* 1991, Yoshida *et al.* 1994, Yoshida *et al.* 1995, Yoshida *et al.* 1996). Alguns autores sugerem que as fibras com marcação positiva para FN nessa área da polpa, poderiam corresponder às fibras de von Korff e que elas poderiam atuar como um arcabouço para o alongamento e migração dos odontoblastos, contribuindo também para a manutenção da morfologia específica dessas células, graças a sua adesão ao pólo distal odontoblástico (Yoshida *et al.* 1996). Outros estudos tornam-se necessários para confirmar tal correspondência, tendo em vista que ainda há controvérsias em relação à denominação mais adequada para essas fibras (Ten Cate, 1998). Todavia, parece-nos sensato concluir que, por analogia à odontogênese primária (Yoshida *et al.* 1995), uma matriz rica em FN deve desempenhar importante papel durante a dentinogênese reparativa (Yoshida *et al.* 1996). Não somente na diferenciação odontoblástica, migração e adesão celulares, mas também que tal matriz parece atuar sobre a célula odontoblastóide, auxiliando a manutenção de sua estruturação morfológica, bem como a formação da barreira dentinária (Kitasako *et al.* 2002).

Na área de exposição, sete dias após o capeamento, tanto a TN quanto a FN foram detectadas discretamente mais acentuadas, subjacentemente a este sítio. Localização semelhante no reparo pulpar foi verificada por outros autores (Yoshida *et al.* 1996, Piva *et al.* 2006).

Mais uma vez constata-se, o que vem sendo divulgado na literatura, que a dentinogênese reparativa recapitula a dentinogênese primária (Smith & Lesot 2001). No desenvolvimento dentário, ambas glicoproteínas, estão localizadas na membrana

basal e acredita-se estarem envolvidas no alinhamento e diferenciação das células da papila dental em odontoblastos (Lesot *et al.* 1981, Thesleff *et al.* 1989), na presença de fatores de crescimento como o *transforming growth factor-β*, TGF-β (Smith *et al.* 1998). No reparo pulpar, alguns autores demonstraram que uma rede de FN e fibrina, em contato com cristais do cimento de Ca(OH)₂, poderiam mediar a migração, proliferação e adesão de células que sintetizariam uma matriz de fibrodentina rica em FN, culminando com sua diferenciação em células semelhantes aos odontoblastos (Tziafas *et al.* 1992, 1995, Yoshida *et al.* 1996). Desta maneira, a fibrodentina rica em FN desempenharia papel similar ao da membrana basal (Ruch 1985), demarcando o papel fundamental da FN como molécula adesiva que ela é, a qual é capaz de proporcionar interação entre as células odontoblastóides e essa matriz primitiva (Veis 1985). Além disso, a FN também tem sido relacionada à diferenciação odontoblástica, sob ação de agentes capeadores, em estudos *in vitro* (Seux *et al.* 1991, Veron *et al.* 1990).

Como uma glicoproteína anti-adesiva que é, a TN por sua vez, pode agir modulando a relação adesiva entre a célula precursora da célula odontoblastóide e a FN, modificando-a e possibilitando, desta forma, a sua migração (Orend & Chiquet-Ehrismann 2000), através da criação de uma via de menor resistência de permeio a uma matriz rica em FN (Chiquet-Ehrismann *et al.* 1986, Thesleff *et al.* 1987, Mackie *et al.* 1988, Sage & Bornstein 1991, Horibe *et al.* 2004). Isto explicaria a co-expressão dessas duas glicoproteínas com funções antagônicas num mesmo sítio da exposição pulpar, região envolvida com o reparo, como se observa em outras condições patológicas relacionadas à cicatrização de feridas, nas quais a expressão de TN-C tem sido associada à da FN (Chiquet-Ehrismann & Chiquet 2003).

Aos 30 dias, foi demonstrada marcante imunorreatividade para TN e FN, delimitando e contornando subjacentemente a barreira dentinária de fibrodentina e osteodentina, bem como a dentina reacional. A TN expressou-se em áreas focais, no interior desta matriz em fase de mineralização. Esta localização tem importante significado no que diz respeito à função que a expressão de TN exerce sobre as matrizes extracelulares que serão posteriormente mineralizadas (Thesleff *et al.* 1987, Lukinmaa *et al.* 1991, Tucker *et al.* 1991, Martinez *et al.* 2000). Esta glicoproteína parece atuar na regulação da diferenciação de células envolvidas na formação dessas matrizes. Neste intervalo de tempo, é bem provável que a barreira dentinária formada, ainda não tenha completado sua total mineralização, razão pelo qual

acreditamos que a mesma permaneça exibindo áreas focais de TN em seu interior. Pode-se assim, estabelecer um paralelo entre a expressão positiva de TN em sítios focais da barreira dentinária em fase intermediária de mineralização com a marcante imunorreatividade para TN na pré-dentina, em todos os períodos avaliados, pois esta última também é considerada frente de mineralização, ou seja, matriz dentinária que prepara-se para ser mineralizada. A presença da TN entre tecido mineralizado e não mineralizado implica na função desta glicoproteína em mediar o estresse mecânico (Lukinmaa *et al.* 1991). Martinez *et al.* (2000) sugeriram também a associação da TN com a elaboração da dentinogênese secundária, facilitando a migração e diferenciação celulares.

Por outro lado, a TN esteve ausente na barreira dentinária aos 90 dias e nas dentinas sadias primária e secundária, bem como na dentina reacional, em todos os intervalos de tempo, concordando com outros estudos reportados na literatura (Lukinmaa *et al.* 1991, Karjalainen *et al.* 1986, Farges *et al.* 1995, Yoshida *et al.* 1995, Thesleff *et al.* 1991, van Amerongen *et al.* 1994, Piva *et al.* 2006).

A FN, aos 30 dias, não foi observada nas dentinas terciárias reparativa e reacional. Entretanto, o tecido pulpar vizinho e envolvido pela fibra e osteodentina também foi positivo para esta glicoproteína. Yoshida *et al.* (1996) demonstraram, em período aproximado de acompanhamento, marcação semelhante para FN, a qual expressava-se ao redor das células embebidas na matriz dentinária irregularmente depositada. Este achado reafirma o papel crucial da FN na diferenciação odontoblástica e na manutenção da morfologia da célula odontoblastóide, alinhada sob a barreira dentinária (Karjalainen *et al.* 1986, Magloire *et al.* 1988).

A presença da FN na pré-dentina não está bem estabelecida na literatura, sendo considerada por vários autores um tanto controversa (Lukinmaa *et al.* 1991). No desenvolvimento dentário, em ratos, esta glicoproteína foi evidenciada na pré-dentina nos estágios iniciais estando ausente na matriz de pré-dentina sintetizada por odontoblastos totalmente diferenciados (Thesleff *et al.* 1979, Lesot *et al.* 1981, Thesleff *et al.* 1981, Linde *et al.* 1982). Alguns autores sugeriram que esta glicoproteína não é um constituinte da pré-dentina humana (Lukinmaa *et al.* 1991, Karjalainen *et al.* 1986). Outros mostraram sua expressão na pré-dentina (Yoshida *et al.* 1996, Piva *et al.* 2006), justificando que nesta localização FN poderia contribuir com a adesividade entre a camada de odontoblastos e a matriz não mineralizada (Chada & Bishop, 1996). Além disso, fibras colágenas interodontobásticas

associadas com FN foram observadas penetrando a pré-dentina (Kitasako *et al.* 2002), o que por vezes também observamos em nossas amostras. Entretanto, no presente estudo não houve marcação uniforme da FN na pré-dentina, sendo em algumas áreas fracamente visível e em outras inexistente. De acordo com Yoshida *et al.* (1995), nesta localização a FN parece existir associada com a matriz de colágeno pré-dentinal, mas para eles sua expressão foi também esparsa. Poderíamos, para justificar a variabilidade da expressão de FN na pré-dentina considerar, como Lukinmaa *et al.* (1991), que a FN perde sua antigenicidade em tecidos parafinados, o que explicaria a fraca expressão dessa glicoproteína em nossas amostras. Entretanto, parece-nos mais sensato considerar que a expressão de FN na pré-dentina tem mesmo um padrão variável em diferentes espécies (Lukinmaa *et al.* 1991) e ainda não está totalmente estabelecida pela literatura.

Desta forma, constata-se que o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no reparo pulpar humano, especialmente no âmbito das interações moleculares entre as células da polpa e a ME, devem, num futuro provavelmente bem próximo, apontar para um avanço da terapia pulpar, baseada na bioestimulação tecidual.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a importância dos componentes da ME, mais especificamente das glicoproteínas TN e FN, nos eventos que envolvem o reparo pulpar após capeamento com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e hemostasia com diferentes agentes.

Considerando cada intervalo de tempo, não houve diferença quanto ao padrão de expressão da TN entre os diferentes agentes hemostáticos estudados. O mesmo foi demonstrado para a FN. Estas duas glicoproteínas distribuíram-se por todo o tecido pulpar, acompanhando sempre a fibra colágena e estiveram ausentes nos tecidos mineralizados, o que corrobora os achados da literatura.

A expressão de TN em áreas focais no interior da barreira dentinária, aos 30 dias de pós-operatório e a sua forte imunorreatividade na pré-dentina, em todos os intervalos de tempo avaliados, parece estar relacionada com o papel dessa glicoproteína no preparo para a mineralização da matriz dentinária.

A expressão mais acentuada de FN no tecido pulpar vizinho à barreira dentinária aos 30 dias, parece reforçar o papel fundamental desta glicoproteína na diferenciação odontoblástica e na manutenção da morfologia da célula odontoblastóide, alinhada sob a ponte de dentina.

Referências

- Accorinte MLR, Loguercio AD, Reis A, Araújo VC (2005) Response of Human Pulp Capped with a Bonding Agent After Bleeding Control with Hemostatic Agents. *Operative Dentistry* **30**, 147-155.
- Chada S, Bishop MA (1996) Effect of mechanical removal of the pulp upon the retention of odontoblasts around the pulp chamber of human third molars. *Archives of Oral Biology* **41**, 905-909.
- Chiquet-Ehrismann R (1990) What distinguishes tenascin from fibronectin? *FASEB Journal* **4**, 2598-2604.
- Chiquet-Ehrismann R (2004) Tenascins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 986-990.
- Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M (2003) Tenascins: Regulation and putative functions during pathological stress. *Journal of Pathology* **200**, 488-499.
- Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T (1986) Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* **47**, 131-139.
- Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Mills JC (1999) Biological basis for clinical success: Pulp protection and the tooth-restoration interface. *Pract Periodontics Aesthetic Dent* **11**, 819-26.
- Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Suzuki M, Tarim B (1998) Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *American Journal of Dentistry* **11**, 55-63.
- Duband JL, Rocher S, Chen WT, Yamada KM, Thiery JP (1986) Cell adhesion and migration in the early vertebrate embryo: location and possible role of the putative fibronectin receptor complex. *J Cell Biology* **102**, 160-178.
- Dufour S, Duband JL, Thiery JP (1986) Role of a major cell-substratum adhesion system in cell behavior and morphogenesis. *Biology Cell* **58**, 1-13.
- Elias RV, Demarco FF, Tarquínio SBC, Piva E (2004) Pulp response to the application of a self-etching adhesive in human pulps, using sodium hypochlorite to control bleeding. *Quintessence International* in press.
- Farges JC, Joffre A, Lesot H, Bleicher F, Magloire H (1995) Immunocytochemical localization of fibronectin and a 165-kDa membrane protein in the odontoblast layer under initial carious lesions in man. *Archives of Oral Biology* **40**, 1023-1028.
- Garbarsch C, Matthiessen ME, Olsen BE, Moe D, Kirkeby S (1994) Immunohistochemistry of the intercellular matrix components and the epithelio-mesenchymal junction of the human tooth germ. *Histochemical Journal* **26**, 110-118.
- Goldberg M, Smith AJ (2004) Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* **15**, 13-27.
- Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith, AJ (2006) The effect of calcium Hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials* **27**, 2865-2873.
- Hafez AA, Cox CF, Tarim B, Otsuki M, Akimoto N (2002) An in vivo evaluation of hemorrhage control using sodium hypochlorite and direct capping with a one-or two-component adhesive system in exposed nonhuman primate pulps. *Quintessence International* **33**, 261-272.
- Hebling J, Giro E, Costa C (1999) Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. *Journal of Endodontic* **25**, 676-82.
- Horibe M, Sawa, T, Kataoka M.T, Kido J, Nagata T (2004) Regulation of tenascin expression in cultured rat dental pulp cells. *Odontology*, **92**, 22-26.
- Horsted P, El Attar K, Langeland K (1981) Capping of monkey pulps with Dycal and a Ca-eugenol cement. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* **52**, 531-553.

- Horsted P, Vilkinis V, Sidlaukas A (2003) Direct capping of human pulps with a dentin bonding system over with calcium hydroxide cement. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontic* **96**, 591-600.
- Horsted-Bindslev P, El Attar K, Langeland K (1981) Capping of monkey pulps with Dycal and a Ca-eugenol cement. *Oral Surgery Oral medicine Oral Pathology* **52**, 531-553.
- Hynes R (1985) Molecular biology of fibronectin. *Ann. Rev. Biol.* **1**, 67-90.
- Hynes RO, Yamada KM (1982) Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biology*, **95**, 369-377.
- ISO-7405 (1997) Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry; test methods for dental materials. International Organization for Standardization – **E**, 1-18.
- Jones PL, Jones FS (2000) Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biology* **19**, 581-596.
- Karjalainen S, Soderling E, Pelliniemi L, Foidart JM (1986) Immunohistochemical localization of types I and II collagen and fibronectin in the dentine of carious human teeth. *Archives of Oral Biology* **31**, 801-806.
- Kitasako Y, Shibata S, Cox CF, Tagami J (2002) Location, arrangement and possible function of interodontoblastic collagen fibres in association with calcium hydroxide-induced hard tissue bridges. *International Endodontic Journal* **35**, 996-1004.
- Kitasako Y, Inokishi S, Fujitani M, Otsuki M, Tagami J (1998) Short-term reaction of exposed monkey pulp beneath adhesive resins. *Operative Dentistry* **23**, 308-317.
- Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D (1996) Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Archives* **429**, 311-322.
- Labat-Robert J, Birembaut P, Adnet JJ, Mercantini F, Robert L (1980) Loss of fibronectin in human breast cancer. *Cell Biol Int Rep* **4**, 608-616.
- Lesot H, Osman M, Ruch JV (1981) Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Developmental Biology* **82**, 371-381.
- Linde A (1985) Session II: cells and extracellular matrices of the dental pulp. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. *Journal of Dental Research* **64**, 523-529.
- Linde A, Johansson S, Jonsson R, Jontel M (1982) Localization of Fibronectin during Dentinogenesis in Rat Incisor. *Arch Oral Biol* **27**, 1069-1073.
- Lukinmaa PL, Mackie EJ, Thesleff I (1982) Immunohistochemical Localization of the Matrix Glycoproteins – Tenascin and the ED-sequence-containing Form of Cellular Fibronectin – in Human Permanent Teeth and Periodontal Ligament. *Journal Dental Research* **70**, 19-26.
- Mackie EJ, Tucker RP, Halfter W, Chiquet-Ehrismann R, Epperlein HH (1988) The distribution of tenascin coincides with pathways of neural crest cell migration. *Development* **102**, 237-250.
- Magloire H, Joffre A, Hartmann DJ (1988) Localization and synthesis of type III collagen and fibronectin in human reparative dentine. *Histochemistry* **88**, 141-149.
- Martinez EF, de Souza SOM, Correa L, de Araújo VC (2000) Immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin, and type III collagen in human dental pulp. *Journal of Endodontics* **26**, 708-711.
- Mjor IA, Dahl E, Cox CF (1991) Healing of pulp exposures: an ultrastructural study. *Journal of Oral Pathology e Medicine*. **20**, 496-501.
- Mosher DF, Schad PE, Kleinman HD (1979) Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation Factor XIIIa. *J Clin Invest* **64**, 781-787.
- Orend G, Chiquet-Ehrismann R (2000) Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Experimental Cell Research* **261**, 104-110.
- Pameijer CH, Stanley H (1998) The disastrous effects of the “total Etch” technique in vital pulp capping in primates. *American Journal of Dentistry* **11**, S45-SS54.
- Piva E, Tarquínio SBC, Demarco FF, Silva AF, Araújo, VC (2006) Immunohistochemical expression of fibronectin and tenascin after direct pulp capping with calcium hydroxide. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontic*
- Ruch JV (1987) Determinisms of odontogenesis, *Cell Biol Rev* **14**, 1-86.
- Ruch, J.V. (1985) Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. *Journal of Dental Research* **64**, 489-498.
- Ruoslahti E (1981) Fibronectin. *Journal of Oral Pathology* **10**, 3-13.
- Sage EH, Bornstein P (1991) Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 14831-14834.
- Sahlberg C, Aukhil I, Thesleff I (2001) Tenascin-C in developing mouse teeth: expression of plice variants and stimulation by TGFβ and FGF. *European Journal of Oral Sciences* **109**, 114-124.
- Schröder U (1985) Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration,

- proliferation, and differentiation. *Journal Dental Research* **64**, 541-548.
- Schröder U, Granath IE (1972) Early reaction of intact human teeth to calcium hydroxide following experimental pulpotomy and its significance to the development of hard tissue barrier. *Odontology Review* **22**, 379-395.
- Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H (1991) Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Archives of oral Biology* **36**, 117-128.
- Silva AF, Tarquínio, SBC, Demarco, FF, Piva E, Rivero ERC (2006) The influence of haemostatic agents on healing of healthy human dental pulp tissue capped with calcium hydroxide. *International Endodontic Journal* **39**, 309-316.
- Smith AJ (2003) Vitality of the Dentin-Pulp Complex in Health and Disease: Growth Factors as Key Mediators. *Journal of Dental Education* **67**, 678-689.
- Smith AJ, Garde C, Cassidy N, Ruch JV, Lesot H (1995) Solubilisation of dentine extracellular matrix by calcium hydroxide. *Journal of Dental Research* **74**, 829.
- Smith AJ, Lesot H (2001) Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **12**, 425-437.
- Smith JA, Matthweus JB, Hall RC (1998) Transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *European Journal of Oral Sciences* **106**, 179-184.
- Spring J, Beck K, Chiquet-Ehrismann R (1989) Two contrary functions of tenascin: dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments. *Cell* **59**, 325-334.
- Stanley HR (1998) Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping studies. *American Journal of Dentistry* **11**, S17-S34.
- Stanley HR (1989) Pulp capping: conserving the dental pulp – can it be done? Is it Worth it? *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* **68**, 628-639.
- Steele JG, Johnson G, Underwood PA (1992) Role of serum vitronectin and fibronectin in adhesion of fibroblasts following seeding onto tissue culture polystyrene. *Journal of Biomedical and Materials Research* **26**, 861-884.
- Ten Cate AR (1998) Dentinogenesis. In: Ten Cate AR, ed. *Oral Histology, Development, Structure and Function*, 5th edn. St. Louis, MO, USA: Mosby, 128-49.
- Thesleff I, Barrach HJ, Foldart JM, Vaheri A, Pratt RM, Martin GR (1981) Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Development in Biology* **81**, 182-192.
- Thesleff I, Mackie E, Vainio S, Chiquet-Ehrismann R (1987) Changes in the distribution of tenascin during tooth development. *Development* **101**, 289-296.
- Thesleff I, Partanen AM, Vainio S (1991) Epithelial-mesenchymal interactions in tooth morphogenesis: the roles of extracellular matrix, growth factors and cell surface receptors. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology* **11**, 229-37.
- Thesleff I, Stenman S, Vaheri A, Timpl R (1979) Changes in the matrix proteins, fibronectin and collagen, during differentiation of mouse tooth germ. *Development in Biology*, **70**, 116-126.
- Thesleff I, Vainio S, Jalkanen M (1989) Cell matrix interactions in tooth development. *International Journal of Development Biology* **33**, 91-97.
- Tucker JE, Lemon R, Mackie EJ, Tucker RP (1991) Immunohistochemical localization of tenascin and fibronectin in the dentine and gingival of *Canis familiaris*. *Archives of Oral Biology* **36**, 165-170.
- Tziafas D, Belibasakis G, Veis A, Papadimitriou S (2001) Dentin Regeneration in Vital Pulp Therapy: Design Principles. *Advent Dent Res* **15**, 96-100.
- Tziafas D, Kolokuris I, Alvanou A, Kaidoglou K (1992) Short-term dentinogenic response of dog dental pulp tissue after its induction by demineralized and native dentine or predentine. *Archives of Oral Biology* **37**, 119-128.
- van Amerongen JP, Lemmens IG, Tonino GJM (1984) Immunofluorescent localization and extractability of fibronectin in human dental pulp. *Archives of Oral Biology* **29**, 93-99.
- van de Water III L, Schröder S, Crenshaw EB, Hynes RO (1981) phagocytosis of gelatin-latex particles by a murine macrophage line is dependent on fibronectin and heparin. *Journal Cell Biol* **90**, 32-39.
- Veis A (1985) The role of dental pulp-thoughts on the session on pulp repair processes. *Journal of Dental Research* **64**, 552-554.
- Veron MH, Couble ML, Caillot G, Hartmann DJ, Magloire, H (1990) Expression of fibronectin and type I collagen by human dental pulp cells and gingival fibroblast grown on fibronectin substrate. *Archives of Oral Biology* **35**, 565-569.

- Yamada KM, Clark RAF (1996) Provisional matrix. In *Molecular and cellular biology of wound repair* (ed. R. Clark), pp. 51-93. Plenum Press.
- Yamada KM, Olden K (1978) Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature* **275**, 179-184.
- Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa, H (1996) Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *Journal Dental Research* **75**, 1590-1597.
- Yoshida N, Yoshida K, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H (1994) Immunoelectron-microscopic study of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. *Archives Oral Biology* **40**, 83-89.
- Zander HA (1939) Reaction of dental pulp to calcium hydroxide. *J Dent Res* **18**, 373-379.

ARTIGO 2

ARTIGO 2

Formatado para a revista International Endodontic Journal

Expressão imunoistoquímica da fibronectina e da tenascina no reparo pulpar de dentes decíduos suínos após capeamento com diferentes materiais.

Resumo

Objetivo Investigar a expressão das duas maiores glicoproteínas da matriz extracelular, tenascina (TN) e fibronectina (FN), no reparo de polpas de suínos, após capeamento direto com diferentes materiais.

Metodologia Foi utilizado material emblocado de estudo histológico prévio, constituído de 40 dentes decíduos de suínos da espécie *Sus scrofa domesticus*, cuja polpa foi exposta e capeada com hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂) ou agregado trióxido mineral (MTA), segundo as determinações da ISO 1450: 1997. Os dentes foram extraídos aos 7 e 70 dias de pós-operatório, sendo submetidos à técnica imunoistoquímica, para a pesquisa dos antígenos TN e FN.

Resultados Aos 7 dias após capeamento direto, as glicoproteínas TN e FN distribuíram-se por todo o tecido pulpar sem inflamação, sendo ausente nas áreas com infiltração inflamatória (totalidade dos espécimens capeados com Ca(OH)₂ e raramente nos casos com MTA). Na pré-dentina a TN mostrou, em geral, forte imunorreatividade e a FN exibiu padrão variável de marcação, sendo freqüentemente ausente. No intervalo de 70 dias, FN e TN mostraram padrão de marcação semelhante entre os materiais, restringindo-se ao tecido pulpar remanescente, uma vez que a barreira dentinária e a dentina reacional em continuidade, foram ambas negativas para esses antígenos e geralmente obliteravam a polpa coronária. TN e FN estiveram também ausentes nos demais tecidos mineralizados.

Conclusão A partir dos resultados obtidos neste estudo verificou-se, não haver diferença quanto ao padrão de expressão da TN e FN, entre os materiais capeadores estudados, aos 70 dias. Observou-se diferença aos 7 dias decorrente do distinto quadro histológico exibido neste período. Ambas glicoproteínas (TN e FN) expressaram-se no reparo pulpar neste modelo suíno. TN e FN parecem exercer papel fundamental na diferenciação odontoblástica e na manutenção da morfologia da célula odontoblastóide, bem como na mineralização dos tecidos duros dentários.

Palavras-chave: reparo pulpar, capeamento pulpar direto, imunoistoquímica, tenascina, fibronectina, matriz extracelular.

Immunohistochemical expression of tenascin and fibronectin in pulp repair from swine deciduous teeth after pulp-capping with different materials.

Abstract

Aim To evaluate the expression of the two major glycoproteins of extracellular matrix (EM), tenascin (TN) and fibronectin (FN), in swine pulp repair after pulp-capping with different materials.

Methodology Forty deciduous teeth from *Sus scrofa domesticus* swine, taken from a previous histological study, were submitted to pulp exposure and capped with calcium hydroxide (Ca(OH)₂) or mineral trioxide aggregate (MTA), according to ISO 7450: 1997. The teeth were extracted within 7 and 70 days after cavity preparation and analyzed for the immunohistochemical expression of TN and FN.

Results Within 7 days, positive immunostaining for TN and FN were observed throughout the pulp tissue without inflammatory infiltration, being absent in the sites with inflammation (the cases capped with Ca(OH)₂ and a few specimens of MTA). TN usually showed a strong positive staining on predentin, and FN demonstrated variable patterns, being frequently absent in this site. Within 70 days, both glycoproteins showed similar profiles, being restricted to the pulp tissue that was left over, as the dentin barrier and the continuous reactionary dentin were both negative to these antigens and they obliterated the coronal pulp. TN and FN were also absent in the other mineralized dental tissues.

Conclusion Based on the data, there was no difference in the expression of TN and FN between the distinct pulp capping materials within 70 days. Within 7 days, the distinct immunoprofile observed between Ca(OH)₂ and MTA was due to the differences showed in the histopathologic features in both of them. It was also observed that TN and FN were expressed in pulp repair in this *in vivo* swine model, showing the important role of EM in this process. It may be suggested that TN and FN are associated with the odontoblastic differentiation, with the maintenance of the odontoblast-like cells shape and with hard tissue mineralization.

Keywords: pulp repair, pulp-capping, immunohistochemistry, tenascin, fibronectin, extracellular matrix.

Expressão imunoistoquímica da fibronectina e da tenascina no reparo pulpar em suínos, após capeamento com diferentes materiais.

Introdução

Os mecanismos que regulam a sinalização da dentinogênese reparativa após o capeamento pulpar, não estão totalmente elucidados (Tziafas 2004). Assim, para estudar estes mecanismos, diferentes modelos animais e humanos, bem como vários materiais capeadores tem sido testados, dentre eles, o agregado trióxido mineral (MTA) (Pitt Ford *et al.* 1996, Faraco Jr e Holland 2001, Tziafas *et al.* 2002, Queiroz *et al.* 2005) e o tradicional hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) (Schröder 1985, Mjör *et al.* 1991).

A indução da diferenciação de células da polpa parece ser a característica chave do reparo deste tecido (Tziafas *et al.* 2000, Mjör 2002), a qual se dá graças à sua migração e proliferação, originando uma nova geração de células formadoras de dentina reparativa, com o objetivo de reconstituir a área injuriada (Fitzgerald 1979, Fitzgerald *et al.* 1990, Mjör *et al.* 1991).

Tem sido postulado que uma rede de interações entre moléculas da matriz extracelular (ME), incluindo fibronectina (FN) (Tziafas *et al.* 1995, Yoshida *et al.* 1996), tenascina (TN) (Lukinmaa *et al.* 1991), bem como fatores de crescimento, regulam a diferenciação de células pulpares em células odontoblastóides na dentinogênese reparativa (Lesot *et al.* 1994). Estes eventos de sinalização são espelhados nos processos evidenciados durante a dentinogênese primária.

TN é uma ampla glicoproteína oligomérica multifuncional da matriz extracelular, altamente expressada durante a embriogênese e transitoriamente presente durante organogênese, sendo ausente ou muito reduzida em órgãos desenvolvidos, porém, reaparecendo sob condições patológicas causadas por infecção, inflamação ou durante a tumorigênese (Chiquet-Ehrismann & Chiquet 2003). A expressão da TN é regulada por fatores de crescimento como o *transforming growth factor- β* , TGF- β (Pearson *et al.* 1988, Sahlberg *et al.* 2001), e por estímulos mecânicos (Chiquet *et al.* 1996).

FNs são uma classe de proteínas adesivas de alto peso molecular, que têm múltiplas isoformas. Desempenham importante papel na adesão celular, morfologia, organização do citoesqueleto, migração, diferenciação, transformação oncogênica, fagocitose e hemostasia (Hynes & Yamada 1982, Ruoslahti 1981).

A expressão da TN e FN tem sido relacionada com a regulação da diferenciação celular envolvida na formação de matrizes mineralizadas na polpa dental (Lukinmaa *et al.* 1991). Estas glicoproteínas foram investigadas durante a cicatrização de polpas expostas capeadas com pasta de Ca (OH)₂ (Yoshida *et al.* 1996, Piva *et al.* 2006), bem como a FN foi identificada na dentina reparativa sob lesões de cárie (Karjalainen *et al.* 1986, Magloire *et al.* 1988, Farges *et al.* 1995).

A literatura também reporta a utilização de modelos animais variados os quais são utilizados com o objetivo de melhor compreender o papel da ME na diferenciação terminal odontoblástica, envolvida no reparo pulpar (Tziafas *et al.* 1995, Izumi *et al.* 1998, Hu *et al.* 1998, Horibe *et al.* 2004). Entretanto, ainda não foi investigada a expressão da ME após capeamento com MTA, e dadas as diferenças demonstradas por alguns estudos, com melhor performance biológica do MTA em relação ao Ca (OH)₂, esta investigação poderia ser extremamente importante.

Baseados nestas evidências, este trabalho tem como proposição investigar a expressão da FN e TN (padrão de marcação e distribuição) no processo de reparo pulpar, mediante a utilização de MTA e cimento contendo Ca(OH)₂ como agentes capeadores, em modelo suíno *in vivo*.

Materiais e métodos

Preparo dos espécimes

Este estudo utilizou material histológico de um modelo experimental *in vivo* realizado em suínos (Leites 2006), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da UFPel (03/2005) (Anexo 3). Foram utilizados do estudo de Leites (2006), 40 dentes decíduos (incisivos e pré-molares), provenientes de seis suínos da espécie *Sus scrofa domesticus* com idade de 105 dias aproximadamente.

Tabela 1 - Representação da amostra do estudo

Grupos	Nº de espécimes/tempo		Total espécimes(n)
	7 dias	70 dias	
Cimento de Ca(OH) [*]	8	6	14
MTA ^{**}	13	13	26
Total de espécimes (n)	21	19	40

* Dycal[®], Denstply Caulk, Milford, EUA.

** Angelus[®], Londrina, PR, Brasil.

Anteriormente ao processamento histológico do material emblocado, foram preparadas cavidades de classe V com exposição pulpar nos dentes suínos, cuja hemostasia foi realizada com solução salina 0,9%, sendo utilizados como materiais de capeamento o MTA cinza (Angelus[®], Londrina, PR, Brasil) e o cimento contendo hidróxido de cálcio Ca(OH)₂ (Dycal[®], Denstply Caulk, Milford, EUA). Os dentes foram restaurados com cimento de ionômero de vidro Vitremer^{MR} (3M ESPE, St Paul, MN, USA).

Após os tratamentos pulpares de acordo a ISO 7405:1997, os dentes foram extraídos nos tempos de avaliação de 7 e 70 dias, sendo posteriormente fixados em solução de formol 10% por 48h e desmineralizados em ácido fórmico a 20%.

Em seguida, anteriormente ao emblocamento, os dentes foram seccionados transversalmente ao seu longo eixo, nas proximidades da cavidade de classe V (a qual situou-se na face vestibular da coroa) e paralelamente ao seu maior diâmetro méso-distal, separando, assim, a coroa da raiz. A porção radicular dos espécimens foi então hemisseccionada paralelamente ao seu longo eixo frontal (sentido cérvico-apical). Desta forma, a porção coronária da polpa pôde ser analisada histologicamente no sentido vestíbulo-lingual e a polpa radicular, em toda a extensão, no sentido cérvico-apical. Tendo sido obtidos os cortes referentes às porções coronária e radicular para cada dente, necessários ao procedimento histológico de rotina e à técnica imunoistoquímica, apenas o material emblocado da porção coronária dos espécimens foi reincluído, reposicionando a coroa, de maneira que a mesma pudesse ser analisada também no sentido inciso-cervical, por esses dois métodos.

Técnica imunoistoquímica

Após microtomia com 3µm de espessura, as secções coronárias e radiculares de todos os dentes suínos foram submetidas ao método imunoistoquímico. As lâminas foram desparafinadas em xilol, reidratadas em etanol e lavadas em água destilada. Procedeu-se então, o tratamento prévio com pepsina para recuperação antigênica (tabela 2). Na seqüência, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da imersão em peróxido de hidrogênio 6% com metanol (1:1), em três trocas de 5 min cada. Após lavagem com TRIS (Tris-hidroxi-metil-aminometano, Sigma, St. Louis, USA), pH 7.4, as secções foram incubadas com os anticorpos primários anti-TN e anti-FN humanas, os quais foram diluídos em PBS contendo

0,1% de albumina bovina sérica (BSA). As diluições, especificações, fontes, tratamentos prévios e tempo de incubação de cada anticorpo utilizado estão relacionados na tabela 2.

Após a incubação com anticorpo primário, as secções foram lavadas e expostas ao complexo LSAB (Labelled Streptavidin Biotin, DAKO[®]), com 30 min de incubação do anticorpo secundário biotilado e a seguir, por mais 30 min, o conjugado Streptoavidina- peroxidase, conforme especificações do fabricante.

Para revelação da reação foi utilizado o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAKO[®]), sendo os cortes contra-corados com hematoxilina de Mayer. Em seguida, foram procedidas a desidratação, a diafanização e a montagem das secções histológicas em Permount.[®]

Para cada reação foram incluídos controles negativos, substituindo os anticorpos anti-TN e anti-FN por BSA. Tecidos referentes à mucosa bucal em processo de reparo (épulis fissurados ulcerados) e também a marcação perivascular já conhecida da TN e FN, foram utilizados como controles positivos externos e internos, respectivamente.

Tabela 2 - Anticorpos primários - suas especificidades, diluições, fontes e tratamentos prévios

Ac. CLONE	ESPECIFICIDADE	DIL.	FONTE	TRATAMENTO PRÉVIO	INC.
APA	Fibronectina	1:1200	Dako*	Pepsina 1%, 37°C, 60'	120', 37°C
BC-24	Tenascina	1:3000	Sigma**	Pepsina 0,5%, 37°C, 30'	18h, 4°C

* Dako, AIS, Glostrup, Denmark

** Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

Análise do perfil imunoistoquímico

Procedeu-se assim, a análise descritiva do padrão de marcação imunoistoquímica e da distribuição dos antígenos FN e TN, nos tecidos dentários de todos os espécimes referentes aos dois materiais capeadores empregados (tecido pulpar, área de exposição, barreira dentinária, dentina reacional, pré-dentina, bem como dentinas mineralizadas primária e secundária), nos intervalos de 7 e 70 dias de pós-operatório. Esta análise foi realizada utilizando microscopia óptica, por dois examinadores experientes devidamente calibrados .

Resultados

Tecido pulpar, área da exposição, barreira dentinária e dentina reacional

O padrão de marcação da TN no tecido pulpar foi reticular e bem demarcado, acompanhando as fibras colágenas e expressando-se também ao redor dos vasos sanguíneos presentes (controles positivos internos) (Figs. 2A a 2D e Figs. 3A a 3D). Igual distribuição foi observada para FN (Figs. 2E a 2I e Figs. 3E a 3H), no entanto mais fibrilar e delicada.

Considerando o intervalo de tempo de 7 dias, as diferenças observadas entre os materiais capeadores (MTA e Ca(OH)_2) no perfil de marcação imunohistoquímica dos antígenos TN e FN, refletem o distinto quadro histológico verificado entre estes agentes (Leites 2006) (Figs. 1As a 1B e Figs. 1E e 1F). Na maioria das amostras referentes ao MTA não foi observada infiltração inflamatória ou a mesma foi escassa (Fig. 1E). Já, quando o Ca(OH)_2 foi utilizado, verificou-se a presença de infiltrado inflamatório predominantemente polimorfonuclear na câmara pulpar, especialmente no sítio da exposição, em meio à necrose superficial do tecido pulpar desta área, vista em graus variáveis de intensidade (Figs 1A a 1B). Em todos os espécimes, nas áreas de focos hemorrágicos, houve expressão da FN.

Nesse intervalo, a TN (Fig. 3C) e a FN (Fig. 3G) foram detectadas na região imediatamente subjacente à exposição pulpar com padrão de marcação mais espessado. Nas áreas em que o infiltrado inflamatório polimorfonuclear esteve presente (todos os espécimes capeados com Ca(OH)_2 e escassas amostras forradas com MTA), não foi verificada expressão dessas duas glicoproteínas (Figs. 2A a 2B, 2E a 2F e Fig 3A). As dentinas reparativa e reacional, já presentes aos 7 dias (Figs. 1A e 1E), não demonstraram imunorreatividade para TN (Fig. 2B e Fig. 3B) e FN (Fig 2F e Figs. 3E a 3F), sendo notada marcação positiva para estes antígenos nas áreas adjacentes a essas dentinas terciárias (Figs. 2B e 2F; Figs. 3B e 3E a 3F). Este padrão de marcação correspondeu à metade das amostras capeadas com MTA, bem como aos dois casos capeados por HC, nos quais a barreira dentinária depositava-se em áreas focais, sob a forma de fibro e osteodentina, contínua à dentina reacional, sendo notadas células odontoblastóides alinhadas perifericamente à matriz dentinária (Figs. 1A e 1E).

Os padrões de marcação das glicoproteínas TN e FN foram freqüentemente semelhantes entre os materiais de capeamento utilizados, em todos os espécimes,

no intervalo de 70 dias de pós-operatório (Figs. 2C e 2G; Figs. 3D e 3H), para o qual os achados histológicos também foram similares (Leites 2006) (Figs. 1C a 1D e Fig. 1G a 1H). Nessas amostras, no que diz respeito aos dois agentes capeadores, não se observou infiltração inflamatória no tecido pulpar. A dentina reparativa, depositada sob a forma de osteodentina e dentina tubular em todos os casos, freqüentemente obliterava a polpa coronária no sentido vestibulo-lingual, estando em continuidade com a dentina reacional (Figs. 1C, 1D e Fig. 1G). Esses dois tipos de dentina terciária, foram negativos para os marcadores imunoistoquímicos TN (Fig. 2C e Fig.3D) e FN (Figs 2G e 3H). O tecido pulpar remanescente, de permeio à barreira dentinária na coroa (Figs. 2C e 2G; Figs. 3D e 3H) e também aquele observado na polpa radicular (Fig. 2D e Figs 2H a 2I), todavia, demonstraram imunorreatividade para a TN e FN, as quais distribuíam-se também acompanhando a fibra colágena .

Pré-dentina, dentinas primária e secundária

Nos dois intervalos de tempo deste estudo, a pré-dentina demonstrou imunorreatividade para a TN em todos os espécimens (Fig. 2D) enquanto que a FN nesta localização apresentou variabilidade do padrão de marcação, sendo frequentemente ausente (Fig. 2I), ou com áreas de tênue imunorreatividade (Fig 2H).

Nas dentinas mineralizadas primária e secundária, tanto a TN (Fig. 2D e Figs. 2H a 2I; Figs 3A a 3C) quanto a FN (Figs. 2H a 2I; Figs. 3E e 3G a 3H) estiveram ausentes aos 7 e 70 dias de pós-operatório.

Figuras 1A – 1D. Aspectos histológicos do reparo pulpar em dentes suínos capeados com Ca(OH)_2 (HE):

Fig.1A – Intervalo de 7 dias. Polpa coronária capeada com Ca(OH)_2 , demonstrando infiltração inflamatória polimorfonuclear focal e superficialmente, no sítio da exposição. Nota-se também área com dentina reparativa em fase inicial de deposição, exibindo alinhamento subjacente de algumas células odontoblastóides (cabeça de seta). (X100).

Fig. 1B – Intervalo de 7 dias. Ca(OH)_2 forra área de exposição pulpar com necrose, pronunciada infiltração inflamatória polimorfonuclear e edema (X100).

Fig 1C – Aos 70 dias após capeamento com Ca(OH)_2 : câmara pulpar com marcante obliteração de seu espaço por dentina reparativa, no sentido vestibulo-lingual (X40).

Fig 1D – Maior aumento de 1C, ressaltando a organização tubular da barreira dentinária e as células odontoblastóides alinhando-se em sua adjacência (X200).

Figuras 1E – 1H. Aspectos histológicos do reparo pulpar em dentes suínos capeados com MTA (HE):

Fig 1E – Polpa coronária capeada com MTA aos 7 dias de pós-operatório, demonstrando ausência de infiltração inflamatória e barreira dentinária em estágio inicial de formação (seta), com faixa de necrose suprajacente, no sítio da exposição pulpar. Vasodilatação e hiperemia são achados também presentes (X40).

Fig. 1F – Sítio da exposição em polpa suína capeada com MTA, após 7 dias de capeamento direto. Marcante infiltração inflamatória polimorfonuclear neutrofílica, edema e fragmento focal de dentina são observados (X100).

Fig. 1G – Intervalo de 70 dias. Polpa coronária capeada com MTA, a qual é preenchida em grande parte de sua extensão vestibulo-lingual pela deposição de dentinas reparativa e reacional. O tecido pulpar ainda presente exhibe vasodilatação e congestão. (X40).

Fig 1H – Intervalo de 70 dias. Observa-se capeamento pulpar feito com MTA, sendo notada espessa barreira de dentina tubular e osteodentina no sítio da exposição (*), com células odontoblastóides alinhadas (seta) (X100).

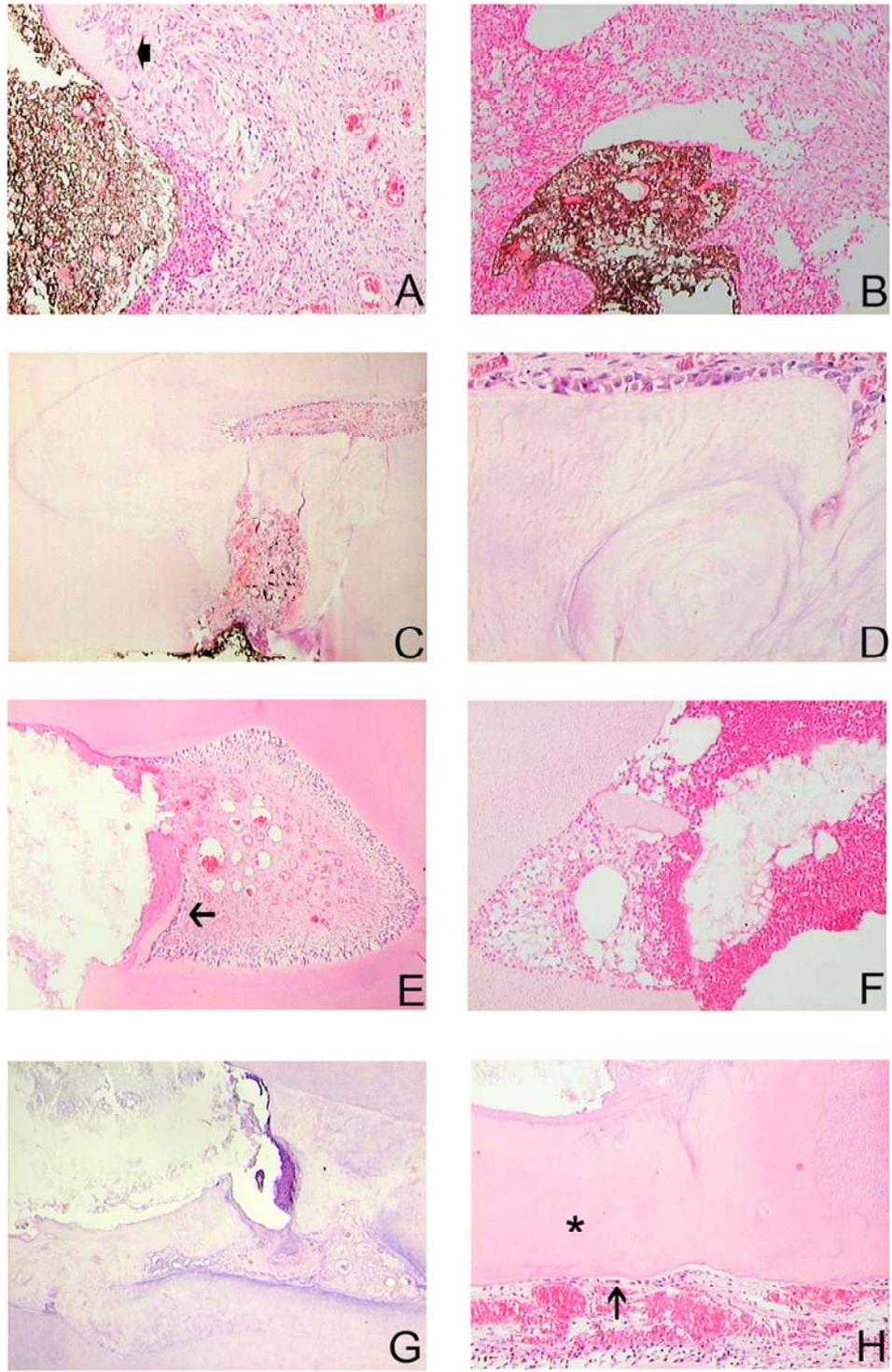


Figura 1

Figura 2A – 2D. Expressão imunoistoquímica da TN no reparo pulpar de suínos após capeamento direto com Ca(OH)_2 :

Fig. 2A – Intervalo de 7 dias, demonstrando ausência de marcação imunoistoquímica para TN nas áreas de inflamação aguda (X100).

Fig. 2B – Ausência de imunorreatividade para TN na área com infiltração inflamatória, aos 7 dias após capeamento (seta). Nos sítios sem inflamação observa-se distribuição deste marcador imunoistoquímico acompanhando a fibra colágena e ao redor dos vasos sanguíneos. Positividade também na adjacência da barreira de osteodentina recém-formada (O), a qual é negativa para TN (X100).

Fig. 2C – Intervalo de 70 dias, mostrando tecidos mineralizados negativos para TN e imunorreatividade presente no tecido conjuntivo residual (X200).

Fig. 2D – Intervalo de 70 dias. Positividade para TN em padrão reticular na área interodontoblástica e acompanhando as fibras colágenas do tecido pulpar. Pré-dentina fortemente imunorreativa (seta) (X200).

Figura 2E – 2I. Expressão imunoistoquímica da FN no reparo pulpar de suínos após capeamento direto com Ca(OH)_2 :

Fig. 2E – Intervalo de 7 dias. Sítio da exposição pulpar, apresentando infiltração inflamatória polimorfonuclear subjacente, a qual é negativa para FN. Nas áreas sem inflamação a FN mostra padrão de expressão fibrilar delicado e circunscreve vasos sanguíneos (X200).

Fig 2F – Intervalo de 7 dias. Marcação imunoistoquímica fibrilar delicada para a FN no tecido pulpar e nos sítios perivasculares, exceto na área de infiltração inflamatória. Positividade para FN também no tecido pulpar subjacente à dentina reparativa, em fase inicial de formação (X100).

Fig 2G – Após 70 dias de pós-operatório, espécimes mostrando fraca e delicada marcação para FN no tecido pulpar remanescente da câmara pulpar. Controle interno perivascular positivo. Barreira dentinária sem marcação imunoistoquímica (X200).

Fig 2H – Tênuemarkação positiva para FN na pré-dentina (seta) e distribuição desta glicoproteína no tecido pulpar acompanhando a fibra colágena. Intervalo de 70 dias, secção da raiz. (X200).

Fig 2I – Porção radicular de espécimes do intervalo de 70 dias, demonstrando ausência de imunorreatividade para a FN na pré-dentina (seta) e marcação em padrão fibrilar no tecido conjuntivo pulpar (X100).

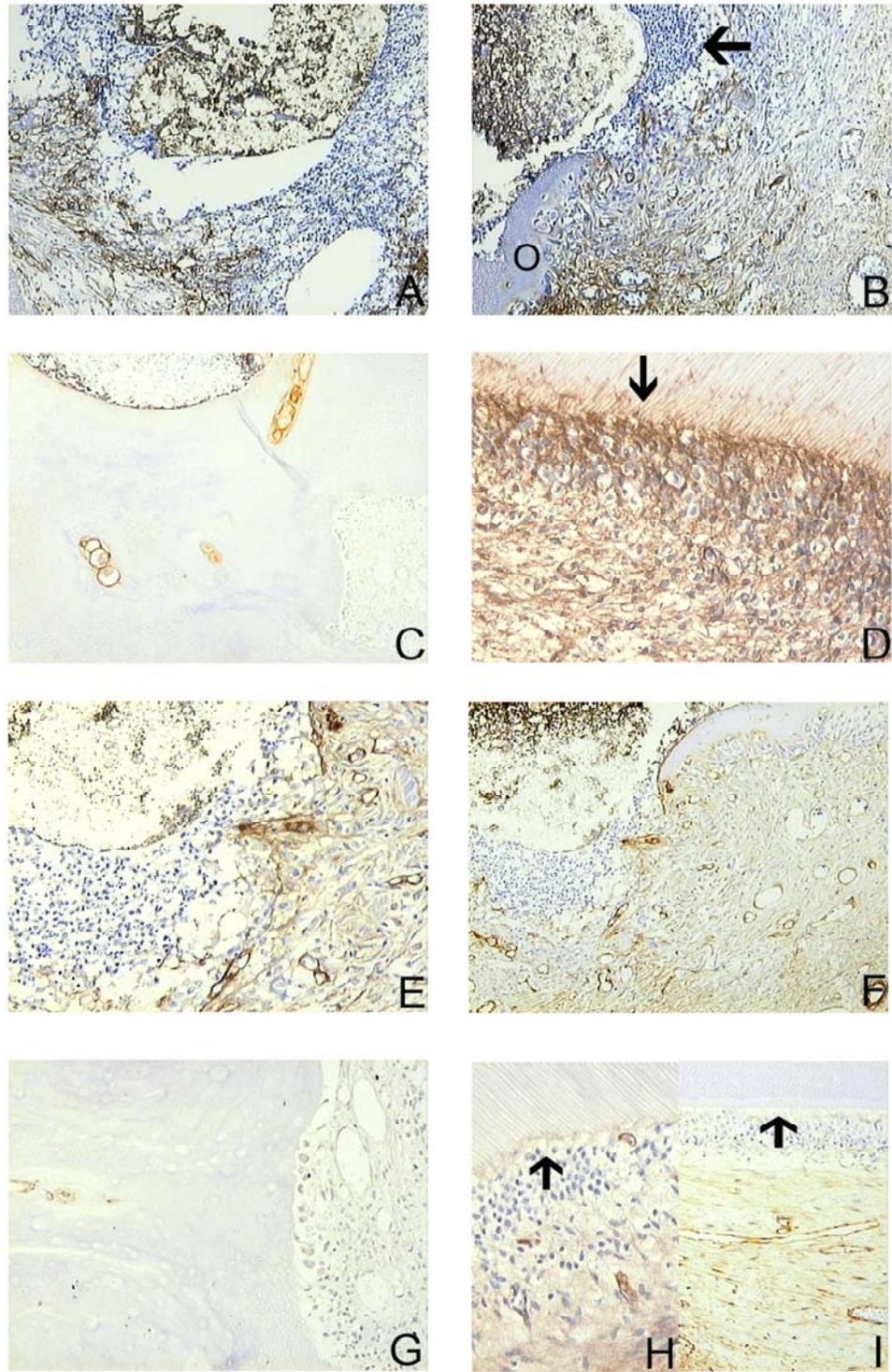


Figura 2

Figuras 3A- 3D. Expressão imunoistoquímica da TN no reparo pulpar de suínos, após capeamento direto com MTA:

Fig. 3A – Intervalo de 7 dias. Área da exposição pulpar, demonstrando ausência de marcação imunoistoquímica para TN em meio ao processo inflamatório agudo local. Positividade no tecido pulpar sem inflamação e nos controles internos (X100).

Fig 3B – Intervalo de 7 dias. Forte imunorreatividade para a TN, em padrão reticular, decorando as fibras colágenas e perivascularmente, em todo o tecido pulpar coronário. Dentinas terciárias reparativa e reacional e dentinas fisiológicas negativas (X40). Em destaque a área da barreira dentinária neoformada (X200).

Fig 3C – Tecido pulpar coronário íntegro, de espécimes após 7 dias de capeamento, expressando forte imunorreatividade para TN em toda a sua extensão, sendo levemente mais acentuada no sítio da exposição (X40).

Fig 3D – Intervalo de 70 dias, com TN presente no tecido pulpar, acompanhando a fibra colágena. Barreira dentinária negativa (*).

Figuras 3E – 3H. Expressão imunoistoquímica da FN no reparo pulpar de suínos, após capeamento direto com MTA:

Fig. 3E - Intervalo de 7 dias. Marcação positiva para a FN, em padrão reticular e delicado, em todo o tecido pulpar coronário. Controles internos positivos. Dentinas terciárias reparativa e reacional e dentinas fisiológicas negativas para esta glicoproteína (X40).

Fig 3F – Maior aumento de 3E, demonstrando área de continuidade entre a osteodentina e a dentina reacional (ambas negativas para FN) (X100).

Fig. 3G - Intervalo de 7 dias, apresentando tecido pulpar coronário íntegro, com expressão positiva para FN em toda a sua extensão, sendo mais acentuada na área da exposição (X40).

Fig 3H – Período de 70 dias de pós-operatório, com tênue expressão de FN, presente no tecido pulpar em padrão reticular. Barreira dentinária negativa (X100).

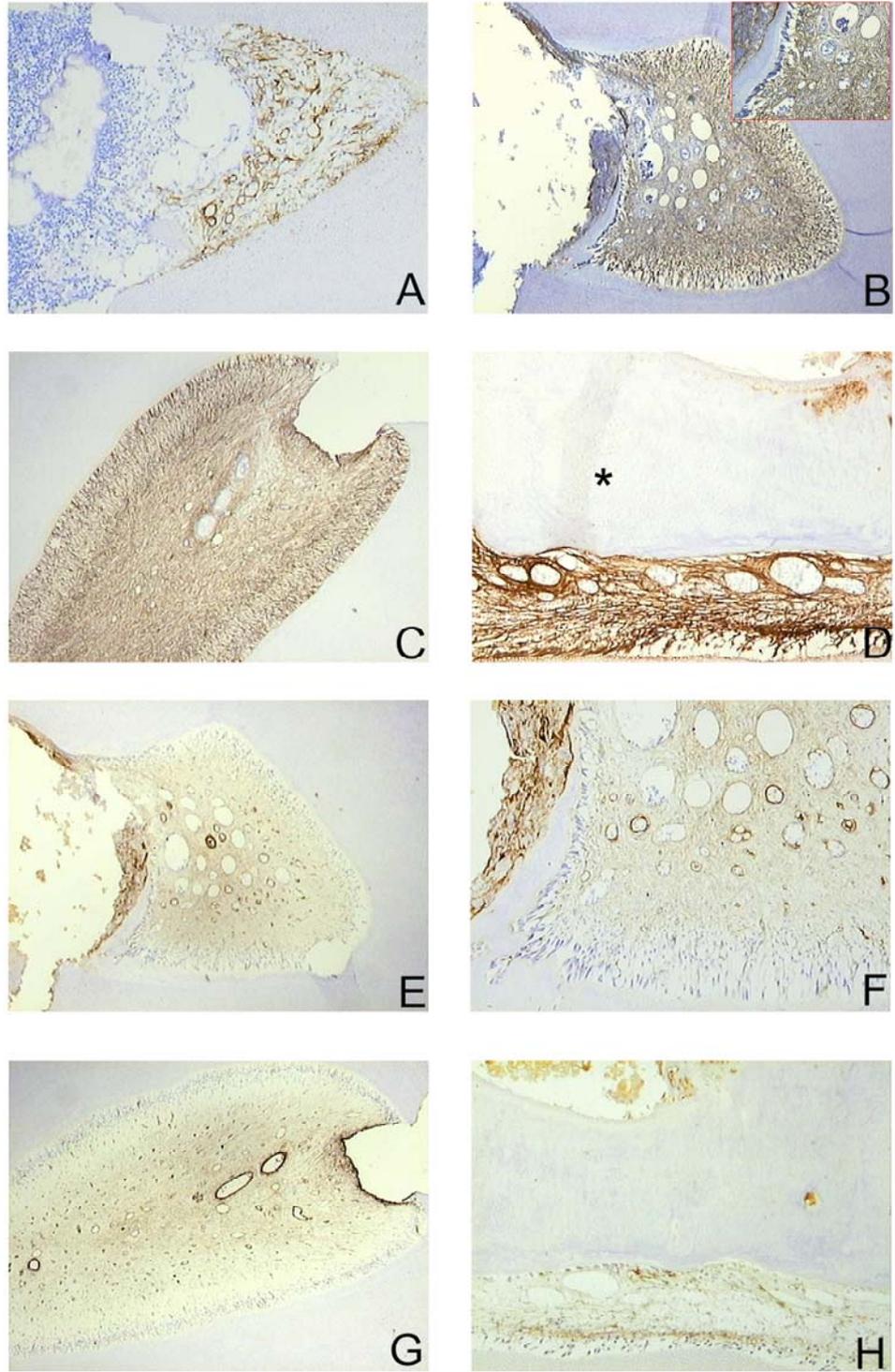


Figura 3

Discussão

O reparo pulpar, caracterizado pela formação de uma barreira de tecido mineralizado, também conhecida como ponte de dentina, tem sido relatado depois do capeamento pulpar direto com materiais contendo Ca(OH)_2 (Schröder 1985, Mjör *et al.* 1991, Cox *et al.* 1996, Stanley 1989, Heys *et al.* 1990, Demarco *et al.* 2001), e MTA (Tziafas *et al.* 2002, Menezes *et al.* 2004, Queiroz *et al.* 2005). As características morfológicas teciduais observadas neste estudo, mostraram uma resposta pulpar favorável, com formação de ponte de dentina para os dois materiais utilizados (Leites 2006), concordando com os resultados relatados na literatura (Schröder 1985, Mjör *et al.* 1991, Cox *et al.* 1996, Stanley, 1989, Heys *et al.* 1990, Pitt Ford *et al.* 1996, Tziafas *et al.* 2002; Queiroz *et al.* 2005).

A literatura reporta uma série de estudos sobre reparo pulpar frente ao capeamento pulpar direto, realizados em modelos animais (Heys *et al.* 1990, Tziafas *et al.* 1992, Oguntebi *et al.* 1995, Tziafas *et al.* 1995, Izumi *et al.* 1998). É importante lembrar que há uma certa limitação na extrapolação direta dos resultados obtidos em modelos animais para os achados em humanos, uma vez que a capacidade de resposta pode ser diferente entre as espécies (Costa *et al.* 2000). Essas diferenças devem ser levadas em consideração na interpretação das respostas teciduais, muito embora, as exigências éticas em relação ao estudo em humanos tornam os experimentos de modelos *in vivo* em animais, uma alternativa plenamente aceitável. (Goldberg & Smith 2004).

Oguntebi *et al.* (1995), estudando o reparo pulpar em suínos em miniatura, registram que a participação dos componentes da matriz extracelular, na dentinogênese reparativa, parece ser mais importante do que a ação dos diferentes materiais capeadores.

No presente estudo imunoistoquímico, também realizado em modelo suíno, não foram observadas diferenças na expressão das glicoproteínas TN e FN durante o reparo pulpar, avaliado no período de 70 dias, entre os materiais de capeamento cimento contendo Ca(OH)_2 e MTA. No entanto, aos 7 dias, como o quadro histológico apresentou diferenças entre os materiais, com infiltração inflamatória polimorfonuclear vista na totalidade dos casos capeados com Ca(OH)_2 , mas em poucos casos capeados com MTA, o perfil imunoistoquímico também demonstrou padrão distinto. Nos sítios inflamatórios não houve imunorreatividade para FN e TN, resultado também reportado por Martinez *et al.* (2000), na avaliação da localização

destas glicoproteínas em polpas inflamadas. Esses autores sugeriram que o padrão de expressão da TN poderia estar relacionado com as fases do processo inflamatório e que ela poderia funcionar como mediadora em alguns estágios do mesmo. No entanto, são suposições que merecem estudos mais específicos sobre o assunto. É bem verdade que a TN e a FN acompanham as fibras colágenas, uma vez que estas duas glicoproteínas são constituintes da matriz extracelular do tecido conjuntivo pulpar (van Amerongen *et al.* 1984, Thesleff *et al.* 1987, Lukinmaa *et al.* 1991, Hillmann & Geurtsen 1997, Martinez *et al.* 2000, Piva *et al.* 2006). Não é surpresa, pois, que essas glicoproteínas sejam amplamente expressadas no restante do tecido pulpar sem inflamação e na maioria das amostras de MTA sem qualquer reposta inflamatória e estejam ausentes nos sítios inflamatórios, locais em que as fibras colágenas são destruídas pela ação de mediadores químicos e de enzimas proteolíticas, secretados pelas células inflamatórias.

Apesar da expressão TN-C, também investigada neste estudo, estar ausente ou muito reduzida em órgãos desenvolvidos (Chiquet-Ehrismann & Chiquet 2003), já está bem estabelecido que esta glicoproteína encontra-se amplamente distribuída no tecido pulpar. Thesleff *et al.* (1987) sugeriram que a abundância de TN na polpa dentária estaria associada à manutenção da capacidade das células deste tecido em diferenciarem-se em células formadoras de tecido duro.

Adicionalmente, a expressão da FN em áreas de focos hemorrágicos é esperada, uma vez que a FN pode ser encontrada no plasma e outros fluidos corpóreos (Hynes & Yamada 1982), em sua forma solúvel.

Na área de reparo pulpar, sete dias após o capeamento, foi observada a expressão dos antígenos FN e TN sob a exposição e nas áreas adjacentes à barreira dentinária, precocemente depositada em metade das amostras capeadas com MTA e em apenas dois casos capeados com Ca(OH)₂. Pressupõe-se, como já foi observado no reparo pulpar de ratos (Schröder 1985) que a reatividade tecidual seja maior nestes animais do que no homem, o que justificaria o aparecimento tão precoce da barreira dentinária. Além disso, o MTA parece ser capaz de manter a integridade pulpar, bem como estimular a formação de ponte de dentina (Tziafas *et al.* 2002, Salako *et al.* 2003, Queiroz *et al.* 2005, Parirokh *et al.* 2005), tendo em vista que este capeador mostrou uma resposta inflamatória menor neste período, o que pode significar, provavelmente, um efeito menos agressivo do mesmo sobre os tecidos. Assim, o padrão de expressão das duas glicoproteínas nestes sítios não foi

propriamente diferente, o que variou foi o padrão de resposta pulpar frente a estes materiais em determinados espécimes.

Na região interodontoblástica foi observada marcação positiva das duas glicoproteínas estudadas, como relatado na literatura (Linde *et al.* 1982, Farges *et al.* 1995, van Amerongen *et al.* 1984, Karjalainen *et al.*, 86, Lukinmaa *et al.* 1991, Yoshida *et al.* 1994, Yoshida *et al.* 1995, Yoshida *et al.* 1996). Tem sido demonstrada a presença de material fibrilar entre os odontoblastos (Bishop & Yoshida 1992), sugerindo que estas fibras, positivas para a FN, poderiam corresponder às fibras von Korff (Yoshida *et al.* 1996), as quais guariam as células precursoras das células odontoblastóides em sua migração, adesão, bem como na organização e formação de dentina reparativa, promovendo um elo de união mecânico-biológico entre as fibras colágenas do interior da polpa e as células semelhantes aos odontoblastos recém formadas. (Kitasako *et al.* 2002). Além disso, tais fibras FN+ parecem ter importante papel na manutenção da morfologia colunar alta do odontoblasto, (Yoshida *et al.* 1994). Outros estudos tornam-se necessários para confirmar tal correspondência, tendo em vista que ainda há controvérsias em relação à denominação mais adequada para essas fibras (Ten Cate 1998).

Novamente é constatado, através do estudo da expressão da TN e da FN nos estágios precoces do reparo pulpar que os eventos da dentinogênese reparativa repetem a dentinogênese primária (Smith & Lesot 2001). No desenvolvimento dentário, ambas glicoproteínas estão localizadas na membrana basal e acredita-se estarem envolvidas no alinhamento e diferenciação das células da papila dental em odontoblastos (Lesot *et al.* 1981; Thesleff *et al.* 1989), na presença de fatores de crescimento como o TGF- β (Smith *et al.* 1998). No reparo pulpar, tem sido demonstrado que uma rede de FN e fibrina, em contato com cristais do cimento contendo Ca(OH)_2 , poderiam mediar a migração, proliferação e adesão de células que sintetizariam uma matriz de fibrodentina rica em FN, culminando com sua diferenciação em células odontoblastóides (Seux *et al.* 1991, Tziafas *et al.* 1992, 1995, Yoshida *et al.* 1996). Desta maneira, a matriz dentinária inicial, rica em FN, desempenharia papel similar ao da membrana basal (Ruch 1985), demarcando o papel crucial desta glicoproteína na interação entre as células odontoblastóides e essa matriz primitiva (Veis 1985, Karjalainen *et al.* 1986, Magloire *et al.* 1988). Além disso, a FN também tem sido relacionada à diferenciação odontoblástica sob ação de agentes capeadores em estudos *in vitro* (Seux *et al.* 1991, Veron *et al.* 1990).

A TN, como uma glicoproteína anti-adesiva, por sua vez, poderia agir modulando a relação adesiva entre célula precursora da célula odontoblastóide e a FN, modificando-a e possibilitando, desta forma, a sua migração (Orend & Chiquet-Ehrismann 2000), graças à criação de uma via de menor resistência de permeio a uma matriz rica em FN (Mackie *et al.* 1988, Sage & Bornstein 1991, Chiquet-Ehrismann *et al.* 1986, Thesleff *et al.* 1987). Desta maneira, poderia-se explicar a co-expressão dessas duas glicoproteínas com funções antagônicas num mesmo sítio da exposição pulpar, região envolvida com o reparo, o que também é visto em outras condições patológicas relacionadas à cicatrização, nas quais a expressão de TN-C tem sido associada à da FN (Chiquet-Ehrismann & Chiquet 2003).

As dentinas reparativa e reacional, já presentes aos 7 dias e vistas obliterando a polpa coronária aos 70 dias, não demonstraram imunorreatividade para TN e FN. Também nas dentinas sadias primária e secundária, bem como na dentina reacional, em todos os intervalos de tempo, a TN e a FN estiveram ausentes, concordando com outros estudos reportados na literatura (Lukinmaa *et al.* 1991, Karjalainen *et al.* 1986, Farges *et al.* 1995, Yoshida *et al.* 1994, Thesleff *et al.* 1991, van Amerongen *et al.* 1984, Piva *et al.* 2006). A TN expressa-se em matrizes extracelulares que serão posteriormente mineralizadas, estando ausente nos tecidos que completaram sua mineralização (Thesleff *et al.* 1987, Lukinmaa *et al.* 1991, Tucker *et al.* 1991, Martinez *et al.* 2000). Tal expressão parece atuar na regulação da diferenciação de células envolvidas na formação dessas matrizes. A marcante imunorreatividade para TN na pré-dentina em todos os períodos avaliados neste estudo, e também observada por outros autores (Lukinmaa *et al.* 1991, Martinez *et al.* 2000, Piva *et al.* 2006), parece confirmar este achado, pois ela também é considerada frente de mineralização, ou seja, matriz dentinária que prepara-se para ser mineralizada. A presença da TN na interface entre tecido mineralizado e não mineralizado implica na função desta glicoproteína em mediar o estresse mecânico (Lukinmaa *et al.* 1991).

Por outro lado, a expressão da FN na pré-dentina neste modelo suíno foi extremamente variável, como os achados da literatura para os estudos em humanos. Alguns autores observaram imunorreatividade para a FN neste sítio (Yoshida *et al.* 1996, Piva *et al.* 2006), enquanto outros relatam que a FN não é um constituinte da pré-dentina humana (Lukinmaa *et al.* 1991, Karjalainen *et al.* 1986). Em ratos, a FN foi detectada na pré-dentina em estágios iniciais, estando ausente na matriz

synthesized by odontoblasts completely differentiated (Thesleff *et al.* 1979, Lesot *et al.* 1981, Thesleff *et al.* 1981, Linde *et al.* 1982). In virtue of the scarcity of studies on the expression of the extracellular matrix in the porcine model, it is not possible to establish more precise conclusions regarding the variability of the expression of FN observed in the present work. Despite this, we agree with Lukinmaa *et al.* (1991) in emphasizing that the constitution of the pre-dentin of different species and stages of development can vary.

Thus, from this study it is understood that the future of vital pulp therapy should be based on strategies that involve the bio-stimulation of this tissue. In this way, it is of fundamental importance to know the molecular mechanisms of signaling between the ME and the pulp cells.

Conclusões

From the results obtained in this study, it can be verified that the active participation of ME and its main glycoproteins (TN and FN) in pulp repair in pigs, after capping with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and MTA, seems to play a fundamental role in odontoblastic differentiation and in the maintenance of the morphology of the odontoblast cell, as well as in the mineralization of the newly formed dentin matrix.

In the initial stage of pulp repair (7 days), the differences observed between the capping materials studied, regarding the immunohistochemical profile demonstrated for TN and FN, were due to the distinct histological picture exhibited for the same. When there was inflammatory polymorphonuclear infiltration (all cases capped with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and rare cases capped with MTA), no immunoreactivity for FN and TN was observed. It is suggested that, as these glycoproteins are widely expressed in pulp tissue, accompanying collagen fibers, in inflammatory sites where the ME is destroyed, TN and FN, as their components, may also not be present.

The immunohistochemical expression profile of the two glycoproteins studied was similar in the more advanced stage of pulp repair analyzed in this study (70 days), being absent in the mineralized dentin tissues of physiological and tertiary (repair and reactive) and limited to the remaining pulp tissue, which is in accordance with what is observed in the literature for other animal models.

Referências

- Bishop LJ, Yoshida SA (1992) A permeability barrier to lanthanum and the presence of collagen between odontoblasts in pig molars. *Journal of Anatomy* **181**, 29-38.
- Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M (2003) Tenascins: Regulation and putative functions during pathological stress. *Journal of Pathology* **200**, 488-499.
- Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T (1986) Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* **47**, 131-139.
- Chiquet M., Matthisson M, Koch M, Tannheimer M, Chiquet-Ehrismann, R (1996) Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. *Biochemistry Cell Biology* **74**, 737-744.
- Costa CA, Hebling J, Hanks CT (2000) Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dental Materials* **16**, 188-197.
- Cox CF, Subay RK, Ostro E, Suzukl S (1996) Tunnel defects in dentin bridges: Their formation following direct pulp capping. *Operative Dentistry* **21**, 4-11.
- Demarco FF, Tarquinio SB, Jaeger MM, Araujo VC, Matson E (2001) Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. *Quintessence International* **32**, 211-220.
- Dominguez MS, Witherspoon DE, Gutmann JL, Opperman LA (2003) Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. *Journal of Endodontics*, **29**,324-333.
- Faraco Junior IM, Holland R (2001) Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide cement. *Dental Traumatology* **17**, 163-166.
- Farges JC, Joffre A, Lesot H, Bleicher F, Magloire H (1995) Immunocytochemical localization of fibronectin and a 165-kDa membrane protein in the odontoblast layer under initial carious lesions in man. *Archives of Oral Biology* **40**, 1023-1028.
- Fitzgerald M (1979) Cellular mechanics of dentin bridge repair using 3H-thymidine. *Journal Dental Research* **58**, 2198-2206.
- Fitzgerald M, Chiego DJ, Heys DR (1990) Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following exposure in primate teeth. *Archives of Oral Biology* **35**, 707-715.
- Goldberg M, Smith AJ (2004) Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **15**, 13-27.
- Heys DR, Fitzgerald M, Heys RJ, Chiego DJ (1990) Healing of primate dental pulps capped with Teflon. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* **69**, 227-237.
- Hillmann G, Geurtsen W (1997) Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. *Cell and Tissue Research* **289**, 145-154.
- Holland R, Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JÁ, Dezan júnior E (2001) Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or cement Portland. *Brazilian Dental Journal* **12**, 109-113.
- Horibe M, Sawa, T, Kataoka M.T, Kido J, Nagata T (2004) Regulation of tenascin expression in cultured rat dental pulp cells. *Odontology*, **92**, 22-26.
- Hu C.C, Zhang C, Qian Q, Tatum NB (1998) Reparative dentin formation in rat molars after direct capping with growth factors. *Journal of Endodontics*, **24**, 744-751.
- Hynes RO, Yamada K M (1982.) Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *The Journal of Cell Biology* **95**, 369-377.
- ISO-7405 (1997) Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry; test methods for dental materials. International Organization for Standardization – **E**, 1-18.
- Izumi T, Yamada K, Inoue H, Watanabe K, Nishigawa Y (1998) Fibrinogen/fibrin and fibronectin in the dentin-pulp complex after cavity preparation in rat molars. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **86**, 587-591.
- Karjalainen S, Soderling E, Pelliniemi L, Foidart JM (1986) Immunohistochemical localization of types I and II collagen and fibronectin in the dentine of carious human teeth. *Archives of Oral Biology* **31**, 801-806.
- Kitasako Y, Shibata S, Cox CF, Tagami J (2002) Location, arrangement and possible function of interodontoblastic collagen fibres in association with calcium hydroxide-induced hard tissue bridges. *International Endodontic Journal* **35**, 996-1004.
- Leites, ACBR (2006) Avaliação histológica da polpa dental de suínos após capeamento com Agregado Trióxido Mineral ou Hidróxido de Cálcio. *in press*.

- Lesot H, Osman M, Ruch JV (1981) Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. *Developmental Biology* **82**, 371-381.
- Lesot H, Smith AJ, Tziafas D, Bégue-Kirn C, Cassidy N, Ruch JV (1994) Biologically active molecules and dental tissue repair: a comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation in vitro. *Cells and Materials* **4**, 199-218.
- Linde A, Johansson S, Jonsson R, Jontel M (1982) Localization of fibronectin during dentinogenesis in rat incisor. *Archives of Oral Biology* **27**, 1069-1073.
- Lukinmaa PL, Mackie EJ, Thesleff I (1991) Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins – tenascin and the ed-sequence-containing form of cellular fibronectin – in human permanent teeth and periodontal ligament. *Journal of Dental Research* **70**, 19-26.
- Mackie EJ, Tucker RP, Halfter W, Chiquet-Ehrismann R, Epperlein HH (1988) The distribution of tenascin coincides with pathways of neural crest cell migration. *Development* **102**, 237-250.
- Magloire H, Joffre A, Hartmann DJ (1988) Localization and synthesis of type III collagen and fibronectin in human reparative dentine. *Histochemistry* **88**, 141-149.
- Martinez EF, de Souza SOM, CORRÊA L, de ARAÚJO VC (2000) Immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin, and type III collagen in human dental pulp. *Journal of Endodontics* **26**, 708-711.
- Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG, Garcia RB (2004) Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* **98**, 376-379.
- Mjör IA (2002) Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 7: The exposed pulp. *Quintessence International* **33**, 113-135.
- Mjör IA, Dahl E, Cox CF (1991) Healing of pulp exposures: an ultrastructural study. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **20**, 496-501.
- Oguntebi BR, Heaven T, Clark A, Pink FE (1995) Quantitative assessment of dentin bridge formation following pulp-capping in miniature swine. *Journal of Endodontics* **21**, 79-82.
- Orend G, Chiquet-Ehrismann R (2000) Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. *Experimental Cell Research* **261**, 104-110.
- Parirokh M, Asgary S, Eghbal MJ, Stowe S, Eslami B, Eskandarizade A, Shabahang S (2005) A comparative study of White and grey mineral trioxide aggregate as pulp capping agents in dog's teeth. *Dental Traumatology* **21**, 150-154.
- Pearson CA, Pearson D, Shibahara S, Hofsteenge J, Chiquet-Ehrismann R (1988) Tenascin: cDNA cloning and induction by TGF-beta. *European Molecular Biology Organization Journal* **7**, 2977-82.
- Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP (1996) Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping materials. *Journal American Dental Association* **127**, 1491-1494.
- Piva E, Tarquínio SBC, Demarco FF, Silva AF, Araújo, VC (2006) Immunohistochemical Expression of Fibronectin and Tenascin after Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontic*, in press.
- Queiroz AM, Assed S, Leonardo MR, Nelson-Filho P, Silva LAB (2005) MTA and calcium hydroxide for pulp capping. *Journal of Applied Oral Science* **13**, 126-130.
- Ruch, J.V. (1985) Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. *Journal of Dental Research* **64**, 489-498.
- Ruoslahti E (1981) Fibronectin. *Journal of Oral Pathology* **10**, 3-13.
- Sage EH, Bornstein P (1991) Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 14831-14834.
- Sahlberg C, Aukhil I, Thesleff I (2001) Tenascin-C in developing mouse teeth: expression of plice variants and stimulation by TGFβ and FGF. *European Journal of Oral Sciences* **109**, 114-124.
- Salaki N, Joseph B, Ritwik P, Salonen J, John P, Junaid TA (2003) Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. *Dental Traumatology* **19**, 314-320.
- Schröder U (1985) Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *Journal of Dental Research* **64**, 541-548.
- Seux D, Couble ML, Hartmann DJ, Gauthier JP, Magloire H (1991) Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. *Archives of oral Biology* **36**, 117-128.
- Smith AJ, Lesot H (2001) Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **12**, 425-437.

- Smith JA, Matthweus JB, Hall RC (1998) Transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *European Journal of Oral Sciences* **106**, 179-184.
- Stanley HR (1989) Pulp capping: conserving the dental pulp – can it be done? Is it Worth it? *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* **68**, 628-639.
- Ten Cate AR (1998) Dentinogenesis. In: Ten Cate AR, ed. *Oral Histology, Development, Structure and Function*, 5th edn. St. Louis, MO, USA: Mosby, 128-49.
- Thesleff I, Stenman S, Vaheri A, Timpl R (1979) Changes in the matrix proteins, fibronectin and collagen, during differentiation of mouse tooth germ. *Development in Biology*, **70**, 116-126.
- Thesleff I, Barrach HJ, Foldart JM, Vaheri A, Pratt RM, Martin GR (1981) Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Development of Biology* **81**, 182-192.
- Thesleff I, Mackie E, Vainio S, Chiquet-Ehrismann R (1987) Changes in the distribution of tenascin during tooth development. *Development* **101**, 289-296.
- Thesleff I, Vainio S, Jalkanen M (1989) Cell matrix interactions in tooth development. *International Journal of Developmental Biology* **33**, 91-97.
- Thesleff I, Partanen AM, Vainio S (1991) Epithelial-mesenchymal interactions in tooth morphogenesis: the roles of extracellular matrix, growth factors and cell surface receptors. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology* **11**, 229-37.
- Tucker JE, Lemon R, Mackie EJ, Tucker RP (1991) Immunohistochemical localization of tenascin and fibronectin in the dentine and gingival of *Canis familiaris*. *Archives of Oral Biology* **36**, 165-170.
- Tziafas D, Smith AJ, Lesot H (2000) Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of Dentistry* **28**, 77-92.
- Tziafas D (2004) The future role of a molecular Approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Research* **38**, 314-320.
- Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S (2002) The dentinogenic effects of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *International Endodontics Journal* **35**, 245-254.
- Tziafas D, Panagiotakopoulos N, Komnenou A (1995) Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine or calcium hydroxide-containing cement. *Archives of Oral Biology* **40**, 23-31.
- Tziafas D, Kolokuris I, Alvanou A, Kaidoglou K (1992) Short-term dentinogenic response of dog dental pulp tissue after its induction by demineralized and native dentine or predentine. *Archives of Oral Biology* **37**, 119-128.
- van Amerongen J.P, Lemmens IG, Tonino GJM (1984) Immunofluorescent localization and extractability of fibronectin in human dental pulp. *Archives of Oral Biology* **29**, 93-99.
- Veis A (1985) The role of dental pulp-thoughts on the session on pulp repair processes. *Journal of Dental Research* **64**, 552-554.
- Veron MH, Couble ML, Caillot G, Hartmann DJ, Magloire, H (1990) Expression of fibronectin and type I collagen by human dental pulp cells and gingival fibroblast grown on fibronectin substrate. *Archives of Oral Biology* **35**, 565-569.
- Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa, H (1996) Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *Journal of Dental Research* **75**, 1590-1597.
- Yoshida N, Yoshida K, Iwaku M, Nakamura H (1994) A confocal laser scanning microscopic study of the immunofluorescent localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. *Archives of Oral Biology* **39**, 395-400.
- Yoshida N, Yoshida K, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H (1995) Immunoelectron-microscopic study of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. *Archives Oral Biology* **40**, 83-89.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a importância dos componentes da ME, mais especificamente das glicoproteínas TN e FN, nos eventos que envolvem o reparo pulpar, após controle do sangramento com diferentes agentes hemostáticos (estudo em modelo humano) e capeamento com materiais de proteção distintos (modelo suíno). TN e FN parecem exercer papel fundamental na diferenciação odontoblástica e na manutenção da morfologia da célula odontoblastóide, bem como na mineralização da matriz dentinária neoformada.

Considerando os modelos de estudo *in vivo* utilizados, em humanos não houve diferença quanto ao padrão de expressão da TN e da FN entre os diferentes agentes hemostáticos estudados.

No estudo realizado em suínos, as diferenças observadas no estágio inicial do reparo pulpar, entre os materiais de capeamento estudados, quanto ao perfil imunohistoquímico da TN e FN, foram decorrentes do distinto quadro histológico exibido para os mesmos. No estágio mais avançado do reparo pulpar, não houve diferença entre os materiais quanto à expressão das glicoproteínas estudadas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ACCORINTE, M.L.R.; LOGUERCIO, A.D.; REIS, A.; ARAÚJO, V.C. Response of human pulps capped with a bonding agent after bleeding control with haemostatic agents. **Operative Dentistry**, v. 30, p. 147-155, 2005.
- AEINEHCHI, M.; ESLAMI, B.; GHANBARIHA, M.; SAFFAR, A.S. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. **International Endodontic journal**, v. 36, n. 3, p. 225-231, 2003.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular biology of the cell**. 3. ed. New York: Garland Publishing, Inc. 1994. 1294p.
- ALITALO, K., HOVI, T., VAHERI, A. Fibronectin is produced by human macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 151, n. 3, p. 602-613, 1980.
- [AGAMY, H.A.](#); [BAKRY, N.S.](#); [MOUNIR, M.M.](#); [AVERY, D.R.](#) Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotomized primary teeth. **Pediatric Dentistry**, Chicago, v.26, n.4, p.302-309, July/Aug. 1994.
- AUKHIL, I., SAHLBERG, C., THESLEFF, I. Basal layer of epithelium expresses tenascin mRNA during healing of incisional skin wounds.** *Journal of Periodontal Research*, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 105-112, 1996
- BOURDON, M.A.; WIKSTRAND, C.J.; FURTHMAYR, H.; MATHEWS, T.J.; BIGNER, D.D. Human glioma-mesenchymal extracellular matrix antigen defined by monoclonal antibody. **Cancer Research**, Baltimore, v. 43, n. 6, p. 2796-2805, June, 1983.
- BROWNE, R.M. Animal tests for biocompatibility of dental materials – relevance, advantages and limitations. **Journal of Dentistry**, Bristol, v.22, Suppl 2, p.S21-S22. 1994.
- ÇALISKAN, M.K. Pulpotomy of carious vital teeth with periapical involvement. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 28, n.3, p.172-175, May. 1995.
- CASELITZ, J. Basal membrane antigen as tumor markers. **Curr Top Pathol**, Berlin, v. 77, p. 223-243, 1987.
- CHANG, Y.C.; HUANG, F.M.; TAI, K.W.; CHOU, M.Y. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells **Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology, Oral radiology and Endodontics**. St Louis, v. 92, n. 4, p. 446-50, Oct. 2001.
- CHIQUET, M.; FRAMBROUGH, D.M. Chick myotendinous antigen I. A monoclonal antibody as a marker for tendon and muscle morphogenesis. **Journal Cell Biology**, New York, v. 98, n. 6, p. 1926-1936, June, 1984.
- CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 986-990, 2004.

CHIQUET-EHRISMANN, R.; CHIQUET, M. Tenascins: Regulation and putative functions during pathological stress. **Journal of Pathology**, v. 200, p. 488-499, 2003.

CHIQUET-EHRISMANN, R.; MACKIE, E.J.; PEARSON, C.A.; SAKAKURA, T. Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. **Cell**, Cambridge, v. 47, n. 1, p. 131-139, Oct.1986.

CHIQUET-EHRISMANN, R.; KALLA, P.; PEARSON, C.A.; BECK, K.; CHIQUET, M. Tenascin interferes with fibronectin action. **Cell**, Cambridge, v.53, n. 6. p. 383-390, May, 1988.

CHIQUET-EHRISMANN, R. What distinguishes tenascin from fibronectin? **The FASEB Journal**, v. 4, n.9, p. 2598-2604, 1990.

CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. **Experientia Basel**, v. 51, n. 9-10, p. 853-862, 1995.

COSTA, C.A.; HEBLING, J.; HANKS, C.T. Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 16, n. 3, p.188-197, May. 2000.

COSTA, C.A.; EDWARDS, C.A.; HANKS, C.T. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. **American Journal of Dentistry**, San Antonio, v. 14, n. 1, p.25-30, Feb. 2001.

COX, C.F.; HAFEZ, A.A.; AKIMOTO, N.; OTSUKI, M.; SUZUKI, S.; TARIM, B. Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. **American Journal of Dentistry**, San Antonio, v.11, Spec Issue, p. S55-63, Jan. 1998.

COX, C.F.; KEALL, C.L.; KEALL, H.J.; OSTRO, E.; BERGENHOLTZ, G. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulps. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v.57, n. 1, p.1-8, Jan. 1987.

COX, C.F.; SUBAY, R.K.; OSTRO, E.; SUZUKI, S.; SUZUKI, S.H. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. **Operative Dentistry**, Seattle, v. 21, n.1, p. 4-11, Jan-Feb. 1996.

COX, C.F.; HAFEZ, A.A.; AKIMOTO, N.; OTSUKI, M.; MILLS, J.C. Biological basis for clinical success: pulp protection and the tooth-restoration interface. **Practical Periodontal and Aesthetic Dentistry**, New York, v.11, n.7, p.819-26, Jul. 1999.

COX, C.F.; WHITE, K.C.; RAMUS, D.L.; FARMER, J.B.; SNUGGS H.M. Reparative dentin: factors affecting its deposition. **Quintessence**, v. 23, n. 4, p. 257-270, Apr. 1992.

COX, C.F.; BERGENHOLTZ, G. Healing sequence in capped inflamed dental pulps of Rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). **International Endodontic Journal**, v.19, n.3, p. 113-120, May, 1986.

CVEK, M.; GRANATH, L.; CLEATON-JONES, P.; AUSTIN, J. Hard tissue barrier formation in pulpotomized monkey teeth capped with cyanoacrylate or calcium hydroxide for 10 and 60 minutes. **Journal Dental Research**, v. 66, p. 1166-1174, 1987.

DAVIDSON, R.M.; GUO, L. Calcium channel current in rat dental pulp cells. **J Membr Biology**, v. 178, p. 21-30, 2000.

DECUP, F.; SIX, N.; PALMIER, B.; BUCH, D.; LASFARGES, J.J.; SALIH, E.; GOLDBERG, M. Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. **Clinical Oral Investigation**, v. 4, p. 110-119, 2000.

DEMARCO, FF; TARQUINIO, SB; JAEGER, MM; DE ARAUJO, VC; MATSON E. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. **Quintessence International**, v. 32, p. 211-20, 2001.

DOMINGUEZ, MS; WITHERSPOON, DE; GUTMANN, JL; OPPERMAN, LA. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp-therapy materials. **Journal of Endodontics**, Chicago, v.29,n.5,p.324-333,may2003.

D'SOUZA, R.N.; BACHMAN, T.; BAUMGARDNER, K.R., BUTLER, W.T.; LITZ, M. Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. **Journal Dental Research**, v. 74, n. 2, p. 702-709, Feb. 1995.

DUBAND, J.L.; ROCHER, S.; CHEN, W.T.; YAMADA, K.M.; THIERY, J.P. Cell adhesion and migration in the early vertebrate embryo: location and possible role of the putative fibronectin receptor complex. **J Cell Biol**, New York, v. 102, n. 1, p. 160-178, Jan. 1986.

DUFOUR, S.; DUBAND, J.L.; THIERY, J.P. Role of a major cell-substratum adhesion system in cell behavior and morphogenesis. **Biol Cell**, Paris, v. 58, n. 1, p. 1-13, 1986.

ERICKSON, H.P.; BOURDON, M.A. Tenascin: an extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumors. **Annu Rev Cell Biology**, Palo Alto, v. 5, p. 71-92, 1989.

ERICKSON, H.P. Tenascin-C, tenascin-R: a family of talented proteins in search of functions. **Curr Opin Cell Biology**, London, v. 5, n. 5, p. 869-876, Oct, 1993.

ERIKSON, H.P.; IGLESIAS, J.L. A six-armed oligomer isolated from cell surface fibronectin preparations. **Nature**, London, v. 311, n. 5983, p. 267-269, Sept. 1984.

ERSIN, N.K.; ERONAT, N. The comparison of a dentin adhesive with calcium hydroxide as a pulp-capping agent on the exposed pulps of human and sheep teeth. **Quintessence International**, Berlin, v.36, n.4, p.271-280, apr. 2005.

FARACO Jr, I.M.; HOLLAND, R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. **Dental Traumatology**, Copenhagen, v.17, n.4, p.163-166, aug. 2001.

FARGES, J.C.; JOFFRE, A.; LESOT, H.; BLEICHER, F.; MAGLOIRE, H. Immunocytochemical localization of fibronectin and a 165-kDa membrane protein in the odontoblast layer under initial carious lesions in man. **Archives of Oral Biology**, v. 40, p. 1023-1028, 1995.

[FARSI, N.](#); [ALAMOUDI, N.](#); [BALTO, K.](#); [MUSHAYT, A.](#) Success of mineral trioxide aggregate in pulpotomized primary molars. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Birmingham, v.29, n.4, p.307-311, summer 2005.

FEI, A.L.; UDIN, R.D.; JOHNSON, R. A clinical study of ferric sulfate as a pulpotomy agene in primary teeth. **Pediatric Dentistry** , v. 13, n. 6, p. 327-332,1991.

FITZGERALD, M.; HEYS, R,F. A clinical and histological evaluation of conservative pulpal therapy in human teeth. **Operative Dentistry**, Seattle, v.16, n.3, p.101-112, May/June 1991.

FITZGERALD, M.; CHIEGO, D.J.Jr.; HEYS, D.R. Autoradiographic analysis of odontoblast replacement following pulp exposure in primate teeth. **Archives of Oral Biology**, Oxford, v. 35, n. 9, p. 707-715, 1990.

FITZGERALD, M. Cellular mechanics of dentinal bridge repair using H-Thymidine. **Journal of Dental Research**, Chicago, v.58, Special Issue D, p.2198-2206, Nov. 1979.

FLUCK, M.; TUNG-CIVELEK, V.; CHIQUET, M. Rapid and reciprocal regulation of tenascin-C and tenascin-Y expression by loading of skeletal muscle. **Journal Cell Science**, v. 113, pt. 20, p. 3583-3591, Oct, 2000.

FREIRE, MC; PATUSSI, MP. Tipos de estudos. In: ESTRELA C. **Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia**. São Paulo: Ed. Artes Médicas, 2001. p.122-143.

FURCHT, L.T.; MOSHER, D.G.; WENDELSHAFER-CRABB, G. Effects of cell density and transformation on the formation of a fibronectin extracellular filamentous matrix on human fibroblasts. **Cancer Research**, Baltimore, v. 38, n. 12, p. 4618-4623, Dec. 1978.

GARBARSCHE, C.; MATTHIESSEN, M. E., OLSEN, B.E., MOE, D.; KIRKEBY, S. Immunohistochemistry of the intercellular matrix components and the epithelio-mesenchymal junction of the human tooth germ. **Histochemical J**, London, v. 26, n. 2, p. 110-118, Feb. 1994.

GLASS, R.L.; ZANDER, A. Pulp healing. **Journal of Dental Research**, Alexandria, v. 28, n. 2, p. 97-107, 1949.

GOLDBERG, M.; LASFARGUES, J.J. Pulp-dentinal complex revisited. **Journal of Dentistry**, v. 23, n. 1, p. 15-20, Feb. 1995.

GOLDBERG, M.; SMITH, A.J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine** , v. 15, n. 1, p. 13-27, 2004.

GRAHAM, L; COOPER, PR; CASSIDY, N; NOR, JE; SLOAN, AJ; SMITH, AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. **Biomaterials**, Guilford, v.27, n.14, p.2865-2873, may 2006.

GRINNELL, F. Fibronectin and wound healing. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 26, n. 2, p.107-116. 1984.

GRUMET, M.; HOFFMAN, S.; CROSSIN, K.L.; EDELMAN G.M. Cytotactin, an extracellular matrix protein of neural and non-neural tissues that mediates glia-neuron interaction. **Proc Nat Acad Sci USA**, v. 82, n. 23, p. 8075-8079, Dec. 1985.

HAFEZ, A.A.; COX, C.F.; TARIM, B.; OTSUKI, M.; AKIMOTO, N. An in vivo evaluation of hemorrhage control using sodium hypochlorite and direct capping with a one-or two-component adhesive system in exposed nonhuman primate pulps. **Quintessence International** , v. 33, n. 4, p. 261-272, 2002.

HEBLING, J.; GIRO, E.; COSTA, C. Biocompatibility of an adhesive system applied to exposed human dental pulp. **Journal of Endodontic**, v. 25, n.10, p. 676-82, Oct, 1999.

HEIKINHEIMO, k.; MORGAN, P.R.; HAPPONEN, R.P.; STENMAN, G.; VIRTANEN, I. Distribution of extracellular matrix proteins in odontogenic tumors and developing teeth, **Virchows Archives B Cell Pathol Incl Mol Pathol**, Berlin, v. 61, n. 2, p. 101-109, 1991.

HELING, I.; ROTSTEIN, I.; DINUR, T.; SZWEC-LEVINE, Y.; STEINBERG, D. Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions in vitro. **Journal of Endodontic** , v. 27, n. 4, p. 278-280, 2001.

HERNANDEZ, E.P.; BOTERO, T.M.; MANTELLINI, M.G.; MCDONALD, N.J.; NOR, J.E. Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages *in vitro*. **International Endodontic Journal**. v. 38, p. 137-143, 2005.

HEYS, D.R.; COX, C.F.; HEYS, R.J.; AVERY J.K. Histological considerations of direct pulp capping agents. **Journal of Dental Research**, v. 60, n. 7, p. 1371-1379, Jul. 1981.

HEYS, D.R.; FITZGERALD, M.; HEYS, R.J.; CHIEGO, D.J.Jr. Healing of primate dental pulps capped with Teflon. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 69, n.2, p. 227-237, Feb, 1990.

HIDALGO, E.; DOMINGUEZ.C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. **Toxicology inVitro**. v. 15, p. 271-276, 2001.

HILLMANN, G.; GEURTSEN, W. Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 289, n. 2, p. 145-154, July, 1997.

HOLLAND, R.; PINHEIRO, C.E.; DE MELLO, W.; NERY, M.J., DE SOUZA, V. Histochemical analysis of the dogs' dental pulp after pulp capping with calcium, barium, and strontium hydroxides. **Journal of Endodontics**, v. 8, n. 10, p. 444-447, Oct, 1982.

HOLLAND, R.; SOUZA, V.; MURATA, S.S; NERY, M.J.; BERNABÉ, P.F.E.; OTOBONI FILHO, J.A.; DEZAN JÚNIOR, E. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or cement Portland. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v.12, n.2, p.109-113, 2001.

HOLLAND, R.; SOUZA, V.; NERY, M.J.; OTOBONI FILHO, J.A.; BERNABÉ, P.F.E.; DEZAN JÚNIOR, E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, Chicago, v.25, n.3, p.161-166, Mar. 1999.

HOLLAND, R.; SOUZA, V.; MELLO, W.; NERY, M.J.; BERNABÉ, P.F.E. Influência dos fragmentos de dentina no resultado do tratamento conservador da polpa dental exposta ou inflamada. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v.26, n.2, p. 98-102, Abr.-Jun. 1978.

HOLLAND, R.; SOUZA, V.; MELLO, W.; NERY, M.J.; BERNABÉ, P.F.E.; OTOBONI FILHO, J.A. Permeability of the hard tissues bridge formed after pulpotomy with calcium hydroxide: a histological study. **Journal American Dental Association**, Chicago, v.99, n.3, p.472-475, sep. 1979.

HORIBE, M.; SAWA, T.; KATAOKA, M.T.; KIDO, J.; NAGATA, T. Regulation of tenascin expression in cultured rat dental pulp cells. **Odontology**, v. 92, n. 1, p. 22-26, Sept. 2004.

HORSTED, P.; EL ATTAR, K.; LANGELAND, K. Capping of monkey pulps with Dycal and a Ca-eugenol cement. **Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology, Oral radiology, and Endodontics**, St Louis, v. 52, n.5, p.531-53, Nov. 1981.

HORSTED-BINDSLEV, P.; VILKINIS, V.; SIDLAUKAS, A. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. **Oral surgery Oral medicine Oral pathology Oral radiology, and Endodontics**, St. Louis, v.96, n.5 p. 591-600, Nov. 2003.

HU, C.C.; ZHANG, C.; QIAN, Q.; TATUM, N.B. Reparative dentin formation in rat molars after direct capping with growth factors. **Journal of Endodontics**, v. 24, p. 744-751, 1998.

HYNES, R. Molecular biology of fibronectin. **Ann. Rev. Biol.**, v. 1, p. 67-90, 1985.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Dentistry – Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – Test

methods for dental materials. ISO 7405:1997. Disponível em: <<http://www.iso.ch/iso/en/prods-services/ISOstore/store.html>>. Acesso em 28 nov. 2005.

JVALET, J.; TORABINEJAD, M.; BACKLAND, L.K. Comparison of two pH levels for the induction of apical barriers in immature teeth of monkeys. **Journal of Endodontics**, v. 11, p. 375-378, 1985.

JEPSEN, S; ALBERS, HK; FLEINER, B; TUCKER, M; RUEGER, D. Recombinant human osteogenic protein-1 induces dentin formation: an experimental study in miniature swine. **Journal of Endodontics**, Chicago, v.23, n.6, p.378-382, June 1997.

JONES, P.L.; JONES, F.S. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. **Matrix Biology** , v. 19, p. 581-596 , 2000.

JUHASZ, I.; MURPHY, G.F.; YAN, H.C.; HERLYN, M.; ALBELDA, S.M. Regulation of extracellular matrix proteins and integrin cell substratum adhesion receptors on epithelium during cutaneous human wound healing in vivo. **American Journal of Pathology**, v. 143, n. 5, p. 1458-1469, Nov. 1993.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FITZGERALD, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, St. Louis, v.20, n.3, p.340-349, sep. 1965.

KARJALAINEN, S.; SODERLING, E.; PELLINIEMI, L.; FOIDART, J.M. Immunohistochemical localization of types I and II collagen and fibronectin in the dentine of carious human teeth. **Archives of Oral Biology**, v. 31, p. 801-806 , 1986.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**: texto –atlas correlações clínicas. 1 ed. São Paulo: Panamericana, 1999, 381 p.

KATOH, M.; KIDOKORO, S.; KUROSU, K. A study on the amputation of pulp using sodium hypochlorite (NaOCl). **Japanese Journal Pediatric Dentistry**, v.16, p. 107-16. 1978.

KIBA, H.; HAYAKAWA, T.; NAKANUMA, K.; YAMAZAKI, M.; YAMAMOTO, H.J. Pulpal reactions to two experimental bonding systems for pulp capping procedures. **Journal Oral Science**, Tokyo, v. 42, n. 2, p. 69-74, Jun. 2000.

KITASAKO, Y.; INOKOSHI, S.; FUJITANI, M.; OTSUKI, M.; TAGAMI, J. Short-term reaction of exposed monkey pulp beneath adhesive resins. **Operative Dentistry**, Seattle, v. 23, n.6, p. 308-17, Nov/Dec. 1998.

KITASAKO, Y.; MURRAY, P.E.; TAGAMI, J.; SMITH, A.J. Histomorphometric analysis of dentinal bridge formation and pulpal inflammation. **Quintessence International**, Berlin, v. 33, n.8, p. 600-8, Sep. 2002.

KOUKOLIS, G. K.; GOULD, V. E.; BHATTACHARYYA, A.; GOULD, J. E.; HOWEEDY, A. A.; VIRTANEN, I. Tenascin in normal, reactive, hyperplastic and

neoplastic tissues: biological and pathologic implications. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 22, n. 7 p. 636-643, 1991.

KRUSE, J.; KEILHAUER, G.; FAISSNER, A.; TIMPL, R.; SCHACHNER, M. The J1 glycoprotein--a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature*, v.316, p. 146-148, 1985.

LARJAVA, H.; SALO, T.; HAAPASALMI, K.; KRAMER, R. H.; HEINO, J. Expression of integrins and basement membrane components by wound keratinocytes. **The Journal of Clinical Investigation**. Ann Arbor, v. 92, n. 3, p. 1425-1435, 1993.

LEE, S; MONSEF, M; TORABINEJAD, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. **Journal of Endodontics**, Chicago, v.19, n.11, p.541-544, nov. 1993.

LESOT, H.; LISI, S.; PETERKOVA, R.; PETERKA, M.; MITOLO, V.; RUCH, J.V. Epigenetic signals during odontoblast differentiation. **Adv Dent Res**, v. 15, p. 8-13, 2001.

LESOT, H.; OSMAN, M.; RUCH, J.V. Immunofluorescent localization of collagens, fibronectin and laminin during terminal differentiation of odontoblasts. **Developmental Biology**, v. 82, p. 371-381, 1981.

LESOT, H.; SMITH, A. J.; TZIAFAS, D.; BÈGUE-KIRN, C.; CASSIDY, N.; RUCH, J.V. Biologically active molecules and the dental tissue repair: a comparative review of reactionary and reparative dentinogenesis with the induction of odontoblast differentiation in vitro. **Cells and Materials**, v. 4, n. 3, p. 199-218, 1994.

LINDE, A. Session II: cells and extracellular matrices of the dental pulp. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. **Journal Dental Research**, Chicago, v.64, n.3 (special issue), p. 523-529, Apr. 1985.

LOVSCHALL, H.; FEGERSKOV, O.; FLYVBJERG, A. Pulp capping with recombinant human insulin growth factor-I (rhIGF-I) in rat molars. **Adv Dent Res**, v.15, p. 108-112, 2001.

LUKINMAA, P.L.; MACKIE, E.J.; THESLEFF, I. Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins – tenascin and the ed-sequence-containing form of cellular fibronectin – in human permanent teeth and periodontal ligament. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 70, n. 2, p. 19-26, Feb. 1991.

MACKIE, E.J.; THESLEFF, I.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. **Journal Cell Biology**, New York, v. 105, n. 6, pt. 1, p. 2569-2579, Dec. 1987.

MARTINEZ, E. F.; de SOUZA, S. O. M.; CORRÊA, L.; de ARAÚJO, V. C. Immunohistochemical localization of tenascin, fibronectin, and type III collagen in human dental pulp. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 12, p. 708-711, 2000.

MATSUO, T.; NAKANISHI, T.; SHIMIZU, H.; EBISU, S. A clinical study of direct pulp capping applied to carious-exposed pulps. **Journal of Endodontics**, Chicago, v.22, n.10, p.551-6, Oct. 1996.

MJOR, I.A. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 2: initial reactions to preparation of teeth for restorative procedures. **Quintessence International**, v. 32, p. 537-551, 2001.

MJÖR, IA; DAHL, E; COX, CF. Healing of pulp exposures: an ultrastructural study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v.20, n.10, p.496–501, Nov. 1991.

MJÖR, IA. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 7: The exposed pulp. **Quintessence International**, Berlin, v.33, n.2, p.113-135, Feb. 2002.

MOHRI, H. Fibronectin and integrins interactions. **Journal of Investigative Medicine**, Thoro Fane, v. 44, n. 8, p. 429-441, 1996.

MORI, M.; YAMADA, T.; DOI, T.; OHMURA, H.; TAKAI, Y.; SHRESTHA, P. Expression of tenascin in odontogenic tumors. **Oral Oncology**, Oxford, v. 31B, n. 4, p. 275-279, July 1995.

MURRAY, P.E.; HAFEZ, A.A.; SMITH, A.J.; WINDSOR, L.J.; COX, C.F. Histomorphometric analysis of odontoblast-like cell numbers and dentine bridge secretory activity following pulp exposure. **International Endodontic Journal**, v. 36, p. 106-116, 2003.

NAKAMURA, Y.; HAMMARSTRON, L.; LUNDBERG, E.; EKDAHL, H.; MATSUMOTO, K.; GESTRELIUS, S.; LYNGSTADAAS, S.P. Enamel matrix derivative promotes reparative processes in the dental pulp. **Adv Dent Res**, v. 15, p. 105-107, 2001.

NAKASHIMA, M. Induction of dentine in amputated pulp of dogs by recombinant human bone morphogenetic proteins-2 and -4 with collagen matrix. **Archives of Oral Biology**, v. 39, n. 12, p. 1085-1090, Dec. 1994.

OGUNTEBI, B.R.; HEAVEN, T.; CLARK, A.; PINK, F.E. Quantitative assessment of dentin bridge formation following pulp-capping in miniature swine. **Journal of Endodontics** , v. 21, p. 79-82, 1995.

OREND, G.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Adhesion modulation by antiadhesive molecules of the extracellular matrix. **Experimental Cell Research** , v. 261, p. 104-110, 2000.

PAMEIJER, C.H.; STANLEY, H.R. The disastrous effects of the “total Etch” technique in vital pulp capping in primates. **American Journal of Dentistry**, San Antonio, v.11, p. S45-S59, Jan. 1998.

PITT FORD, T.R.; TORABINEJAD, M.; ABEDI, H.R.; BAKLAND, L.K.; KARIYWASAM, S.P. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material.

Journal American Dental Association, Chicago, v.127, n.10, p.1491-1494, Oct. 1996.

PITT FORD, T.R. Pulpal response to a calcium hydroxide material for capping exposures. **Oral surgery Oral medicine Oral pathology**, St. Louis, v. 59, n.2, p. 144-7, Feb. 1985.

PIVA, E.; TARQUÍNIO, S.B.C.; DEMARCO, F.F.; SILVA, A.F.; ARAÚJO, V.C. Immunohistochemical Expression of Fibronectin and Tenascin after Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, in press, 2006

POTTS, J.R.; CAMPBELL, I.D. Fibronectin structure and assembly. **Curr Opin Cell Biology**, v. 6, n. 5, p. 648-655, Oct. 1994.

PUCHER, J.J.; DANIEL, J.C. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. **Journal of Periodontology**, v. 63, p. 526-532, 1992.

QUEIROZ, A.M.; ASSED, S.; LEONARDO, M.R.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L.A.B. MTA and calcium hydroxide for pulp capping. **Journal Applied Oral Science**, Bauru, v.13, n.2, p.126-130, Apr./June 2005.

RASHID, F.; SHIBA, H.; MIZUNO, N.; MOURI, Y.; FUJITA, T.; SHINOHARA, H. ET AL. The effect of extracellular calcium ion on gene expression of bone-related proteins in human pulp cells. **Journal of Endodontics**, v. 29, p. 104-107, 2003.

RETTIG, W.J.; GARIN-CHESA, P. Cell type-specific control of human neuronectin secretion by polypeptide mediators and phorbol ester. **Journal Histochemical and Cytochemical**, v. 37, n. 12, p. 1777-1786, Dec. 1989.

RUCH, J.V. Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 64, p. 489-498, Apr. 1985.

RUCH, J.V.; LESOT, H.; BEGUE-KIRN, C. Odontoblast differentiation. **International Journal Development Biology**, v. 39, n. 1, p. 51-68, Feb. 1995.

RUEGG, C.R.; CHIQUET-EHRISMANN, R.; ALKAN, S.S. Tenascin, an extracellular matrix protein, exerts immunomodulatory activities. **Proc Nat Acad Sci U S A**, v. 86, n. 19, p. 7437-7441, Oct. 1989.

RUOSLAHTI, E. Fibronectin. **Journal of Oral Pathology**, Copenhagen, v. 40, n. 1, p. 3-13, Feb. 1981.

RUTHERFORD, R.B.; WAHLE, J.; TUCKER, M.; RUEGER, D.; CHARETTE, M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. **Archives of Oral Biology**, v. 38, n. 7, p. 571-576, Jul. 1993.

SAGE, E.H., BORNSTEIN, P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, n. 23, p.14831-14834, 1991.

[SALAKO, N.](#); [JOSEPH, B.](#); [RITWIK, P.](#); [SALONEN, J.](#); [JOHN, P.](#); [JUNAID, T.A.](#) Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. **Dental Traumatology**, Copenhagen, v.19, n.6, p.314-320, Dec. 2003.

SCHERBERICH, A.; TUCKER, R.P.; SAMANDARI, E.; BROWN-LUEDI, M.; MARTIN, D.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Murine tenascin-W: a novel mammalian tenascin expressed in kidney and at sites of bone and smooth muscle development. **Journal Cell Science**, v.1, n. 117(Pt 4), p. 571-581, Feb. 2004.

SCHRÖDER, U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. **Journal of Dental Research**, v. 64(Spec Issue) p. 541-548, 1985.

SCHRÖDER, U.; GRANATH, L.E. Early reaction of inert human teeth to calcium hydroxide following experimental pulpotomy and its significance to the development of the hard tissue barrier. **Odontology Review**, Lund, v. 22, n.4, p. 379-395. 1971.

SENIA, E.S.; MARSHALL, F.J.; ROSEN, S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 31, n. 1, p. 96-103, Jan,1971.

SEUX, D.; COUBLE, M.L.; HARTMANN, D.J.; GAUTHIER, J.P.; MAGLOIRE, H. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. **Archives of oral Biology** , v. 36, p. 117-128, 1991.

SILVA, A.F.; TARQUÍNIO, S.B.C.; DEMARCO, F.F.; PIVA, E.; RIVERO, E.R.C. The influence of haemostatic agents on healing of healthy human dental pulp tissue capped with calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 4, p. 309-316, Apr, 2006.

SIX, N.; LASFARGES, J.J.; GOLDBERG, M. In vivo study of the pulp reaction to Fuji IX, a glass ionomer cement. **Journal of Dentistry**, v. 28, n. 6, p. 413-422, Aug. 2000.

SIX, N.; LASFARGES, 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).**Archives of Oral Biology**, v. 47, n. 3, p. 177-187, Mar. 2002.

SMITH, A.J.; GARDE, C.; CASSIDY, N.; RUCH, I.V.; LESOT, H. Solubilization of dentine extracellular matrix by calcium hydroxide [abstract 751]. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 74, p. 829, 1995.

SMITH, A.J. Pulpal responses to caries and dental repair. **Caries Research**, Basel, v.36, n.4, p.223-232, July-aug. 2002.

Smith AJ. Vitality of the denti-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. **Journal of Dental Education**, Washington, v. 67, n. 6, p. 678-89, Jun. 2003.

SPRING, J.; BECK, K.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Two contrary functions of tenascin: dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments. **Cell**, v. 59, n. 2, p. 325-334, Oct. 1989.

STANLEY, H.R.; CLARK, A.E.; PAMEIJER, C.H.; LOUW, N.P. Pulp capping with a modified Bioglass formula (#A68-Modified). **American Dental Journal**, San Antonio, v.14, n.4, p.227-32, Aug. 2001.

STANLEY, H.R. Pulp capping: conserving the dental pulp - can it be done? Is it worth it? **Oral surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, St. Louis, v.68, n.5, p.628-639, Nov. 1989.

STANLEY, HR; LUNDY, T. Dycal therapy for pulp exposures. **Oral surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, St. Louis, v.34, n.5, p.818-827, Nov. 1972.

STEELE, J.G.; JOHNSON, G.; UNDERWOODS, P. A. Role of serum vitronectin and fibronectin in adhesion of fibroblasts following seeding onto tissue culture polystyrene. **Journal Biomed Materials Research**, New York, v. 26, n. 7, p. 861-884, July 1992.

TEIXEIRA, L.S.; DEMARCO, F.F.; COPPOLA, M.C.; BONOW, M.L. Clinical and radiographic evaluation of pulpotomies performed under intrapulpal injection of anaesthetic solution. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 34, n.6 , p. 440-6, Sep. 2001.

TEN CATE, A.R. Dentinogenesis. In: TEN CATE, A.R., ed. **Oral Histology, Development, Structure and Function**, 5th edn. St. Louis, MO, USA: Mosby, 128-49, 1998.

THESLEFF, I.; HURMERINTA, K. Tissue interactions in tooth development, **Differentiation**, London, v. 18, n. 2, p. 75-78, 1981.

THESLEFF, I.; KANTOMAA, T.; MACKIE, E.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Immunohistochemical localization of the matrix glycoprotein tenascin in the skull of the growing rat. **Archives of Oral Biology**, New York, v. 33, n. 6, p. 383-390, 1988.

THESLEFF, I.; PARTANEN, A.M.; VAINIO, S. Epithelial-mesenchymal interactions in tooth morphogenesis: the roles of extracellular matrix, growth factors, and cell surface receptors. **Journal Craniofac Genet Dev Biol**, v. 11, n. 4, p. 229-237, Oct. 1991.

THESLEFF, I.; STENMAN, S.; VAHERI, A.; TIMPL, R. Changes in the matrix proteins, fibronectin and collagen, during differentiation of mouse tooth germ. **Development of Biology**, v. 70, n. 1, p. 116-126, May. 1979.

THESLEFF, I.; MACKIE, E.; VAINIO, S.; CHIQUET-EHRISMANN, R. Changes in the distribution of tenascin during tooth development. **Development**, v. 101, n. 2, p. 289-296, Oct. 1987.

TORABINEJAD, M.; HONG, C.U.; MC DONALD, F.; PITT FORD, T.R. Physical and Chemical Properties of a New Root-End Filling Material. **Journal of Endodontics**, Chicago, v.21, n.7, p.349-353, July 1995.

TORNECK, C.D.; TORABINEJAD, M. Biologia da polpa e tecidos da região periapical. In WALTON, R.E.; TORABINEJAD, M. **Princípios e práticas em endodontia**, 2 ed. São Paulo:Santos, 1997. p. 6-28.

TZIAFAS, D.; PANAGIOTAKOPOULOS, N.; KOMNENOU, A. Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine or calcium hydroxide-containing cement. **Archives of Oral Biology**, v. 40, p. 23-31, 1995.

TZIAFAS, D.; ALVANOU, A.; PAPADIMITRIOU, S.; GASIC, J.; KOMNENOU, A. Effects of recombinant fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor- β 1 on dog dental pulp cell in vivo. **Archives of Oral Biology**, v. 43, p. 431-444, 1998.

TZIAFAS, D.; SMITH, A.J.; LESOT, H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. **Journal of Dentistry**, Bristol, v.28, n.2, p.77-92, Feb. 2000.

TZIAFAS, D; PANTELIDOU, O; ALVANOU, A; BELIBASAKIS, G; PAPADIMITRIOU, S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. **International Endodontic Journal**, Oxford, v.35, n.3, p.245-254, mar. 2002.

TZIAFAS, D. The future role of a molecular Approach to pulp-dentinal regeneration. **Caries Research** 38, 314-320, 2004.

TZIAFAS, D. Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. **International Endodontic Journal**, Oxford, v.27, n.2, p.61-74, mar.1994.

VAN AMERONGEN, J.P.; LEMMENS, I.G.; TONINO, G. J. M. The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp. **Archives of Oral Biology**, New York, v. 28, n. 4, p.339-345, 1983.

VAN AMERONGEN, J.P.; LEMMENS, I.G.; TONINO, G.J.M. Immunofluorescent localization and extractability of fibronectin in human dental pulp. **Archives of Oral Biology**, New York, v. 29, n. 2, p.93-99, 1984.

VEIS,A. The role of dental pulp--thoughts on the session on pulp repair processes. **J Dent Res**,v. 64, (Spec No), p. 552-554. Apr. 1985.

WALTON, R.E.; PASHLEY, D.H.; OGILVIE, A.L. Histologia e fisiologia da polpa dental. In INGLE, I.D.; TAINTOR, F.J. **Endodontia**, 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1989. p. 264-290.

WANG,P.; HAO, J.; SHI, J. Actions of bovine plasma fibronectin on cultured human dental pulp cell. **Chin J Dent Res**, v. 3, n. 1, May, 2000.

WILKEN, R.; BOTHE, S.J.; GROBLER, A.; GERMISHUYS, P.J. In vitro cytotoxicity of chlorehexidine gluconate, benzydamine-HCl and povidone iodine mouthrinses on human gingival fibroblasts. **SADJ**, v. 10, n. 56, p. 455-460, 2001.

WILLEMS, I. E., ARENDS, J. W., DAEMEN, M .J. Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. **The Journal of Pathology**, West Sussex, v. 179, n. 3, p. 321-325, 1996.

YAMADA, K.M.; OLDEN, K. Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. **Nature**, London, v. 275, n. 5677, p. 179-184, Sept. 1978.

YAMAMURA, T. Differentiation of pulpar cell and inductive influences of various matrices with reference to pulpar wound healing. **Journal Dental Research**, Chicago, v. 64 (Spec Issue), p. 530-40, Apr.1985.

YOSHIBA, N.; YOSHIBA, K.; IWAKU, M.; NAKAMURA, H. A confocal laser scanning microscopic study of the immunofluorescent localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. **Archives of Oral Biology**, v. 39, p. 395-400, 1994.

YOSHIBA, K.; YOSHIBA, N.; NAKAMURA, H.; IWAKU, M.; OZAWA, H. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. **Journal of Dental Research**, v. 75, p. 1590-1597, 1996.

ANEXO 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER Nº 08/05
REF. PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 01/05

Com base no parecer do relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa "Avaliação da biocompatibilidade e da genotoxicidade do hipoclorito de sódio e do gluconato de clorexidina utilizados previamente ao capeamento pulpar direto e estudo imunistoquímico da expressão de componentes da matriz extracelular em polpas humanas expostas a esses agentes hemostáticos", de responsabilidade da Professora Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio.

Pelotas, 5 de abril de 2005

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Laura Meneses Bonow'.

Profª Dra. Maria Laura Meneses Bonow
Coordenadora do CEP-FO-UFPeI

ANEXO 2

The influence of haemostatic agents on healing of healthy human dental pulp tissue capped with calcium hydroxide

A. F. Silva, S. B. C. Tarquinio, F. F. Demarco, E. Piva & E. R. C. Rivero

Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

Abstract

Silva AF, Tarquinio SBC, Demarco FF, Piva E, Rivero ERC. The influence of haemostatic agents on healing of healthy human dental pulp tissue capped with calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, **39**, 309–316, 2006.

Aim To investigate the hypothesis that different haemostatic agents could impair the histological response of human pulps capped with calcium hydroxide.

Methodology Forty-five third molars scheduled for extraction were selected. Class I cavities with pulp exposures were prepared. Three agents were used to control bleeding: 0.9% saline solution (control, $n = 14$), 5.25% sodium hypochlorite ($n = 16$) and 2% chlorhexidine digluconate ($n = 15$). The pulps were dressed with hard-setting calcium hydroxide cement. After 7, 30 or 90 days, teeth were extracted, formalin-fixed and prepared for histochemical techniques. The biological response was categorized using the following criteria: inflammatory response, soft tissue organization, reactionary dentine and reparative

dentine. Data were submitted to statistical analysis, using nonparametric Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks. Differences amongst groups were detected using Dunn's method.

Results The statistical analysis disclosed that whilst inflammatory response decreased over time, reactionary dentine deposition and reparative dentine formation increased in the latter periods of evaluation ($P < 0.05$). The three agents had similar performances for all criteria evaluated. The conventional pulp response to calcium hydroxide was observed over time, and complete pulp healing was observed in 88% of the specimens after 90 days.

Conclusion The three haemostatic agents did not impair the healing process following pulp exposure and capping with calcium hydroxide at different time intervals investigated.

Keywords: biocompatibility, calcium hydroxide, haemostatic agents, pulp healing.

Received 18 April 2005; accepted 28 November 2005

Introduction

The maintenance of pulp vitality has been a challenge for restorative dentistry (Smith *et al.* 2002), yet it is essential for the preservation of the pulp–dentine complex. In the last few decades, vital pulp therapies have been developed; however, the long-term clinical

evaluation of teeth with capped pulps has demonstrated a significant reduction in the maintenance of vitality (Barthel *et al.* 2000).

Several factors influence the outcome of pulp capping, amongst them the effective control of bleeding, which is necessary to improve the favourable prognosis of conservative vital therapy (Stanley 1989). An ideal haemostatic agent should be bacteriostatic and/or a bactericide, when used in pulp exposures created by caries removal. If the control of bleeding fails, the development of a blood clot between the capping material and pulp tissue would prevent intimate contact, favouring the persistence of a chronic inflammatory

Correspondence: Flávio F. Demarco, DDS, PhD, Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Rua Gonçalves Chaves, 457-Centro, Pelotas, RS CEP 96015-560, Brazil. (Tel./fax: 55 53 2224439; e-mail: fdemarco@ufpel.edu.br).

response whilst impairing the healing process (Schroder 1973, 1985, Stanley 1989, Cox *et al.* 1998, 1999, Costa *et al.* 2001).

Few studies have investigated the influence of haemostatic agents on the healing process. One of the most common agents to control pulp bleeding is saline solution. However, this substance might not be effective in some situations (Stanley 1989). The application of sodium hypochlorite (NaOCl) has been considered successful in adhesive pulp capping and has shown biocompatibility when used as a haemostatic agent (Cox *et al.* 1998, Costa *et al.* 2001, Hafez *et al.* 2002). However, a severe cytotoxic effect has been observed in cell cultures with sodium hypochlorite, even in low concentrations (Heling *et al.* 2001). The biocompatibility of chlorhexidine digluconate has not been determined completely (Thomas *et al.* 1995). Disastrous results were obtained in adhesive capping in monkey pulps using 2% chlorhexidine as the haemostatic agent (Pameijer & Stanley 1998). Conversely, Horsted-Bindslev *et al.* (2003) observed only mild inflammatory reactions after application of 0.2% chlorhexidine digluconate in human pulps.

The null hypothesis of this study was that different haemostatic agents do not impair the healing process of human pulps capped with calcium hydroxide. Thus, the study evaluated the interference of three haemostatic solutions on the repair process (0.9% saline solution, 5.25% sodium hypochlorite or 2% chlorhexidine digluconate) used prior to calcium hydroxide application.

Materials and methods

Experimental design and direct pulp-capping procedures

The research protocol was approved by the Ethics Committee, Federal University of Pelotas (no. 048/2002). All patients provided written consent to participate in the study. Forty-five human maxillary third molars scheduled for extraction for orthodontic reasons were selected. Teeth were from 14 males (54%) and 12 females (46%), with a mean age of 23 (± 2.59) years. Local anaesthesia was administered (Mepivacaine 2% with 1 : 100,000 epinephrine – DFL Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). The operative and restorative procedures were carried out under rubber dam isolation. Prophylaxis was performed with rubber cups and pumice.

Class I cavities were prepared, using a round diamond bur no. 1014 (KG Sorensen Ind. & Com.

Ltda, São Paulo, SP, Brazil) to remove enamel and a carbide bur no. 330 (KG Sorensen) for dentine removal. Burs were used in high-speed handpieces, under copious air/distilled water cooling, and were replaced after each cavity preparation. The cavity floor was deepened until pulp exposure. The active point of the bur determined the size of the exposure (0.08 mm). The procedures were performed to avoid pulp tissue damage by bur intrusion, which could impair healing and also affect the histological analysis.

The cavities were randomly divided into three groups, based on different agents used to treat the pulp exposure: 0.9% saline solution (control); 2% chlorhexidine digluconate or 5.25% sodium hypochlorite (Table 1). A randomization table was used to define the agent, so that each patient had one of the treatments distributed by chance, and necessary adjustments were made to assure an equal treatment distribution. In those cases where the patient provided more than one tooth, different agents were applied in the same individual. Soon after pulp exposure, a sterilized cotton pellet soaked in the appropriate solution, based on the group, was applied with light pressure for 30 s. The cavity was then gently dried with absorbent paper and sterilized cotton pellets.

Hard-setting calcium hydroxide cement – Dycal Advanced Formula II[®] (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brazil) was used as the capping material. Following the capping procedure, the cavity preparation was conditioned with 35% phosphoric acid for 30 s in enamel and 15 s in dentine. Two coats of a one-bottle adhesive system (Single Bond; 3M ESPE, St Paul, MN, USA) were applied and photo-activated for 20 s. The cavities were incrementally filled with a microhybrid composite resin

Table 1 Representation of the study design

Group	Number of specimens (n)/days			Total specimens (n)
	7 days	30 days	90 days	
Saline solution	4	5	5	14
Sodium hypochlorite	5	5	6	16
Chlorhexidine digluconate	5	5	5	15
Total specimens (n)	14	15	16	45

Saline solution (control group): 0.9% sodium chloride – Áster Medical Products, SP, Brazil (batch 0944/08/T); 5.25% sodium hypochlorite: Uso Indicado – pharmacy of handling (certificate of quality ISO 9002); 2% chlorhexidine digluconate: FGM Dentistry Products, SC, Brazil (batch 30381).

(Filtek Z250; 3M ESPE). Each increment was photo-activated for 20 s. A XL 3000 (3M ESPE) light curing unit was used during the study, with an energy >450 mW cm⁻². After rubber dam removal, the occlusion was checked to remove premature occlusal contacts, which could lead to additional mechanical injury and interfere with the healing process. One experienced operator performed all the operative and restorative procedures.

Histopathological examination

According to International Standardization Organization (ISO) 7405 guidelines (ISO-7405 1997), the teeth were extracted after 7, 30 or 90 days (Table 1). The apices were sectioned with a diamond bur, under air-water cooling. The teeth were fixed in 10% formalin solution for 48 h and then demineralized in 20% formic acid. Specimens were paraffin-embedded and serially sectioned (4 µm). Serial sections were stained by haematoxylin and eosin (HE) to observe the healing process or the Brown & Hopps (1973) technique to detect the presence of bacteria. Histological sections were evaluated using light microscopy based on the criteria shown in Table 2.

Statistical evaluation

Each criterion for each specimen was determined and the results were submitted to statistical analysis, using the software SigmaStat for windows 3.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The confidence level was set at 95% (P < 0.05) and the data were evaluated using non-parametric Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks. Differences amongst groups were detected using Dunn’s method.

Results

Morphological analysis

Seven-day follow up

• *Group I (n = 4) – control, 0.9% saline solution* (Fig. 1a): no inflammatory infiltrate was observed. Frequently, when evaluating the tissue organization, areas of haemorrhage could be seen. Some samples showed tissue loss at the exposure site with a thin underlying necrotic layer. In other specimens, the tissue loss was larger. Neither reactionary dentine nor dentine barrier formation was detected at the exposure site.

Table 2 Scores attributed for the levels of the histological criteria evaluated (ISO 7405 and adapted from Akimoto et al. 1998)

Scores	Criteria for the morphological analysis			
	Inflammatory response	Soft tissue organization	Reactionary dentine	Reparative dentine
1	None: the pulp contained few inflammatory cells or an absence of inflammatory cells associated with cut tubules of the cavity floor	Normal: there was no injury, disruption or loss of cell survival	None: no evidence of additional dentine deposition at the injury site	None: no dentine barrier formation
2	Mild: the pulp had localized inflammatory cell lesions predominated by polymorphonuclear leucocytes or mononuclear lymphocytes	Mild: there was a superficial loss of cell survival at the site of injury	Mild: there was a mild increase in dentine deposition, constituted by a thin layer produced by the original odontoblasts	Mild: there was some dentine deposition by the odontoblast-like cells at the exposure site, in focal areas
3	Moderate: the pulp had polymorphonuclear leucocytes lesions involving more than one-third of the coronal pulp	Extense: there was an extensive loss of cell survival involving more superficial cells	Intense: there was deposition of a thick and uniform layer of reactionary dentine	Intense: there was uniform dentine formation by the odontoblast-like cells at the exposure site
4	Severe: the pulp tissue was largely necrotic, following chronic inflammatory cell injury	-	-	-

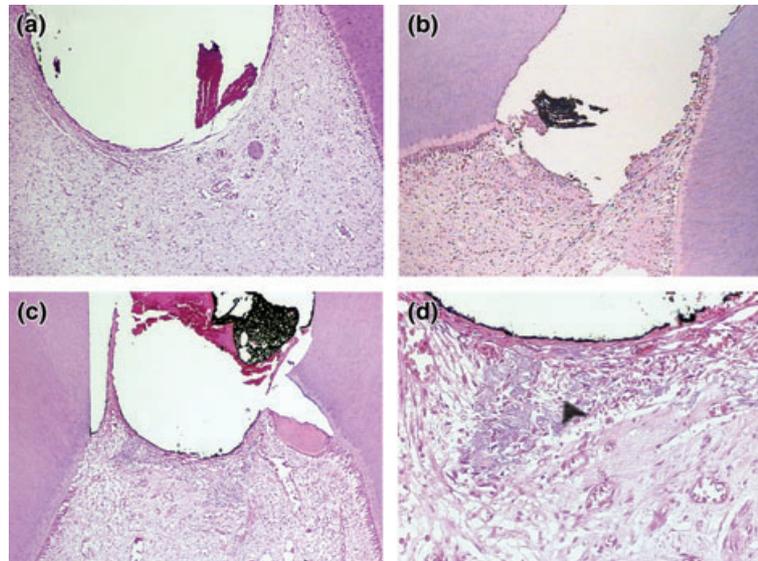


Figure 1 Seven-day follow-up. (a) 0.9% SS group. Loss of pulp tissue is observed, which is covered by a thin necrotic layer. Neither inflammatory infiltrate nor reactionary and reparative dentine was observed. (b) 5.25% SH group. A small loss of soft tissue, restricted to the exposure site, and mild chronic inflammatory infiltrate were observed adjacent to this area. There was no evidence of any reactionary dentine or dentine barrier formation. (c) 2% CD group. Exposure area demonstrated small pulp tissue retraction and presence of inflammatory cells. (d) Magnification of c ($\times 100$). The arrow-head highlights the focus of the inflammatory infiltrate. SS, Saline solution; SH, sodium hypochlorite; CD, chlorhexidine digluconate. Haematoxylin–eosin stain, original magnification $\times 25$ (a, b and c) and $\times 100$ (d).

- *Group II* ($n = 5$) – 5.25% sodium hypochlorite (Fig. 1b): Generally, mild chronic inflammatory infiltrate was observed adjacent to the pulp exposure. Haemorrhage was also noted in the pulp tissue. Almost the entire pulp showed normal morphology, exhibiting loss of soft tissue organization restricted to the exposed pulp area. There was no evidence of any reactionary dentine or dentine barrier formation.

- *Group III* ($n = 5$): 2% chlorhexidine digluconate [Fig. 1(c, d)]: Frequently, the samples treated with this solution demonstrated similar inflammatory pulp response and soft tissue organization to 5.25% sodium hypochlorite. Similarly, no reactionary dentine or dentine barrier was observed.

Thirty-day follow up

- *Group I* ($n = 5$) – control, 0.9% saline solution [Fig. 2(a, b)]: Variable histological findings were observed in the control group when the inflammatory cell response and reactionary dentine deposition/dentine barrier formation criteria were analysed. Some samples exhibited no inflammatory cells or osteodentine barrier. Other specimens showed a moderate inflammatory response associated with

superficial necrosis at the exposure site, either without dentine barrier formation or with some reparative dentine deposition. A small loss of pulp tissue was noted in all samples.

- *Group II* ($n = 5$) – 5.25% sodium hypochlorite [Fig. 2(c, d)]: No inflammatory cell infiltrate was observed. Frequently, a dentine barrier was formed by thin irregular nontubular dentine with cellular inclusions. However, one case showed reparative tubular dentine with a well-established odontoblastic layer under it. Generally, a small, thin rim of new reactionary dentine was observed.

- *Group III* ($n = 5$): 2% chlorhexidine digluconate [Fig. 2(e, f)]: Inflammatory cell response was usually absent, although two cases demonstrated scattered mononuclear cells throughout the pulp tissue. A thicker dentine barrier than that formed with 0.9% saline solution or 5.25% sodium hypochlorite was observed. Additionally, initial tubular dentine barrier was observed under nontubular dentine in some cases. A thin layer of reactionary dentine was frequently present along adjacent walls of cavity preparation. Little pulp tissue was lost at the exposure site.

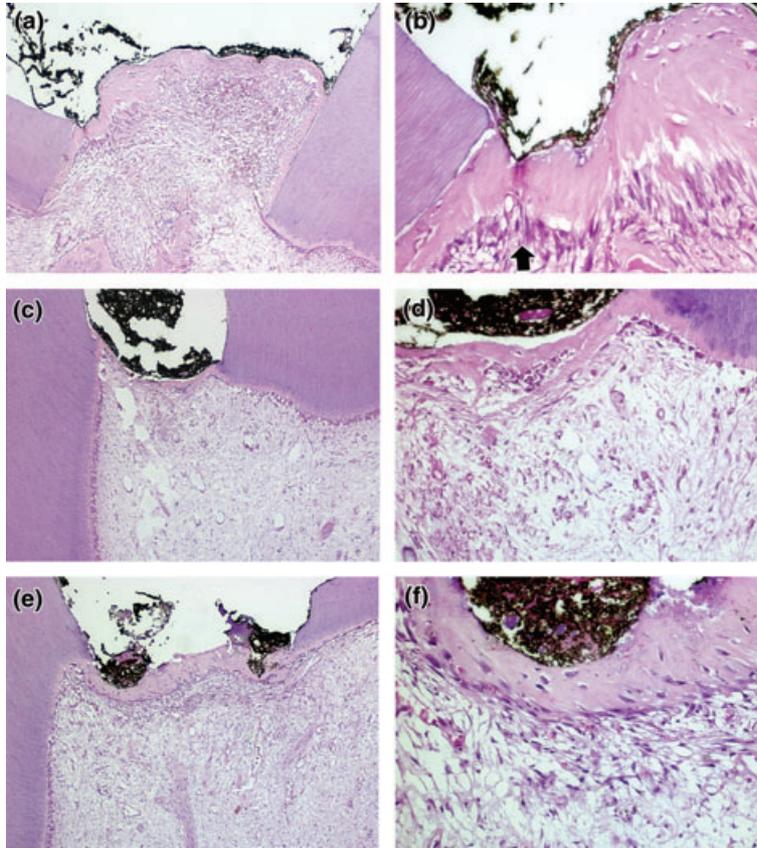


Figure 2 Thirty-day follow up. (a) 0.9% SS group. Dentine barrier formation can be observed at the exposure interface, which showed foci of haemorrhage. (b) In evidence (from a), the odontoblast-like cells aligned under reparative dentine (arrow). (c) 5.25% SH group. A thin, nontubular dentinal barrier was formed. Small loss of tissue was present at the exposure site. (d) Specimen treated with 5.25% SH group exhibiting dentine barrier continuous with the reactionary dentine. (e) 2% CD group. Thick osteodentine barrier was present. No inflammatory cells were observed. (f) In higher magnification (from e), dentine barrier. SS, saline solution; SH, sodium hypochlorite; CD, chlorhexidine digluconate. Haematoxylin–eosin stain, original magnification $\times 25$ (a, c and e) and $\times 100$ (b, d and f).

Ninety-day follow up

- *Group I* ($n = 5$) – control, 0.9% saline solution [Fig. 3(a, b)]: Inflammatory response was always accompanied by a loss of pulp tissue limited to the exposure area. Variable degrees of dentine barrier formation were observed. Fibrodentine/osteodentine was mainly present and two specimens exhibited a tubular dentine barrier with odontoblast-like cells aligned beneath. Reactionary dentine was observed in all specimens, as a thick and uniform deposition in the adjacent walls of cavity exposure.

- *Group II* ($n = 6$) – 5.25% sodium hypochlorite [Fig. 3(c, d)]: Inflammatory cell response was not present in any specimen. Dentine barrier formation was always observed as a continuous hard tissue

composed of an osteodentine outer layer and an inner layer of tubular dentine, with odontoblast-like cells aligned at the pulp tissue interface. A small loss of pulp tissue was noted, just near to the exposure site. In relation to reactionary dentine formation, a thick layer was observed in all cases.

- *Group III* ($n = 5$): 2% chlorhexidine digluconate (Fig. 3e). Only one case, in which the dentine barrier was not formed, demonstrated the presence of a few scattered inflammatory cell responses at the exposure interface. In the remaining specimens, at this interval, thick dentine barriers were found with odontoblast-like cells subjacent to them. Soft tissue formation and reactionary dentine findings were closely related to those observed for sodium hypochlorite.

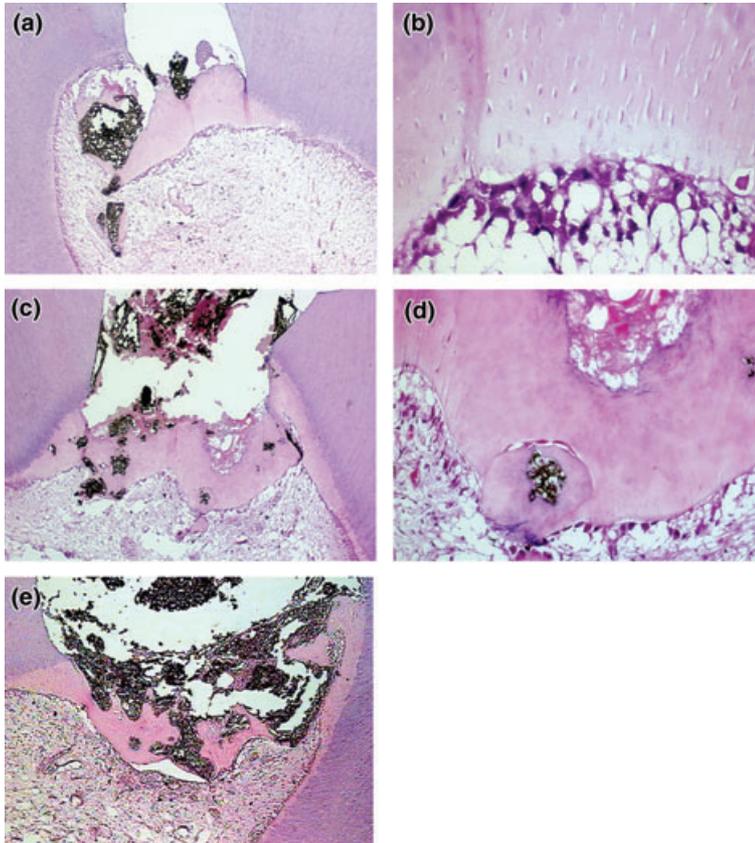


Figure 3 Ninety-day follow up. (a) 0.9% SS group. At the exposure site, dentine barrier with calcium hydroxide inclusions was noted. (b) In evidence (from a), the alignment of odontoblast-like cells under tubular dentine barrier. (c) 5.25% SH group. Dentine barrier formation was observed composed of an outer layer of osteodentine and an inner layer of tubular dentine, with odontoblast-like cells aligned beneath. A thick layer of reactionary dentine was also noticed. (d) 5.25% SH group, specimen highlighting the tubular organization of dentine barrier, which was underlined by odontoblast-like cells. Calcium hydroxide inclusions were also present. (e) 2% CD group. Exposure site showing dentine barrier and calcium hydroxide cement. SS, saline solution; SH, sodium hypochlorite; CD, chlorhexidine digluconate. Haematoxylin–eosin stain, original magnification $\times 25$ (a, c and e) and $\times 100$ (d) and $\times 200$ (b).

Bacterial contamination

There was no bacterial staining in any section in all periods of time as observed using Brown & Hopps (1973) technique. The efficiency of the staining technique was tested using carious teeth as a positive control. All teeth in the positive control were stained using this method.

Statistical results

Significantly higher inflammatory response was detected for specimens at 7 days than for specimens at 90 days ($P < 0.01$). The inflammatory response was not influenced by different agents ($P > 0.05$). The three agents tested presented similar behaviours regarding soft tissue organization. The postoperative time had a significant influence ($P < 0.05$) on reactionary dentine formation: 90 days $>$ 30 days $>$ 7 days. Also, sodium hypochlorite exhibited more reactionary dentine at 90 days than the three agents at 7 days ($P < 0.05$). No significant difference was observed amongst agents for reparative dentine formation. However, 90-day

specimens exhibited greater reparative dentine formation than 7-day specimens ($P < 0.001$). The 30-day specimens were similar to 90-day specimens.

Discussion

In this study, the agents used to control bleeding were biocompatible. Despite there being no significant differences observed between them, during the morphological descriptive analysis at the 7 days follow-up period, it was possible to observe the inert response to saline solution, when compared with sodium hypochlorite or chlorhexidine digluconate. No inflammatory response was observed for saline, whilst the two other solutions exhibited a mild inflammatory infiltrate. Sodium hypochlorite has tissue dissolution capacity, interfering with the cytoplasmic membrane integrity by causing irreversible enzymatic inhibition, biosynthetic alterations in cell metabolism and phospholipids destruction in lipid peroxidation (Estrela *et al.* 2003). This is the reason for its bactericidal effect as well as the explanation for adjacent pulp cell destruction. Chlorhexidine digluconate provides the capacity to precipitate cellular

membrane proteins, altering the cellular osmotic balance (Estrela *et al.* 2003), causing cellular lyses. In a recent study, Hernandez *et al.* (2005) observed that fresh mineral trioxide aggregate (MTA) mixed with chlorhexidine produced increased cytotoxicity when compared with fresh MTA and sterile water. However, this finding was not observed in set MTA with chlorhexidine (material which was allowed to dry for 24 h). Despite the initial mild inflammatory response observed in the present study, chlorhexidine and sodium hypochlorite solutions did not impair the inherent healing capacity of pulp tissue, which was confirmed by dentine barrier formation and absence of inflammation at the 90-day follow up.

At 30 days, variable results were observed mainly in relation to reparative dentine deposition. In some specimens, dentine deposition was formed predominantly by fibrodentine or osteodentine, whilst in others there was complete dentine barrier formation. In a few other samples this barrier was absent. These findings could be related to the high metabolic activity and the transitory characteristics of this period, showing different speeds in the deposition of dentine matrix in different specimens.

After 90 days, the three agents had similar responses. Independent of the used substance, in this period there was a tendency for more organized dentine barriers with the experimental agents, presenting slightly increased tubular dentine deposition, indicating an advanced stage in the repair process. However, significant enhanced reactionary dentine deposition was observed with ageing (90 days > 30 days > 7 days). At 90 days, sodium hypochlorite presented significantly more reactionary dentine deposition than all agents at 7 days. Sodium hypochlorite has the capacity to solubilize the mineralized dentine matrix (Rosenfeld *et al.* 1978, Zhao *et al.* 2000) releasing growth factors, especially TGF- β (Tziafas *et al.* 2000, Smith 2003). It has been demonstrated that TGF- β 1 and TGF- β 3 isoforms have the ability to stimulate extracellular matrix secretion by odontoblast cells, thus, stimulating reactionary dentine deposition (Smith 2003).

The results obtained in this study confirmed the null hypothesis tested that the three agents did not cause interference in healing process after capping with calcium hydroxide. Nevertheless, these results were obtained in healthy pulps and the correlation with the response in inflamed pulps should be made with caution, because the presence of bacteria or their metabolites provokes pulp degeneration and expressive molecular alterations (Huang *et al.* 2005). Therefore,

additional studies should investigate the response of these agents in pulp tissue that has previously been injured during the caries process.

Conclusions

This histological study showed that 5.25% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine digluconate have similar behaviours when compared with the control (0.9% saline solution), and that no agent had impaired the pulp healing process following capping with calcium hydroxide.

Acknowledgements

The authors thank Brazilian government (CAPES) for financial support for this study. Also, authors would like to thank Ms Silvana Pereira de Souza for the technical support during preparation of the histological material.

References

- Akimoto N, Momoi Y, Kohno A, Suzuki S, Otsuki M, Cox CF (1998) Biocompatibility of Clearfil Liner Bond 2 and Clearfil AP-X system on nonexposed and exposed primate teeth. *Quintessence International* **29**, 177–88.
- Barthel CR, Rosenkranz B, Leuenberg A, Roulet JF (2000) Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study. *Journal of Endodontics* **26**, 525–8.
- Brown RC, Hopps HC (1973) Staining of bacteria in tissue sections: a reliable gram stain method. *American Journal of Clinical Pathology* **60**, 234–40.
- Costa CA, Edwards CA, Hanks CT (2001) Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *American Journal of Dentistry* **14**, 25–30.
- Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Suzuki S, Tarim B (1998) Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *American Journal of Dentistry* **11**, S55–63.
- Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Mills JC (1999) Biological basis for clinical success: pulp protection and the tooth-restoration interface. *Practical Periodontics and Aesthetic Dentistry* **11**, 819–26. Quiz 27
- Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pecora JD, Sousa-Neto MD (2003) Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Brazilian Dental Journal* **14**, 58–62.
- Hafez AA, Cox CF, Tarim B, Otsuki M, Akimoto N (2002) An *in vivo* evaluation of hemorrhage control using sodium hypochlorite and direct capping with a one- or two-component

- adhesive system in exposed nonhuman primate pulps. *Quintessence International* **33**, 261–72.
- Heling I, Roststein I, Dinur T, Szwec-Levine Y, Steinberg D (2001) Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions *in vitro*. *Journal of Endodontics* **27**, 278–80.
- Hernandez EP, Botero TM, Mantellini MG, McDonald NJ, Nör JE (2005) Effect of ProRoot MTA mixed with chlorhexidine on apoptosis and cell cycle of fibroblasts and macrophages *in vitro*. *International Endodontic Journal* **38**, 137–43.
- Horsted-Bindslev P, Vilkinis V, Sidlauskas A (2003) Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **96**, 591–600.
- Huang FM, Tsai CH, Chen YJ, Liu CM, Chou MY, Chang YC (2005) Upregulation of tissue-type plasminogen activator in inflamed human dental pulps. *International Endodontic Journal* **38**, 328–33.
- ISO-7405 (1997) Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry, test methods for dental materials. *International Organization for Standardization – ISO E*, 1–18.
- Pameijer CH, Stanley HR (1998) The disastrous effects of the 'total etch' technique in vital pulp capping in primates. *American Journal of Dentistry* **11**, S45–54.
- Rosenfeld EF, James GA, Burch BS (1978) Vital pulp tissue response to sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics* **4**, 140–6.
- Schroder U (1973) Effect of an extra-pulpal blood clot on healing following experimental pulpotomy and capping with calcium hydroxide. *Odontologisk Revy* **24**, 257–68.
- Schroder U (1985) Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *Journal of Dental Research* **64**, 541–8.
- Smith AJ (2003) Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *Journal of Dental Education* **67**, 678–89.
- Smith AJ, Murray PE, Lumley PJ (2002) Preserving the vital pulp in operative dentistry: I. A biological approach. *Dental Update* **29**, 64–9.
- Stanley HR (1989) Pulp capping: conserving the dental pulp – can it be done? Is it worth it? *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **68**, 628–39.
- Thomas GP, Boyd JB, Soni NN, Palmer JE (1995) Histologic study of pulp capping using chlorhexidine in dogs. *National Dental Association* **46**, 17–20.
- Tziafas D, Smith AJ, Lesot H (2000) Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Journal of Dentistry* **28**, 77–92.
- Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ (2000) Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *The Histochemical Journal* **32**, 489–94.

ANEXO 3

Pelotas, 12 de julho de 2005.

DO: Prof. Wladimir Padilha da Silva
Presidente da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da
UFPeI

AO: Prof. Antônio Cesar Bortowski Rosa Leites

Senhor Professor:

Informamos que após submissão ao consultor *Ad Hoc*, o projeto intitulado **“Uso de agentes capeadores pulpares diretos em dentes de suínos”**, foi aprovado pela CEEA da UFPeI em reunião realizada no dia 08/07/05 (Ata 03/2005). Outrossim, salientamos que possíveis alterações no projeto original sejam submetidas a análises por essa comissão. Solicitamos que o referido projeto seja encaminhado em versão eletrônica para o e-mail vlpadilha@ufpel.edu.br, para que possa ser armazenado no banco de dados da CEEA.

Em anexo, encaminhamos o parecer com as sugestões do consultor e documento sobre os princípios éticos na experimentação animal.

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente.


Prof. Wladimir Padilha da Silva
DIRETOR DO DEPTO. DE PESQUISA
PPPG/UFPeI