

Universidade Federal de Alfenas

CAMILA SOARES LOPES

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PULPAR INICIAL APÓS O USO DE MTA E
SULFATO FÉRRICO EM PULPOTOMIAS DE MOLARES DE RATOS**

Alfenas/MG
2018

CAMILA SOARES LOPES

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PULPAR INICIAL APÓS O USO DE MTA E SULFATO FÉRRICO EM PULPOTOMIAS DE MOLARES DE RATOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG.

Linha de pesquisa: Biologia dos tecidos do complexo bucomaxilofacial

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Vivien Thiemy Sakai

CO-ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª Cássia Cilene Dezan Garbelini

Alfenas/MG
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Lopes, Camila Soares

L864a Avaliação da resposta pulpar inicial após o uso de MTA e sulfato férrico em pulpotomias de molares de ratos / Camila Soares Lopes. -- Alfenas/MG, 2018.

75 f.: il. -

Orientadora: Vivien Thiemy Sakai.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2018

Bibliografia.

1. Pulpotomia. 2. Interleucina-6. 3. Sulfato Férrico. I. Sakai, Vivien Thiemy. II. Título.

CDD-617.6342



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37130-000



CAMILA SOARES LOPES

“AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PULPAR INICIAL APÓS USO DE MTA E SULFATO FÉRRICO EM PULPOTOMIAS EM MOLARES DE RATO”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovada em: 02/02/2018

Profa. Dra. Vivien Thiemy Sakai
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: Vivien T. Sakai

Profa. Dra. Naiana Viana Viola Nicoli
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: Naiana V. Viola Nicoli

Profa. Dra. Cristiane Duque
Instituição: Universidade Estadual Paulista
UNESP/SP

Assinatura: Cristiane Duque

Dedico este trabalho aos meus pais, que me deram a vida e me ensinaram a viver com dignidade. Que, em muitas vezes, abriram mão dos seus sonhos para que eu pudesse viver os meus. Dedico essa vitória e agradeço à minha família que faz parte do que hoje eu sou e do que conquistei. Todo meu carinho e gratidão!

AGRADECIMENTOS

À Deus, agradeço essa conquista! Por ter me dado essa graça de chegar até aqui, pelas oportunidades que me foram oferecidas e por me conceder sabedoria e discernimento. Por ter iluminado o meu caminho e colocando pessoas de luz no decorrer de minha jornada, fazendo-se presente em todos os dias. Agradeço à Casa Espirita André Luiz por todo apoio, amor e força que me dão. Por me ajudarem e me guiarem nos momentos mais difíceis e mostrarem o caminho da luz e da fé. E me lembrarem de que o amor e espiritualidade estão sempre comigo. Sem vocês e meus anjos de luz eu não teria chegado até aqui. “Crê em ti mesmo, age e verás os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar (*Chico Xavier*)”.

Aos meus pais Ercílio e Eveline, minha madrinha, minha avó e meus tios, tias, primos e primas da família Soares, obrigada por se fazerem tão presentes, pelos conselhos, pensamentos positivos, orações e por sempre torcerem e ajudarem por minha felicidade e superação. Vocês são minha fortaleza e meu refúgio. Pois, mesmo nas dificuldades e distância temos no coração a certeza de ter outro ao outro! Amo vocês!

Às minhas amigas de infância, Cíntia, Marília, Luiza e Karine, Deus não me concedeu a dádiva de ter irmãos, mas em sua infinita caridade e compaixão colocou vocês em minha jornada quando éramos crianças, e, desde então vocês estão presentes em vida e são como irmãs. Irmãs de alma, que estão presente nos momentos felizes e tristes, me dando todo apoio e força que preciso, vocês são fundamentais em minha vida. Obrigada por tudo e por sempre. Amo vocês!

À Naiana, “Não foi sorte foi Deus”, que em sua infinita misericórdia traçou em meu destino a oportunidade de ser sua aluna, e mais do que isso ter a sua amizade. Desde a graduação você sempre esteve disposta a me ajudar. Muito obrigada por tudo que você fez e faz por mim e pelas inúmeras lições. Por dividir seus conhecimentos comigo, por ter sido a professora que foi para mim, por sempre pensar em mim e principalmente por me deixar fazer parte de sua vida sendo sua amiga. A confiança que você deposita em mim só me faz crescer e acreditar em mim

mesma. A luz de sua alma reflete em sua pessoa física, iluminando e trazendo paz por onde passa, tenho em você um espelho de professora e pessoa que quero ser. As minhas maiores vitórias são fruto do seu apoio incondicional, sou grata à Deus por ter você em minha vida. Obrigada por tudo, amo você!

Um agradecimento especial a **minha orientadora, Profa. Dra. Vivien Thiemy Sakai**, por toda sua dedicação e esforço em me orientar. Por ter tido paciência e carinho em trabalhar comigo no momento delicado da minha vida. Obrigada por ter aceitado me orientar e me receber tão bem. Sou grata por ter convivido com um exemplo de pessoa e profissional que é. E por contribuir na minha formação com tantos ensinamentos, conhecimento e a oportunidade de trabalhar em outras áreas. Muito obrigada por toda atenção e ajuda nessa fase, levarei toda essa experiência e convívio durante a minha jornada. Finalizo essa etapa da minha muito feliz por ter tido a chance de trabalhar com você.

Ao Leopoldo por ter me incentivado e ajudado no início do curso de Pós-graduação. Por toda sua ajuda, ensinamentos, carinho, dicas e principalmente pela sua amizade no decorrer dessa etapa. Sou grata pela nossa parceria, que só tem a crescer e dar belos frutos no decorrer anos.

A Profª Drª Nádia Carolina Teixeira Marques, que me acolheu, incentivou e acreditou em mim desde o começo do curso. Sempre tão prestativa, atenciosa e carinhosa quando pedia seu auxílio. E principalmente pela sua amizade, no qual faço muita questão.

A Profª Drª Juliana dos Santos Neves, que me recebeu com todo carinho, paciência e atenção em sua sala para as análises histológicas, sendo tão prestativa e receptiva. Obrigada pela ajuda durante a realização deste trabalho, que foi fundamental, por me apresentar a Histologia e pelas conversas sobre nossos filhos de quatro patas que eram tão prazerosas.

A Profª Drª Natália Silva Martins, por ter me ajudado a fazer toda a estatística deste trabalho, me recebendo sempre na sua sala. Com tanto carinho, tendo a atenção e cuidado de fazer passa a passo de toda análise comigo. Sua

alegria e bondade são contagiantes, me proporcionando bons momentos apesar do ardo trabalho estatístico. Muito obrigada!

Ao Profº Drº João Adolfo Costa Hanemann, à Profª Drª Marina Lara de Carli e à aluna do Pós Doutorado Marta Miyazawa, por ter paciência e atenção de me ensinarem a usar o microscópio e a realizar as fotografias deste estudo.

À Prof.ª Drª Camila de Oliveira Rodini Pegoraro da FOB – USP, pela atenção, colaboração e disponibilidade para a confecção das lâminas histológicas.

À Profª Drª Ana Beatriz da Silveira Moretti, pela prontidão em ajudar seja na vida acadêmica ou profissional. Obrigada pela ajuda, convivência sempre agradável, amizade e as conversar prazerosas.

Ao ***Corpo Docente*** do Programa de Pós-Graduação pelos valiosos ensinamentos na minha formação. Cada um de vocês foi de suma importância nesta jornada!

Aos colegas de mestrado ***Maria Clara, Paula, Lísia, Nelson, Ana Paula e Amanda***, obrigada por estarem junto comigo nessa etapa da minha vida. Vocês a tornaram mais prazerosa e feliz.

Aos professores Daniela Coelho, Daniela Barroso, Leandro Araújo pela ajuda desde a graduação, com ensinamentos e oportunidades que só me fizeram crescer.

À Profª Elaine Manso, obrigada por me permitir acompanhar o andamento da Clínica de Endodontia, e ajudar aprimorar meus conhecimentos nessa área. Sua postura e excelência são referências para o profissional endodontista.

Às Funcionárias das Clínicas da Faculdade de Odontologia da Unifal-MG, Ana Paula, Luzia, Luciana, Luzia, Mônica, Paloma e Patrícia pelo carinho, atenção e ajuda que sempre tiveram comigo!

À funcionária da Seção de Pós-graduação em Ciências Odontológicas **Jane Silva** pelo auxílio nos problemas e assuntos burocráticos.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas, representada pelo diretor **Prof. Dr. Edmêr Silvestre Pereira Júnior**, por me acolher também no Mestrado. Tenho muito orgulho de ter esta faculdade na minha vida em tantos aspectos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da UNIFALMG, representado pelo coordenador Prof^o Dr^o **João Adolfo Costa Hanemann**, pela possibilidade de crescimento profissional e auxílio do decorrer do curso.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo.

Aos **membros da banca examinadora** pelo aceite do convite para correção, sugestões e críticas que irão acrescentar muito na qualidade deste trabalho.

Aos que não estão presentes nestas linhas, mas que, direta ou indiretamente, participaram da minha caminhada até esse momento.

À todos vocês meus sinceros agradecimentos! *“Se fui capaz de ver mais longe é porque me apoiei em ombros de gigantes” (ISAAC NEWTON).*

Que a força do bem nos proteja, nos guie e, sobretudo, mantenha intacta a nossa capacidade de acreditar no próximo e se encantar com tudo aquilo que ainda pode florescer diante de nós.

(Chico Xavier)

RESUMO

Pulpotomias com agentes capeadores que favoreçam o restabelecimento da saúde da polpa radicular podem ser realizadas em casos de lesões cárie ou traumatismos de dentes decíduos. No entanto, nenhum dos materiais disponíveis apresenta todas as características de um material ideal. O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta pulpar inicial de molares de ratos após pulpotomia com agregado trióxido mineral (MTA) branco ou sulfato férrico 15,5% (SF). Foram utilizados 24 ratos Wistar, distribuídos aleatoriamente em 2 grupos (MTA e SF) e subdivididos de acordo com o tempo de avaliação (24, 48 e 72 horas). Após eutanásia dos animais, os dentes foram removidos em bloco e preparados para análise histológica. Alguns cortes seriados foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e analisados morfometricamente em relação à resposta inflamatória e densidade vascular; outros cortes foram submetidos à imuno-histoquímica para detecção de Interleucina 6 (IL-6). Os dados foram analisados estatisticamente ($p < 0,05$). Não houve diferença no número de células inflamatórias entre os grupos MTA e SF, estando predominantemente localizadas no terço cervical da raiz. Contudo, verificaram-se diferenças entre os tempos analisados apenas no grupo MTA, com maior inflamação às 48 horas. A densidade vascular foi semelhante em ambos os grupos e ao longo do tempo, observando-se uma maior vascularização no terço radicular médio nos dois grupos. Não houve correlação entre o grau de inflamação e a densidade vascular. O tecido conjuntivo pulpar no grupo MTA apresentou-se mais organizado em comparação ao grupo SF. Em ambos os grupos, houve expressão de IL-6 de fraca a moderada em odontoblastos e células inflamatórias. Considerando-se cada grupo isoladamente, houve maior expressão de IL-6 no terço cervical de dentes tratados com MTA às 24 horas e daqueles tratados com SF às 48 e 72 horas. Comparando-se os grupos, houve expressão significativamente maior para o grupo MTA às 24 horas no terço cervical e às 72 horas nos terços médio e apical, enquanto que a maior expressão ocorreu no grupo SF apenas às 24 horas no terço apical. Conclui-se que não há diferença entre os grupos em relação à inflamação e vascularização, com maior inflamação no terço radicular médio às 48 horas. Contudo, a polpa radicular dos dentes tratados com MTA geralmente apresentaram melhores características histológicas e maior expressão de IL-6.

Palavras-chave: Pulpotomia. Interleucina-6. Sulfato Férrico.

ABSTRACT

Pulpotomies with capping materials that enhance the recovery of radicular pulp health may be performed in cases of dental caries or trauma of primary teeth. However, none of the available materials present all the requirements of an ideal material. The purpose of this study was to evaluate the initial pulp response of rat molars after pulpotomy with white mineral trioxide aggregate (MTA) or 15.5% ferric sulfate (FS). Twenty-four Wistar rats, randomly distributed into 2 groups (MTA and FS) and divided according to the period of evaluation (24, 48 and 72 hours), were used. After animal euthanasia, teeth were removed in block and prepared for histological analysis. Some serial sections underwent hematoxylin and eosin (HE) staining and were assessed morphometrically regarding the inflammatory response and vascular density; other sections were subjected to immunohistochemistry for the detection of interleukin 6 (IL-6). Data were analyzed statistically ($p < 0.05$). There was no difference in the number of inflammatory cells between MTA and FS groups, being predominantly localized at the cervical radicular third. However, differences between the periods of evaluation were detected only in MTA group, with increased inflammation at 48 hours. Vascular density was similar in both groups and over the time, with greater vascularization being observed at the medium radicular third in both groups. There was no correlation between the inflammatory status and the vascular density. Pulp connective tissue in MTA group was more organized in comparison with FS group. In both groups, there was expression of IL-6 from weak to moderate in odontoblasts and inflammatory cells. Considering each group separately, there was greater IL-6 expression in the cervical radicular third of teeth treated with MTA at 24 hours and of those treated with FS at 48 and 72 hours. Comparing the groups, there was significantly greater expression for MTA group at 24 hours in the cervical third and at 72 hours in the medium and apical thirds, while the greater expression occurred in the FS group only at 24 hours in the apical third. In conclusion, there was no difference between the groups regarding the inflammatory status and vascularization, with increased inflammation in the medium radicular third at 48 hours. However, the radicular pulp of teeth treated with MTA often presented superior histological features and greater IL-6 expression.

Keywords: Pulpotomy. Interleukin 6. Ferric Sulfate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Contenção do animal.....	32
Figura 2 -	Abertura Coronária.....	33
Figura 3 -	Exposição pulpar e pulpotomia.....	33
Figura 4 -	Pulpotomia com MTA branco.....	33
Figura 5 -	Pulpotomia com SF 15,5%.....	34
Figura 6-	Quantificação das células inflamatórias pelo software Imagen Pro Plus 45.....	36
Figura 7-	Quantificação da densidade vascular pelo software Imagen Pro Plus 45.....	36
Figura 8 -	Imagem em painel de DAB, com área de interesse delimitada para quantificação da imunopressão da IL-6 pelo software Imagen J.....	38
Figura 9 -	Histograma da densidade em pixels da coloração DAB pelo software Imagen J	39
Figura 10-	Fotomicrografias dos terços radiculares de um único de dente do grupo MTA, no período experimental de 24 horas, as quais foram coradas com HE.....	47
Figura 11-	Fotomicrografias dos terços radiculares de um único de dente do grupo MTA, no período experimental de 48 horas, as quais foram coradas com HE.....	48
Figura 12-	Fotomicrografias dos terços radiculares de um único de dente do grupo MTA, no período experimental de 72 horas, as quais foram coradas com HE.....	49

Figura 13-	Fotomicrografias dos terços radiculares de um único de dente do grupo SF, no período experimental de 24 horas, as quais foram coradas com HE.....	50
Figura 14-	Fotomicrografias dos terços radiculares de um único de dente do grupo SF, no período experimental de 48 horas, as quais foram coradas com HE.....	51
Figura 15-	Fotomicrografias dos terços radiculares de um único de dente do grupo SF, no período experimental de 72 horas, as quais foram coradas com HE.....	52
Figura 16-	Fotomicrografias dos terços cervical ou médio radicular de diferentes dentes submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de IL- 6 nos grupos MTA e SF.....	56

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Representação gráfica do resultado do teste t para diferença de médias do número de células inflamatórias dos grupos MTA e SF nos períodos de 24, 48 e 72 horas..... 42
- Gráfico 2** - Representação gráfica do resultado do teste Kruskal-Wallis para o número de células inflamatórias em 24, 48 e 72 horas no Grupo MTA e SF..... 42
- Gráfico 3** - Representação gráfica do resultado do teste Kruskal-Wallis para o número de células inflamatórias nos terços radiculares para o Grupo MTA e o SF..... 43
- Gráfico 4** - Representação gráfica do resultado do teste t para a diferença de médias da densidade vascular dos grupos MTA e SF nos períodos de 24, 48 e 72 horas..... 44
- Gráfico 5** - Representação gráfica do resultado do teste Kruskal-Wallis para a densidade vascular em 24, 48 e 72 horas nos grupos MTA e SF..... 45
- Gráfico 6** - Representação gráfica do resultado do teste Kruskal-Wallis para a densidade vascular nos terços radiculares para o Grupo MTA e o SF..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise de variância a 3 critérios, considerando material (MTA branco ou SF 15,5%), o período de avaliação (24, 48, 72 horas) e o terço radicular (cervical, médio e apical) como fontes de variação.....	54
Tabela 2-	Expressão média de IL-6 nos terços radiculares do tecido pulpar remanescente após pulpotomia com MTA branco ou FS 15,5% durante os períodos experimentais.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPD -	American Academy of Pediatric Dentistry
BSA –	Albumina de soro bovino
EDTA -	Ácido Etileno Diamino-Tetracético
DAB-	3'3 Diaminobenzidina
HE -	Hematoxilina e Eosina
IFN-γ –	Interferon gama
IL-1 -	Interleucina 1
IL-1β -	Interleucina 1 beta
IL-4 -	Interleucina 4
IL-6 -	Interleucina 6
IRM –	Material Restaurador Intermediário
MTA -	Agregado Trióxido Mineral
PBS -	Tampão fosfato-salino
RT-PCR –	Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
SF -	Sulfato Férrico
TNF-α –	Fator de necrose tumoral alfa
ZOE -	Óxido de Zinco e Eugenol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	POLPA DENTÁRIA E INFLAMAÇÃO PULPAR.....	21
2.2	PULPOTOMIA E MATERIAIS CAPEADORES.....	22
2.3	CÉLULAS E MARCADORES INFLAMATÓRIOS.....	27
3	OBJETIVO.....	29
4	METODOLOGIA.....	30
4.1	MODELO EXPERIMENTAL.....	30
4.2	PROCEDIMENTO OPERATÓRIO.....	31
4.3	PREPARO DOS DENTES EXTRAÍDOS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	34
4.4	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO COMPLEXO DENTINO- PULPAR.....	35
4.5	PROTOCOLO PARA IMUNO-HISTOQUÍMICA (MÉTODO DA PEROXIDADE).....	37
4.6	ANÁLISE QUANTITATIVA DA IMUNOEXPRESSÃO PARA IL- 6.....	37
4.7	ANÁLISE DESCRITIVA.....	39
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4.8.1	Análise estatística da quantificação de células inflamatórias e da densidade vascular.....	39
4.8.2	Análise estatística da quantificação da imunexpressão para IL- 6.....	40
5	RESULTADOS.....	41
5.1	ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	41
5.1.1	Quantificação de células inflamatórias.....	41
5.1.1	Quantificação da densidade vascular.....	43
5.2	ANÁLISE DESCRITIVA DOS CORTES CORADOS EM HE	45
5.2.1	Grupo MTA.....	45
5.2.2	Grupo SF.....	46
5.3	QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO PARA IL-6.....	53

5.4	ANÁLISE DESCRITIVA DOS CORTES SUBMETIDOS À IMUNO- HISTOQUÍMICA PARA IL-6.....	54
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO A	75

1 INTRODUÇÃO

A pulpotomia de dentes decíduos consiste na remoção da polpa coronária e colocação de um medicamento no remanescente radicular para manutenção da vitalidade e função deste tecido (AAPD, 2016-2017; ASGARY; SHIRVANI; FAZLYAB, 2014; NIRANJANI et al., 2015) até a época de esfoliação natural, evitando a perda prematura de dentes com alterações de tecidos pulpaes coronários (GOYAL et al., 2016; PARISAY; GHODDUSI; FORGHANI, 2015). É um procedimento indicado em condições clínicas e radiográficas específicas, caracterizadas por exposição pulpar por cárie ou após trauma, polpa resistente ao corte, com sangramento vermelho vivo e passível de hemostasia em tempo inferior a 5 minutos, ausência de reabsorções patológicas e de lesão periapical e interradicular e rizólise de no máximo 1/3 da raiz (NIRANJANI et al., 2015).

Apesar de ser uma técnica estudada há muitos anos, a pulpotomia de dentes decíduos continua causando muitas controvérsias e discussões, principalmente quanto a sua indicação nos dias atuais, mas também quanto à escolha do material capeador, visto que muitos dos agentes capeadores pulpaes não preenchem todos os requisitos de um material ideal para procedimentos conservadores da vitalidade pulpar (AAPD, 2016-2017; CASTRO, 2005; EIDELMAN; HOLAN; FUKS, 2001; FUKS, 2008; MORETTI et al., 2008; SAKAI et al., 2009). O material capeador ideal para a polpa radicular deve ser bactericida, não causar danos às células e estruturas circundantes, promover a cicatrização do tecido pulpar e não interferir com os processos fisiológicos de reabsorção radicular (ASGARY; SHIRVANI; FAZLYAB, 2014; FUKS, 2002; FUKS; PAPAGIANNOULIS, 2006; NIRANJANI et al., 2015; PARISAY; GHODDUSI; FORGHANI, 2015; SONMEZ; SARI; ÇETINBAS, 2008; SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006).

Para preservar a vitalidade do tecido pulpar remanescente e a ocorrência de alterações patológicas, a polpa vital exposta deve ser selada com um material biocompatível, para promover a cicatrização (reparo) ou a regeneração (KIM et al., 2016; LEE et al., 2015). O processo de cicatrização da polpa dentária é caracterizado pela manutenção da vitalidade pulpar sem inflamação, associada ou não à formação de barreira dentinária (DALTOÉ et al., 2016; KIM et al., 2016; LEE et al., 2015). O desafio para os novos materiais capeadores pulpaes é auxiliar a polpa dentária em seu processo de reparo natural, sendo o mais biocompatível possível

(ANSARI; RANJPOUR, 2010).

Diversos pesquisadores avaliaram as reações pulpare frente aos materiais capeadores em longo prazo (AEINEHCHI et al., 2007; AGAMY et al., 2004; CAICEDO et al., 2006; DOMINGUEZ et al., 2003; EIDELMAN; HOLAN; FUKS, 2001; FUKS, 1997; LIN et al., 2014; MORETTI et al. 2008; NIRANJANI et al., 2015; ODABAS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; SAKAI et al., 2009; SHAYEGAN; PETEIN; ABBEELE, 2008; SRINIVASAN; JAYANTHI, 2011). No entanto, as reações iniciais ainda não estão bem elucidadas e acredita-se que falhas nas pulpotomias possam estar relacionadas com reações inflamatórias agudas subclínicas (BARBOSA SILVA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008; OLATOSE; SOTE; ORENUGA, 2015; SHAHI et. al., 2010; YILDIZ; TOSUN, 2014).

Agentes como o hidróxido de cálcio (MORETTI et al., 2008; ODABAS et al., 2011; TRAIRATVORAKUL; KOOTHIRATRAKARN, 2012; WATERHOUSE; NUNN; WHITHWORTH, 2000; YILDIZ; TOSUN, 2014), o sulfato férrico (SF) (IBRICEVIC; AL-JAME, 2003; DEERY, 2005; ERDEM et al., 2011; FUKS et al., 1997; MARKOVIC et al., 2005; ODABAS et al., 2012; PAPAGIANNOULIS, 2002; PENG et al., 2007; SONMEZ; SARI; CETINBAS, 2008; YILDIZ; TOSUN, 2014), o agregado trióxido mineral (MTA) (AEINEHCHI et al., 2007; AGAMY et al., 2004; EIDELMAN; HOLAN; FUKS, 2001; MORETTI et al. 2008; OLATOSE; SOTE; ORENUGA, 2015; PARANJPE et al., 2011; SAKAI et al., 2009; YILDIRIM, et al., 2016; YILDIZ; TOSUN, 2014), o cimento Portland (CONTI et al., 2009; SAKAI et al., 2009; OLIVEIRA et al, 2013, YILDIRIM, et al., 2016) e o Biodentine têm sido bastante investigados com o intuito de se encontrar um material que apresente, além de um sucesso clínico e radiográfico, um potencial biológico que favoreça o restabelecimento da saúde pulpar (ALAMOUDI, 2016; EL MELIGY; ALLAZZAM).

O MTA possui a capacidade de manter a vitalidade pulpar e promover o reparo quando colocado em contato com a polpa dental ou com os tecidos perirradiculares (DALTOÉ et al., 2016; FUNTEAS; WALLACE; FOCHTMAN, 2003). Acredita-se que a habilidade do MTA em induzir a formação de barreira de tecido mineralizado ocorra devido a sua composição, além da sua biocompatibilidade e excelente capacidade de selamento (CAICEDO et al., 2006; CHACKO; KURIKOSE, 2006; DOMINGUEZ et al., 2003; KARABUCAK et al., 2005; MORETTI et al., 2008, OLATOSE; SOTE; ORENUGA, 2015; TORABINEJAD; CHIVIAN, 1999), fornecendo um ambiente ideal para cicatrização (PARIROKH; TORABINEJAD, 2010) e

induzindo a regeneração do tecido pulpar (HAGHGOO; AHMADVAND, 2016). O efeito do MTA como agente capeador pode também ser visto nos canais radiculares, nos quais ocorre uma deposição ativa de tecido mineralizado, com estreitamento ou obliteração do canal radicular (estenose) (EIDELMAN; HOLAN; FUKS, 2001; HOLAN; EIDELMAN; FUKS 2005; SALAKO et al., 2003; MAROTO et al., 2005; MENEZES et al., 2004; MORETTI et al., 2008). Apesar de o MTA apresentar altas taxas de sucesso clínico e radiográfico, seu custo elevado (AL-HAJ ALI; AL-JUNDI; DITTO, 2015; OLATOSE; SOTE; ORENUGA, 2015; WALKER et al., 2013) e capacidade de manchamento dentário (ALSUBAIT; AL-HAIDAR; AL-SHARYAN, 2016; FELMAN; PARASHOS, 2013; MARCIANO; DUARTE; CAMILLERI, 2015; PARIROKH; TORABINEJAD, 2010; YILDIZ; TOSUN, 2014;) são inconvenientes notáveis.

Em alguns países, o SF tem sido considerado o agente capeador de escolha em substituição ao formocresol, visto que ambos os medicamentos têm mostrado taxas de sucesso clínico e radiográfico semelhantes (AL-JAME, 2003; DEERY, 2005; ; IBRICEVIC; MARKOVIC et al., 2005; PAPAGIANNOULIS, 2002). Em contato com o sangue, o SF forma um complexo de proteínas de íons férrico, cuja membrana veda mecanicamente os vasos cortados produzindo hemostasia. Ao formar tampões que obstruem os orifícios capilares, o complexo protéico evita a formação de coágulos de sangue, minimizando a possibilidade de inflamação e reabsorção interna (LEMON; STEELE; JEANSONNE, 1993; SONMEZ; SARI; CETINBAS, 2008).

Apesar dos bons resultados clínicos e radiográficos com MTA e SF, ainda não existem resultados inequívocos sobre a condição histológica do tecido pulpar após pulpotomia com tais materiais. Além disso, análises histológica e imuno-histoquímica são ferramentas adequadas para determinar a condição da polpa remanescente após pulpotomia com diferentes materiais capeadores (LOURENÇO-NETO et al., 2016). Considerando que há escassez de trabalhos que avaliam biologicamente os efeitos do MTA e SF, justifica-se a realização deste estudo para avaliar a resposta inflamatória inicial, através de análise histológica e imuno-histoquímica, após pulpotomia com MTA branco e SF 15,5%.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta sessão apresentamos a revisão da literatura dividida em tópicos para melhor compreensão do assunto.

2.1 POLPA DENTÁRIA E INFLAMAÇÃO PULPAR

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo, de origem mesenquimal com características próprias e está circunscrita e protegida pela dentina. Na sua região periférica, estão os odontoblastos, seguidos de uma zona praticamente acelular (basal) e da zona rica em células. A sua região central é composta por inúmeros vasos sanguíneos, fibras nervosas e células distribuídas na matriz extracelular, de natureza fibrilar e fundamental. Quando toxinas como as produzidas por bactérias atingem a dentina, a inflamação pulpar geralmente ocorre. Se a lesão de cárie não é removida ou os dentes traumatizados não são devidamente tratados, este processo inflamatório avança (AUGSBURGUER; PETERS, 1981; HANNAS et al., 2007).

Em condições de normalidade, a polpa tem uma elevada capacidade de defesa e reparo (TZIAFAS; SMITH; LESOT, 2000). Desse modo, a polpa dental apresenta uma resposta defensiva envolvendo células imunológicas, assim como ocorre em outros tecidos. A presença de determinados tipos celulares e suas principais funções têm um papel importante para que o processo inflamatório pulpar não avance e lese irreversivelmente o tecido (IZUMI et al., 1995).

A resposta inflamatória da polpa pode ser desencadeada por agressões causadas por procedimentos odontológicos, como calor e materiais capeadores e restauradores, trauma, atrição, infecção causada por lesões de cárie, micro infiltrações de restaurações, dentre outras. Uma infecção dentária pode resultar em respostas imunes e inflamatórias mediadas por eventos moleculares e celulares e desorganização tecidual (HUI et al., 2017). Contudo, nem toda reação pulpar irá causar um dano permanente à polpa, desde que os dentes sejam tratados adequadamente, a inflamação não seja exacerbada e que estejam presentes mediadores próprios da reparação pulpar (TROWBRIDGE, 2002).

Há evidências de que a inflamação seja necessária para que haja o processo de reparo da polpa (PARK et al., 2015; TROWBRIDGE, 2002). A reação inflamatória

é representada pelo balanço entre os mediadores pró e anti-inflamatórios que irão neutralizar os efeitos prejudiciais do agente irritante e minimizar o dano tecidual (COOPER et al., 2010). Além disso, a inflamação pulpar é caracterizada por mudança no fluxo sanguíneo, na função das células imunocompetentes e na atividade neuronal. Mediadores incluindo a histamina, prostaglandinas e neuropeptídeos estão envolvidos em um ou mais desses processos (OLGART; EDWAL; GRAZELIUS, 1991; STERIN-BORDA et al., 2007).

Os mecanismos moleculares envolvidos na cicatrização precisam ser melhores compreendidos, e novos biomateriais necessitam ser desenvolvidos (ZANINI et al., 2012), permitindo assim obter melhores resultados após ao tratamento. Contudo, a intensidade da resposta inflamatória inicial destes materiais deve ser previamente esclarecida (SHAHI et. al., 2010).

2.2 PULPOTOMIA E MATERIAIS CAPEADORES

A preservação dos dentes decíduos antes da erupção dos dentes permanentes é muito importante, uma vez que ajudam a preservar a forma da arcada dentária e as funções do sistema estomatognático, mantêm o espaço entre os dentes, orientam a erupção dos dentes permanentes, previnem a instalação de hábitos deletérios e proporcionam o crescimento facial normal (CAICEDO et al., 2006; FUKS, 2008; GODHI; SOOD; SHARMA, 2011; PARISAY; GHODDUSI; FORGHANI, 2015).

A pulpotomia é o tratamento de polpa mais comumente usado para dentes decíduos com lesão de cárie profunda, mas sem evidência de patologia radicular, quando a remoção da cárie resulta em exposição pulpar ou após uma exposição traumática (AAPD, 2016-2017). O procedimento baseia-se na fundamentação de que o tecido pulpar radicular é saudável ou é capaz de curar após a amputação cirúrgica da polpa coronária infectada (HAVALE et al., 2013; RUBY et al., 2013; SONI, 2016; SONMEZ; SARI; CETINBAS, 2008).

Recentemente, tem sido sugerido que o tratamento indireto da polpa é preferível à pulpotomia quando a polpa é normal ou possui diagnóstico de pulpíte reversível, sendo a polpa julgada vital e capaz de curar-se por critérios clínicos e radiográficos (AAPD, 2016-2017). Na técnica de remoção parcial da polpa, a dentina restante torna-se menos contaminada e úmida, mais dura e mais escura permitindo

ao clínico evitar as complicações pulpares relacionadas à escavação de cáries profundas, reduzindo os riscos e prevenindo o retratamento (DALPIAN et al., 2014; DUANGTHIP et al., 2015).

A pulpotomia é uma terapia pulpar que consiste na amputação da polpa coronária, sendo a superfície do tecido radicular vital restante tratada com medicamentos clinicamente avaliados em longo prazo a fim de preservar a vitalidade e função de polpa radicular (HAVALE et al., 2013). É essencial que a polpa radicular esteja saudável no momento de tratamento (GOYAL et al., 2016).

As técnicas de pulpotomia variam de acordo com os materiais capeadores pulpares utilizados, os quais irão provocar no remanescente pulpar: desvitalização, mumificação ou cauterização (formocresol), preservação ou mínima desvitalização (sulfato férrico, glutaraldeído) e indução do reparo ou regeneração (hidróxido de cálcio, agregado de trióxido mineral, proteínas morfogenéticas, biodentine, cimento portland) (LAURENT; CAMPS; ABOUT, 2012; NEAMATOLLAHI; TAJIK, 2006; SAKAI et al., 2009; SHAYEGAN; PETEIN; ABBEELE et al., 2008; SONMEZ; SARI; CETINBAS, 2008; SRINIVASAN; JAYANTHI, 2011). O uso de substâncias biocompatíveis é uma das maiores preocupações atualmente na odontologia, principalmente quando o material entra em contato direto com o tecido pulpar (LIMA et al., 2011).

Idealmente, o material capeador deve ser biologicamente compatível com o complexo dentino-pulpar; estimular a recuperação das funções biológicas, podendo culminar na formação de barreira de tecido mineralizado; possuir propriedades bactericidas e bacteriostáticas; vedar as margens cavitárias; apresentar boa resistência mecânica para suportar a mastigação; ser bom isolante térmico e elétrico e não ser tóxico ao tecido pulpar (BJØRNDAL; MJÖR, 2001; MALEKAFZALI; SHEKARCHI; ASGARY, 2011; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013; PARIROKH; TORABINEJAD, 2010; SHAYEGAN; PETEIN; ABBEELE, 2008; SONI, 2016).

Porém, os inúmeros materiais disponíveis no mercado e utilizados em pulpotomias de dentes decíduos não preenchem todos esses requisitos de um agente capeador ideal, o que gera dúvidas quanto à escolha do material a ser utilizado (CASTRO, 2005). O desafio para estes materiais é promover condições ideais para reparo do elemento dental (ANSARI; RANJPOUR, 2010).

Durante muitos anos, o formocresol em sua fórmula diluída a 1/5 foi o medicamento de escolha para a realização de pulpotomias de dentes decíduos

(AGAMY et al., 2004; FUKS; 2002; FUKS, 2008; HOLAN; FUKS; KELTZ, 2002). Embora muitos estudos demonstrem o alto índice de sucesso clínico e radiográfico das pulpotomias com formocresol em dentes decíduos (DEAN et al., 2002; FUKS, 2002; MORETTI et al., 2008; STRANGE et al., 2001; WATERHOUSE; NUNN; WHITHWORTH, 2000), este medicamento provoca alterações pulpares destrutivas e irreversíveis, bem como alterações inflamatórias nos tecidos periapicais, incluindo folículos dentários (CASTRO, 2005; FUKS et al., 1997; OLATOSE; SOTE; ORENUGA, 2015; ZARZAR et al., 2003; WATERHOUSE; NUNN; WHITHWORTH, 2000), devido ao seu efeito fixador e capacidade de difundir-se para região apical (OLATOSE; SOTE; ORENUGA, 2015). Ademais, foi comprovado seu potencial mutagênico e carcinogênico (FUKS, 2008; PENG et al., 2007; NIRANJANI et al., 2015; SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006; ZARZAR et al., 2003; WALKER et al., 2013), tornando imprescindível a busca por novos materiais mais compatíveis com a saúde do indivíduo.

Atualmente, existem várias técnicas ou agentes que são propostos para manter a vitalidade da polpa radicular e podem ser utilizados como alternativas ao formocresol em pulpotomia dentes decíduos (AAPD, 2016-2017), tais como o SF e o MTA (FRENKEL; KAUFMAN; ASHKENAZI, 2012).

O MTA é um pó fino hidrofílico desenvolvido por Mahmoud Torabinejad na Universidade de Loma Linda (USA), composto de silicato de cálcio (CaSiO_4), óxido de bismuto (Bi_2O_3), carbonato de cálcio (CaCO_3), sulfato de cálcio (CaSO_4) e aluminato de cálcio (CaAl_2O_4). Quando misturado com água, ele forma os cristais de óxido de cálcio em uma estrutura amorfa que consiste de 33% de cálcio, 49% de fosfato, 2% de carbono, 3% de cloreto e 6% de sílica (CAMILLERI et al., 2005; DOMINGUEZ et al., 2003; NEAMATOLLAHI; TAJIK, 2006; TORABINEJAD et al., 1995).

O MTA apresenta um pH inicial de 10,2, o qual aumenta para 12,5 após 3 horas. Aplicado sobre o tecido pulpar promove a liberação de cálcio e induz a produção e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-1 e interleucina-6. Estas citocinas potencializam a ação dos neutrófilos, promovem a ativação da produção de prostaglandinas e a produção de enzimas proteolíticas (MASSI et al., 2011; SITARU; HANTOIU; MONEA, 2014). Por isso, o pH alcalino e a liberação de cálcio promovem uma reação inflamatória. No entanto, os íons de cálcio reagem com dióxido de carbono presente nos tecidos dando

origem a cristais de calcita e, então, há a redução no processo inflamatório (HOLLAND et al., 1999).

As principais vantagens do MTA incluem suas propriedades físicas satisfatórias, antimicrobianas, biocompatibilidade com o tecido pulpar, manutenção da integridade com baixa reação inflamatória e indução de células pulpares para liberação de citocinas, as quais aceleram a formação de barreira de tecido duro (EIDELMAN; HOLAN; FUKS, 2001; FRENKEL; KAUFMAN; ASHKENAZI, 2012; KOH et al., 1997; NEAMATOLLAHI; TAJIK, 2006; SONMEZ; SARI; CETINBAS, 2008;).

O MTA é um material bioativo que libera íons de cálcio durante e após a aplicação. Os íons de cálcio reagem com o fósforo e produzem cristais de hidroxiapatita na superfície do MTA e na interface MTA-dentina. A bioatividade do MTA é considerada como sendo responsável pela sua biocompatibilidade, atividade dentinogênica e habilidade de vedação (NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013; SARKAR et al., 2005).

O interesse em materiais mais biocompatíveis promoveu o MTA como um dos medicamentos de eleição para pulpotomia. Em molares decíduos tratados com pulpotomia usando o MTA, as taxas de sucesso relatadas foram acima de 94% em 12-74 meses de acompanhamento (AGAMY et al., 2004; FARSI et al., 2005; FRENKEL; KAUFMAN; ASHKENAZI, 2012; HOLAN; EIDELMAN; FUKS, 2005).

Em um estudo recente, o MTA não mostrou quaisquer sinais de radiolucidez na região de bifurcação no exame radiográfico, o que pode ser explicado com base na formação de ponte de tecido duro, devido à sua alta capacidade de vedação, biocompatibilidade, alcalinidade e ação bactericida ou bacteriostática (GOYAL, et al., 2016).

No entanto, o uso rotineiro do MTA pode ser limitado devido a sua capacidade de manchamento dentário (ALSUBAIT; AL-HAIDAR; AL-SHARYAN, 2016; MARCIANO; DUARTE; CAMILLERI, 2015) e, em países em desenvolvimento, por razões econômicas e comerciais (AL-HAJ ALI, AL-JUNDI, DITTO, 2015; WALKER et al., 2013). Fuks (2002) recomendou o uso do SF como uma alternativa adequada e de baixo custo para procedimentos de pulpotomia de dentes decíduos.

O SF vem sendo usado como um agente hemostático em odontologia e mostrou resultados promissores como um material capeador para pulpotomias de dentes decíduos (FEI; UDIN; JOHNSON, 1991). O SF produz uma resposta inflamatória local e reversível nos tecidos moles da boca sem efeitos tóxicos ou

nocivos (CASAS et al., 2005; HAVALE et al., 2013).

A pulpotomia com o SF tem o intuito de preservar a polpa e proporcionar hemostasia, pois, ao entrar em contato com o sangue, há formação de um complexo ferro-protéico, cuja membrana veda mecanicamente os vasos sanguíneos cortados. O complexo protéico aglutinado forma tampões que obstruem os orifícios capilares, evitando a formação de coágulos sanguíneos. Esse mecanismo de controle da hemorragia pode minimizar a possibilidade de inflamação e de reabsorção interna. (FEI; UDIN; JOHNSON, 1991; GOYAL, et al., 2016; SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006). Entretanto, poucos estudos foram realizados para se ter um parâmetro de sucesso histológico (SALAKO et al. 2003).

SALAKO et al. (2003) observaram histologicamente que, após 2 semanas, o tecido pulpar de dentes de ratos tratados com MTA apresentaram algumas células inflamatórias ao redor do material, com evidência de macrofagia na polpa radicular, e aumento na formação de cemento na região apical. Foi observada a formação de ponte de dentina com polpa histologicamente normal depois de 2 e 4 semanas. Os dentes tratados com SF apresentaram inflamação pulpar moderada, com áreas de necrose na polpa coronária após 2 e 4 semanas.

Fuks (1997); Smith, Seale e Nunn (2000) em seus estudos observaram que os sucessores permanentes dos dentes tratados com SF apresentaram desenvolvimento radicular normal e nenhum defeito coronário.

Em uma revisão sistemática que incluiu 11 estudos, relataram taxas de sucesso clínico e radiográfico globais de tratamentos com SF variando de 78% a 100% (média de 91,6%) e de 42% a 97% (média de 73,5%), respectivamente. A principal desvantagem deste material é que ele dificulta o desenvolvimento de uma ponte dentinária, que protege a polpa radicular de uma futura infecção, inconveniente que pode ser superada pelo MTA (PENG et al., 2007), sendo escassos estudos que demonstrem histologicamente a presença desta barreira dentinária, bem como a reação inflamatória do tecido pulpar frente à utilização do SF (SALAKO et al. 2003).

Yildirim et al. (2016) avaliaram e compararam os resultados clínicos e radiográficos de 4 materiais (formocresol, MTA, cimento Portland e derivados da matriz do esmalte) usados em pulpotomias de dentes decíduos. Aos 24 meses, as taxas de sucesso clínico de formocresol, MTA, cimento Portland, e derivado da matriz do esmalte eram 96,9%, 100%, 93,9% e 93,3%, respectivamente. As taxas de

sucesso radiográficos correspondentes foram 84,4%, 93,9%, 86,7% e 78,1%, respectivamente. Concluindo que embora não houvesse diferenças estatisticamente significativas nas taxas de clínicos e radiográficos de sucesso entre os 4 grupos, MTA parece ser superior aos demais materiais avaliados para pulpotomia em dentes decíduos.

Portanto, é importante explorar alternativas que possam também apresentar propriedades biológicas e bioquímicas aceitáveis, ser de fácil manuseio e ter baixo custo (ALBUQUERQUE et. al., 2006).

2.3 CÉLULAS E MARCADORES INFLAMATÓRIOS

A resposta protetora dos tecidos, de uma maneira geral, é caracterizada pelo processo inflamatório, que tem como objetivo evitar a progressão dos danos e consequências de uma lesão celular. Essa resposta ocorre em tecidos conjuntivos vascularizados, envolvendo mediadores químicos e células imunológicas e inflamatórias como neutrófilos, macrófagos, linfócitos, basófilos, eosinófilos, mastócitos e plasmócitos (COTRAN et al., 2000).

No processo inflamatório, a primeira etapa é a agressão ao tecido causando a migração de diversas células inflamatórias. A intensidade e progressão do processo inflamatório dependem de fatores locais e sistêmicos, envolvendo eventos celulares que resultam na produção e liberação de moduladores da inflamação, tais como IL-1 e IL-6 e prostaglandinas (PGE) (HRABÁK; BAJOR; CSUKA, 2008; NIBALI et al., 2012).

Nos primeiros momentos do processo inflamatório, geralmente ocorre aumento da permeabilidade vascular e migração de leucócitos dos vasos sanguíneos devido à presença de substâncias pró-inflamatórias, ou citocinas. Estas citocinas, liberadas por células do tecido pulpar exercem um papel fundamental na ativação e controle do processo inflamatório (BARKHORDAR et al., 2002; SILVA et al., 2009).

A síntese de citocinas é complexa, e a sua expressão e efeitos são regidos por vários fatores, incluindo outras células e mediadores químicos. A IL-6 é uma citocina que intercede a resposta do hospedeiro à lesão e à infecção, sendo liberada durante o processo inflamatório, a fim de regular vários aspectos da resposta imune,

a fase aguda da reação e o controle da infecção hematopoiética (GOMES-FILHO et al., 2009).

Segundo Helle et al. (1988), a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória secretada pela célula T, monócitos, fibroblastos, células epiteliais e macrófagos em resposta ao antígeno e a outras citocinas, tais como IL-1 e TNF- α . A IL-6 é conhecida por sua atividade pleiotrópica, afetando diferentes células e desempenhando um papel importante como mediadora de reações inflamatórias na rede de citocinas. Essa citocina é capaz de induzir reabsorção óssea, tanto sozinha, quanto em associação com a IL-1 β (GEMMELL; SEYMOUR, 1993).

A secreção de IL-6 reduz o recrutamento de neutrófilos, induzindo simultaneamente migração e diferenciação de linfócitos e monócitos (SCHELLER et al., 2011), o que indica que esta interleucina participa na instalação e progressão da resposta inflamatória (SILVA et al., 2015).

Segundo Laurent, Camps, About (2012), as interações entre materiais de capeamento pulpar e o tecido pulpar ferido, o estabelecimento e desenvolvimento da cicatrização das feridas e processos regenerativos permanecem obscuros. Muitas hipóteses têm sido levantadas, mas recentemente estudos destacaram o papel dos fatores de crescimento na angiogênese, recrutamento de células progenitoras, diferenciação celular e finalmente, na mineralização na área da polpa sob o biomaterial. No entanto, estes materiais são frequentemente aplicados diretamente sobre a polpa, e ainda não está claro se eles afetam a secreção de citocinas a partir de células da polpa.

Um estudo avaliou o efeito do MTA na expressão de citocinas no tecido pulpar de ratos. A expressão de CCL5/ RANTES, CCL2 / MCP1, IL-1 α , IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-6 foram avaliadas por RT-PCR a 10 e 20 dias após a exposição. Os grupos de controle não foram expostos ao material. De acordo com os resultados, não foi encontrado nenhuma expressão detectável de CCL2, IL-4 e IL-6 no tecido de qualquer grupo, enquanto o TNF- α foi expresso em níveis elevados 20 dias após a exposição. A expressão de CCL5 e IL-1 α foi menor no grupo tratado com MTA após 10 dias do tratamento. Aos 20 dias após o procedimento cirúrgico, a expressão de IFN- γ também foi menor no grupo tratado com MTA. Diante disso, os autores concluíram o MTA regula as citocinas inflamatórias CCL5, IL-1 α e IFN- γ , podendo ter um efeito anti-inflamatório (BARBOSA SILVA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008).

3 OBJETIVO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a resposta pulpar inicial, através de análise histológica descritiva, morfométrica e imuno-histoquímica, em molares de ratos após pulpotomia com MTA branco e SF à 15,5%, nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Os objetivos específicos foram:

- a) Quantificar as células inflamatórias e densidade vascular por meio de análise morfométrica;
- b) Analisar a imunoexpressão da citocina inflamatória IL-6 através da descrição e quantificação de sua expressão.

4 METODOLOGIA

Nesta sessão apresentamos a metodologia deste trabalho.

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Após aprovação pelo Comitê de Ética envolvendo Pesquisa em animais da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL/MG (protocolo 570/2014 - Anexo A), foram utilizados 26 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), machos, com peso entre 270 e 300 gramas, obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Durante todo período experimental os animais foram mantidos em gaiolas identificadas, em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e com o consumo de ração sólida e água *ad libitum*. Vinte e quatro animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos, de acordo com os materiais a serem testados. Cada grupo, por sua vez, foi dividido em 3 subgrupos, de acordo com o tempo experimental de 24, 48 e 72 horas após pulpotomia.

Grupo I (n = 12 ratos/24 dentes) - pulpotomia com cimento MTA branco

IA (n = 4 ratos/8 dentes) - tempo experimental 24 horas

IB (n = 4 ratos/8 dentes) - tempo experimental 48 horas

IC (n = 4 ratos/8 dentes) - tempo experimental 72 horas

Grupo II (n = 12 ratos/24 dentes) - pulpotomia com Sulfato Férrico a 15,5%.

IIA (n = 4 ratos/8 dentes) - tempo experimental 24 horas

IIB (n = 4 ratos/8 dentes) - tempo experimental 48 horas

IIC (n = 4 ratos/8 dentes) - tempo experimental 72 horas

Nos outros 2 animais, os primeiros molares inferiores direito e esquerdo foram utilizados, os quais, 2 foram mantidos hígidos e nos outros dois foi realizada apenas a abertura coronária. Tais dentes foram utilizados como parâmetro para a análise descritiva, totalizando 52 dentes.

4.2 PROCEDIMENTO OPERATÓRIO

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (Anasedan – Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínia - SP) na concentração de 6mg/kg e quetamina (Cetamin - Rhobibarme Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, SP, Brasil) na concentração de 70mg/kg e contidos em uma mesa operatória (Figura 1), o que permitiu sua imobilização após anestesia geral e manutenção da boca aberta.

A assepsia da cavidade bucal foi realizada com algodão umedecido em digluconato de clorexidina 0,12% (Periogard/Colgate Palmolive Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

Para a confecção da abertura coronária dos dentes utilizou-se ponta esférica diamantada nº 1011 em alta rotação (FG KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP, Brasil), de granulação fina (diâmetro 0,10 décimos de milímetro no centro da face oclusal (classe I), removendo a ponte de esmalte central, cuja profundidade foi correspondente à parte ativa da ponta (Figura 2), mediante irrigação/aspiração com soro fisiológico para remoção das raspas de dentina. A exposição pulpar, bem como a ampliação e a regularização da cavidade foi obtida usando uma broca de aço esférica nº1 (Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) a 1500 rpm, usando o motor de implante Dforce 1000 (Dentflex Industria e Comércio Ltda, Ribeirão Preto, SP) sob irrigação com soro fisiológico. O tecido pulpar coronário exposto foi amputado até o nível da entrada dos canais radiculares com o auxílio de uma cureta nº 5 (SS White, Objetos Dentários Ltda., Juiz de Fora, MG, Brasil). O excesso de soro fisiológico foi removido com auxílio de aplicadores descartáveis Microbrush (KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP, Brasil) estéreis (Figura 3).

Para o grupo MTA branco (MTA White, Angelus, Londrina, PR, Brasil), o material foi manipulado de acordo com a recomendação do fabricante, obtendo-se uma mistura lisa, no qual foi aplicada no remanescente pulpar após o controle da hemorragia. A cavidade foi então selada com cimento de ionômero de vidro convencional (Vidrion R – SSWhite Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 4).

Para o grupo Sulfato Férrico à 15,5 % (Astringedent – Ultradent Products Inc, South Jordan, USA), utilizou-se um aplicador descartável Microbrush (KG Sorensen

Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP, Brasil) estéril, umedecido com o material, tomando-se o cuidado da remoção do excesso do material com uma gaze estéril, sendo levemente pressionado na entrada dos condutos radiculares, e então mantido por 15 segundos. Decorrido o tempo determinado, o aplicador Microbrush foi então removido e, na ausência de sinal de sangramento, uma base de OZE (presa lenta - Biodinâmica Quím. E Farm. Ltda, Ibiporã, PR, Brasil), foi acomodada na câmara pulpar. A cavidade foi selada com cimento de ionômero de vidro convencional (Vidrion R – SSWhite Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura 5).

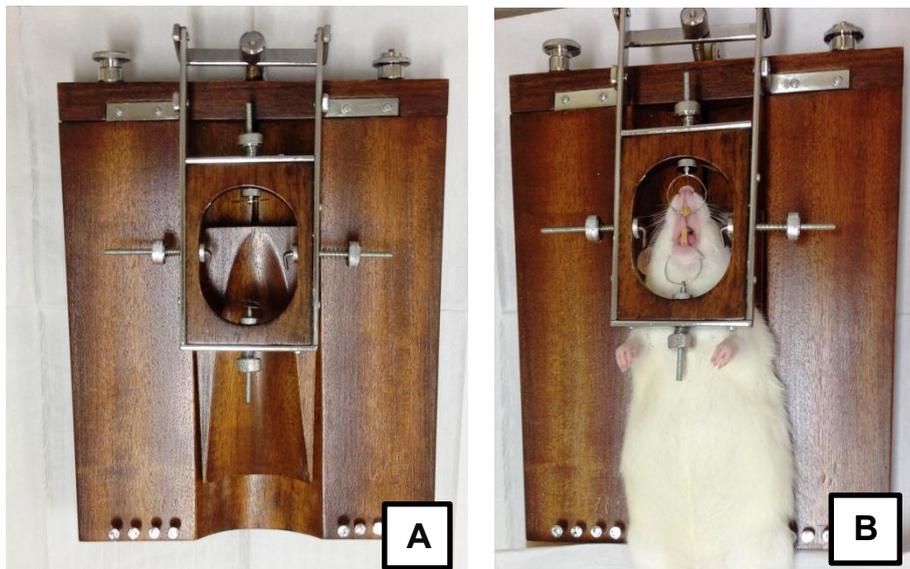


Figura 1 – Contenção do animal:

A) Mesa operatória; B: Imobilização e manutenção da boca aberta do animal após anestesia geral.

Fonte: Junqueira, 2015.

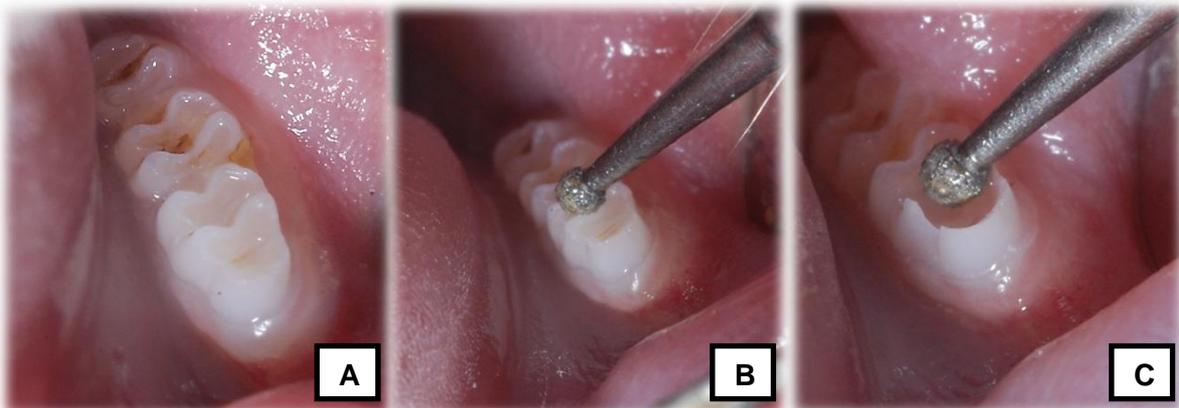


Figura 2 – Abertura Coronária:

A) Aspecto inicial do primeiro molar inferior; B) e C) Abertura coronária em alta rotação com a broca diamantada 1011.

Fonte: Junqueira, 2015.



Figura 3 – Exposição pulpar e pulpotomia:

A) Exposição pulpar após o uso de broca de aço em baixa rotação; B) Aspecto da abertura coronária após a remoção do tecido pulpar coronário e controle da hemorragia.

Fonte: Junqueira, 2015.

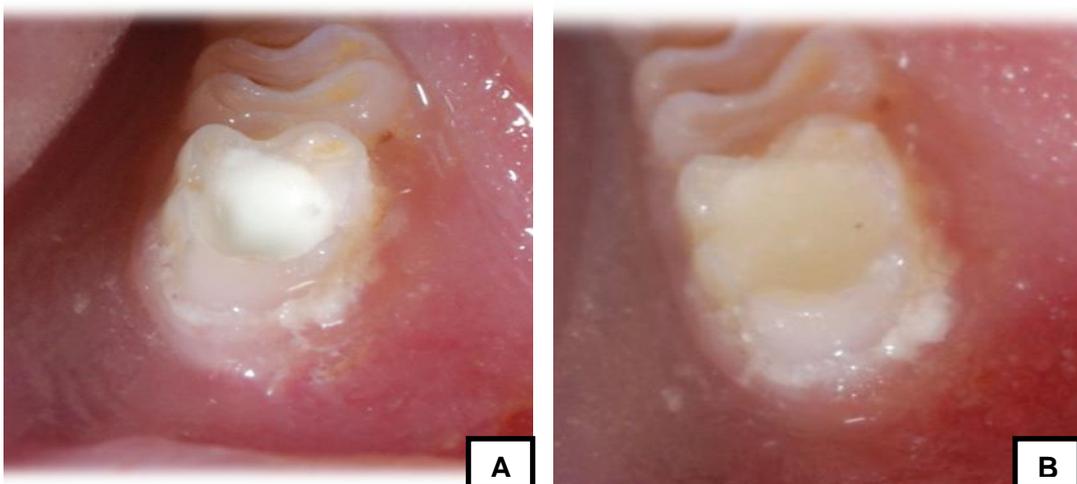


Figura 4 – Pulpotomia com MTA branco:

A) Capeamento com MTA branco; B) Restauração com Vidrion R.

Fonte: Junqueira, 2015.

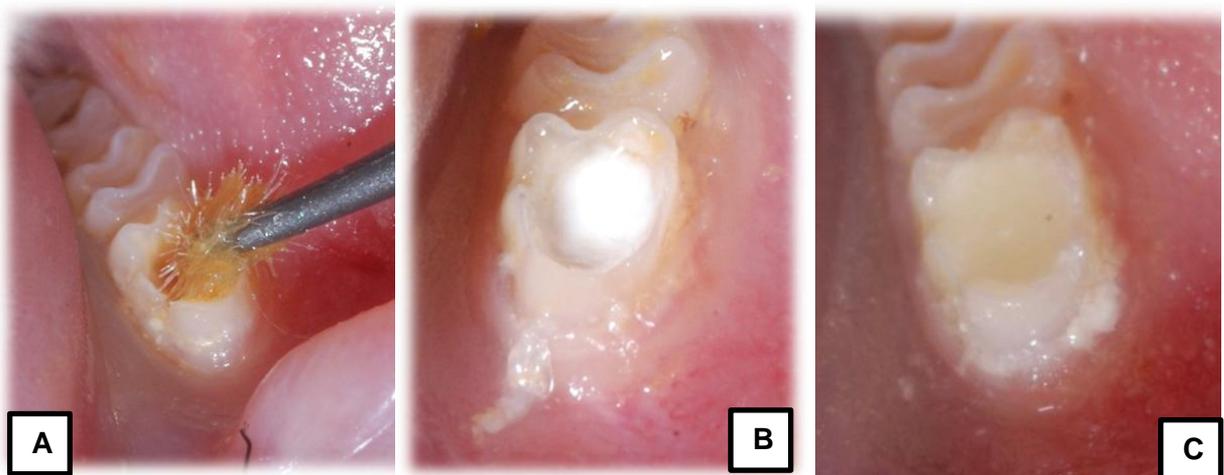


Figura 5 - Pulpotomia com SF 15,5%:

A) Capeamento com SF 15,5%; B) Base com cimento OZE; C) Restauração com Vidrion R.

Fonte: Junqueira, 2015.

4.3 PREPARO DOS DENTES EXTRAÍDOS PARA ANÁLISE HISTOLÓGICA

Sob anestesia com xilazina (6mg/kg) e quetamina (70mg/kg) via intramuscular, os ratos foram eutanasiados após 24, 48 e 72 horas do procedimento por inalação excessiva de CO₂.

As mandíbulas foram dissecadas livres da cabeça, e os dentes foram removidos em bloco com osso circundante. Em seguida, foram fixados em formaldeído 4% tamponado com fosfato 0,1M e pH 7,4 por 24 horas em a 4°C em frascos individuais e identificados. Após 24 horas de fixação, iniciou-se o processo de desmineralização em solução de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) tamponado com fosfato pH 7,0, o qual foi agitado uma vez ao dia e trocado a cada 7 dias, por um período aproximado de 30 dias.

Realizada a desmineralização, os dentes foram lavados em água corrente abundante, desidratados pela passagem sucessiva em álcoois e incluídos em parafina. Em seguida, os blocos foram desgastados em micrótomo (Leica RM 2165) até que a região ideal para obtenção de cortes da câmara pulpar e dos canais radiculares foi atingida para, então, serem processadas três lâminas contendo três cortes seriados de 5 µm de espessura, sendo uma lâmina utilizada para coloração de HE e duas para imuno-histoquímica. Para tanto, o material cortado foi distendido em banho maria e colhido em lâminas, no qual, foram levadas a uma estufa a 60°C, e em seguida, após resfriarem, foi realizada uma sequência de banhos em álcoois em diferentes concentrações para desparafinização.

As lâminas desparafinizadas foram imersas em hematoxilina de Harris e lavadas em água corrente para remover o excesso do corante. Após a remoção do excesso de água, os cortes foram imersos em eosina por cinco minutos, desidratados e clarificados, e as lâminas montadas. Estes cortes corados com HE foram utilizados para a descrição morfológica e morfométrica da resposta tecidual.

4.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO COMPLEXO DENTINO-PULPAR

Com uma câmera fotográfica digital (AxioCam MRc 1.4 Mb - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico binocular (AxioLab A1 Plus - Carl Zeiss, Jena, Alemanha) utilizando-se uma objetiva de 40X, foram obtidas de seis a nove fotografias ao longo de todo o comprimento da raiz, para cada corte histológico. Assim, o número total de imagens, por cortes, variou conforme o comprimento da raiz do dente tratado. Dessa maneira, as imagens de cada corte histológico foram distribuídas de acordo com o terço radicular (cervical, médio e apical) e permitiu a utilização de duas a três imagens para análise de cada terço. Para a captura das imagens foi utilizado o software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Alemanha).

Após esse processo, a análise morfométrica foi realizada através do Software Imagen Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) que determinou a quantidade de células inflamatórias presentes em todo tecido pulpar em cada imagem (Figura 6). Ao final, foi calculado o total de número de células inflamatórias para cada terço radicular.

Para avaliação da densidade vascular utilizou-se o mesmo Software, em que três grades quadriculadas com 49 intersecções foram sobrepostas às imagens, sendo que os pontos de intersecção que coincidiam sobre os vasos sanguíneos foram contados, como mostra a Figura 7. Também, foi calculado o total de pontos de intersecção para cada terço radicular. E depois dessa etapa a densidade vascular foi calculada para posterior análise estatística através da fórmula:

$$Dv = \frac{\text{número de pontos de intersecções contatos}}{\text{número total de pontos do retículo}} \times 100$$

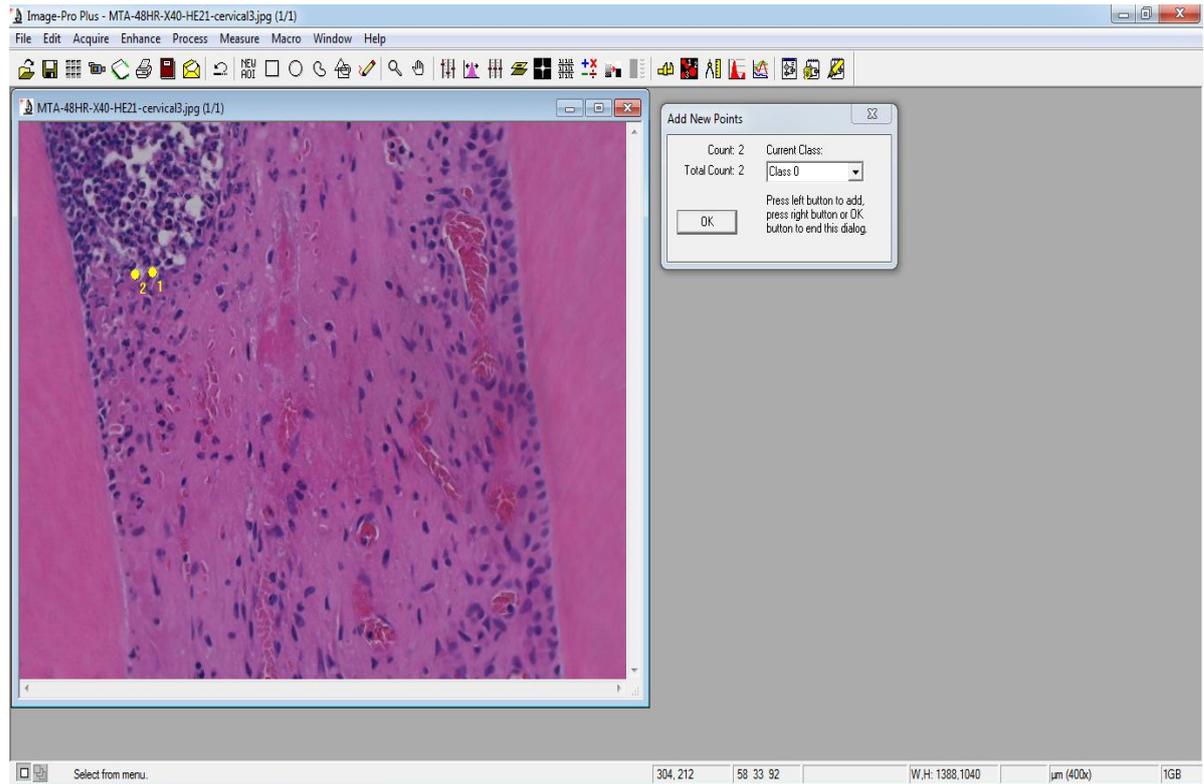


Figura 6 – Quantificação das células inflamatórias pelo software Imagen Pro Plus 4.5.

Fonte: Do autor

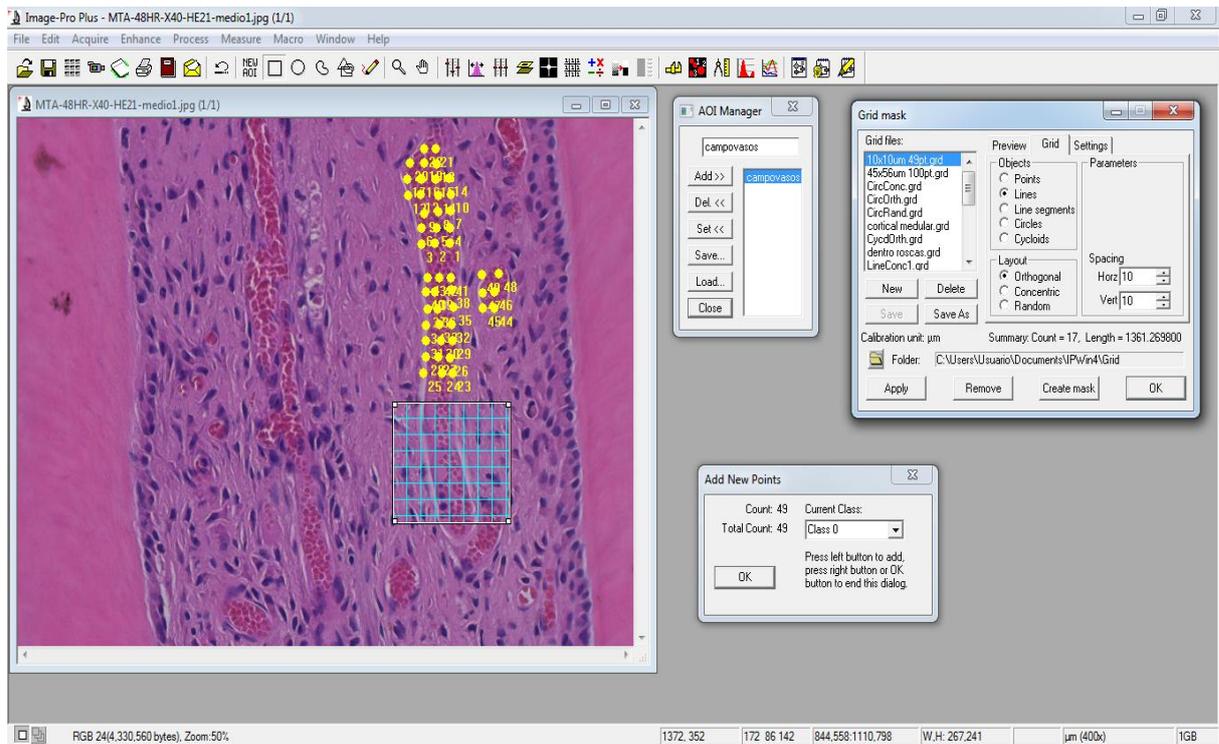


Figura 7 – Quantificação da densidade vascular utilizando o Software Imagen Pro Plus 4.5.

Fonte: Do autor

4.5 PROTOCOLO PARA IMUNO-HISTOQUÍMICA (MÉTODO DA PEROXIDASE)

Os cortes foram desparafinizados (xilol 100%) e hidratados (álcool 100%, 95%, 80%, 70%, água destilada). Em seguida foi realizada a lavagem com PBS (Phosphate buffer saline) 0,05 M e pH 7.4 e incubação com H₂O₂ (30 vols.) por 30 minutos e com PBS/BSA (Albumina de Soro Bovino) 1% durante 30 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram incubados com anticorpo primário monoclonal de rato anti-IL-6 humano (ab9324, Abcam, Cambridge, UK), na diluição de 1:800, por 12 horas à 4°C, seguido da incubação com anticorpo secundário de coelho anti-rato, na diluição de 1:500, por 1 hora em temperatura ambiente. Os cortes foram tratados com o complexo estreptoavidina peroxidase (Sigma) em PBS 0,05 M. A reação foi revelada utilizando-se a solução 3-3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) por 1 minuto, e os cortes lavados com água destilada e contra-corados com hematoxilina. A montagem das lâminas foi feita com solução aquosa de montagem (VectaMount AQ; Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, EUA).

4.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DA IMUNOEXPRESSÃO PARA IL-6

As imagens dos cortes histológicos de imuno-histoquímicas foram capturadas de forma semelhante às imagens de HE.

Para a análise das imagens usou-se o software ImageJ (ImageJ v1.43j; National Institutes of Health, Bethesda, MD), a imagem foi submetida ao procedimento analítico "color deconvolution", (RUIFROK; JOHNSTON, 2001) utilizando o vector HDAB. Esta ferramenta separa a imagem digital em três painéis diferentes, um com hematoxilina, um segundo painel apenas com DAB e um terceiro painel de fundo. Utilizou-se o painel de DAB, no qual, foi selecionada a área de interesse contendo tecido conjuntivo pulpar, desconsiderando pequenos artefatos e vasos sanguíneos de grande calibre (Figura 8). Após esse processo foi realizado o histograma da área de interesse delimitada e a quantificação da densidade, em pixels, da coloração DAB, representada por valores entre 0 a 255 (Figura 9). O valor médio da expressão da densidade da coloração foi selecionado, sendo que os valores próximo de 0 (coloração marrom) representam uma expressão imunopositiva, enquanto que, os valores próximo de 255 (coloração branca)

demonstram uma expressão imunonegativa.



Figura 8 - Imagem em painel de DAB, com área de interesse delimitada para quantificação da imunoposição da IL-6 pelo software Imagen J.

Fonte: Do autor

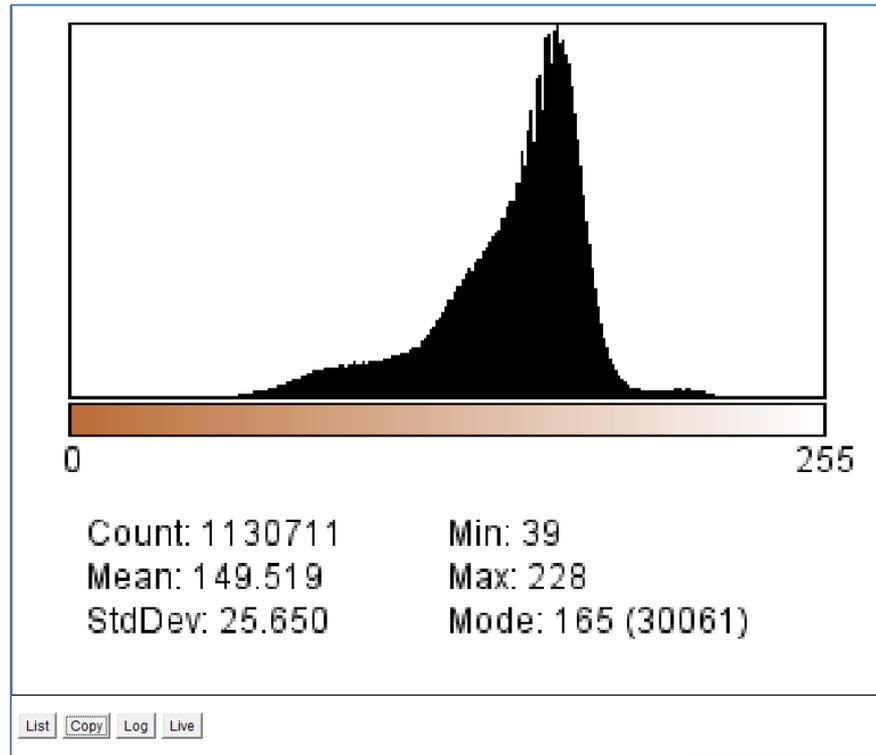


Figura 9 - Histograma da densidade em pixels da coloração DAB pelo software Imagen J.

Fonte: Do autor

4.7 ANÁLISE DESCRITIVA

A análise microscópica descritiva da reação do tecido pulpar frente ao procedimento de pulpotomia consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais, nos cortes histológicos submetidos à coloração de HE e reação de imuno-histoquímica para detecção de IL-6.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Visando proporcionar melhor entendimento, análise estatística será apresentada de acordo com a metodologia empregada.

4.8.1 Quantificação de células inflamatórias e da densidade vascular

Os dados foram coletados e digitados em planilha eletrônica do Microsoft Excel (2010). Previamente à análise estatística, devido ao fato do número total de imagens para cada corte histológico serem diferentes, foram calculados os valores médios das células inflamatórias e da densidade vascular presente em cada terço radicular. Sendo que, o valor total da quantificação das células inflamatórias e da densidade vascular do terço foi dividido pelo número de imagens deste terço.

As análises estatísticas foram realizadas no software BioEstat versão 5.3. Por meio do teste de Shapiro Wilk e Durbin Watson verificou-se que as pressuposições de normalidade e independência, respectivamente, não foram atendidas. Deste modo, para avaliação dos fatores locais e tempos foi realizado o teste não paramétrico Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn. No intuito de analisar a diferença entre os materiais, foi utilizado o teste t para diferença de médias.

Para verificar a correlação entre as variáveis número de células inflamatórias e número de vasos sanguíneos, de acordo com o material estudado, utilizou-se a correlação de Spearman.

Todos os testes foram realizados considerando um nível de significância de 5%.

4.8.2 Análise estatística da quantificação da imunexpressão para IL-6

Os dados foram coletados e armazenados em um banco de dados, elaborado em planilha eletrônica do Microsoft Excel (2010). Previamente à análise estatística, foi calculada a média da expressão da densidade da coloração em pixels.

A análise estatística foi realizada no Software R versão 3.4.3, 2017 (R Core Team). Ao realizar o teste de Shapiro Wilk verificou-se que as pressuposições apresentavam normalidade residual ($p=0,407$). Em seguida foi realizado o Teste F para análise de variância. Como a interação tripla foi significativa ($p=0,0039$) faz-se necessário realizar o desdobramento, portanto realizou-se o teste de Tukey para diferença das médias.

Todos os testes foram realizados considerando um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

A amostra do presente estudo foi composta por 52 primeiros molares inferiores de 26 ratos machos. Não houve perdas de animais durante o procedimento cirúrgico e o período de acompanhamento.

Contudo, durante a análise das lâminas coradas com HE, uma lâmina do grupo MTA no período de 24 horas foi excluída do estudo por apresentar artefatos de técnicas que impediam sua análise.

5.1 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Na análise morfométrica foi realizada quantificação de células inflamatórias e da densidade vascular.

5.1.1 Quantificação de células inflamatórias

Não houve diferença estatística em relação ao número de células inflamatórias entre os grupos MTA e SF nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a pulpotomia ($p > 0,05$) (Gráfico 1).

Em relação aos tempos analisados, no grupo MTA, houve diferença estatística no número de células inflamatórias, sendo o maior número observado às 48 horas (Figura 11 e 14) e o menor às 24 horas ($p < 0,05$). O número de células inflamatórias no período de 72 horas não diferiu estatisticamente dos demais períodos ($p > 0,05$). Já no grupo SF, não houve diferença estatística do número de células inflamatórias entre os tempos analisados ($p > 0,05$) (Gráfico 2).

Em ambos os grupos verificou-se diferença estatística do número de células inflamatórias nos terços radiculares ($p < 0,05$), sendo o maior número observado no terço cervical da raiz (Figuras 10-15 (A-C)), com regressão nos terços médio (Figuras 10-15 (D-F)) e apical (Figuras 10-15 (G-I)), como observado no Gráfico 3.

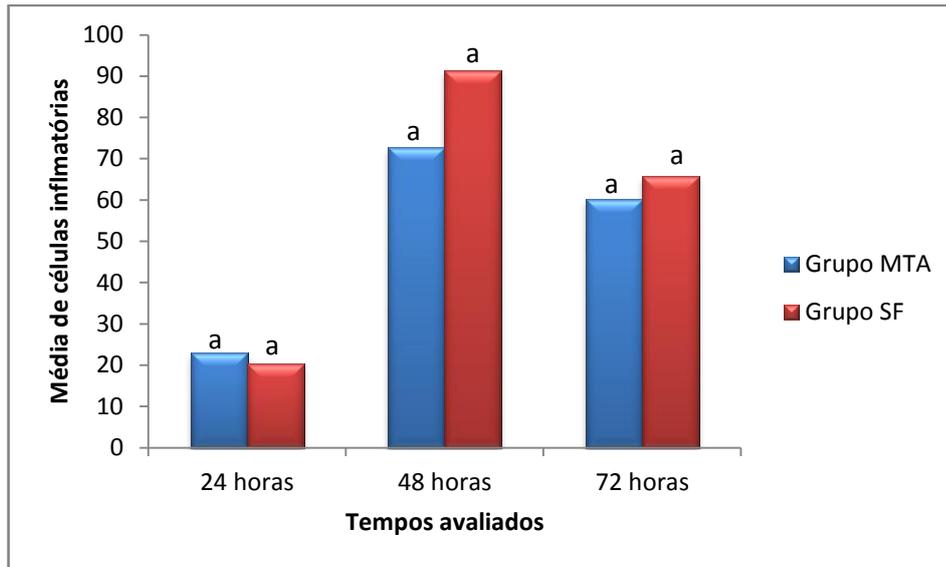


Gráfico 1 - Representação gráfica do resultado do teste t para diferença de médias do número de células inflamatórias dos grupos MTA e SF nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Fonte: Do autor

Nota: Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$); grupos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

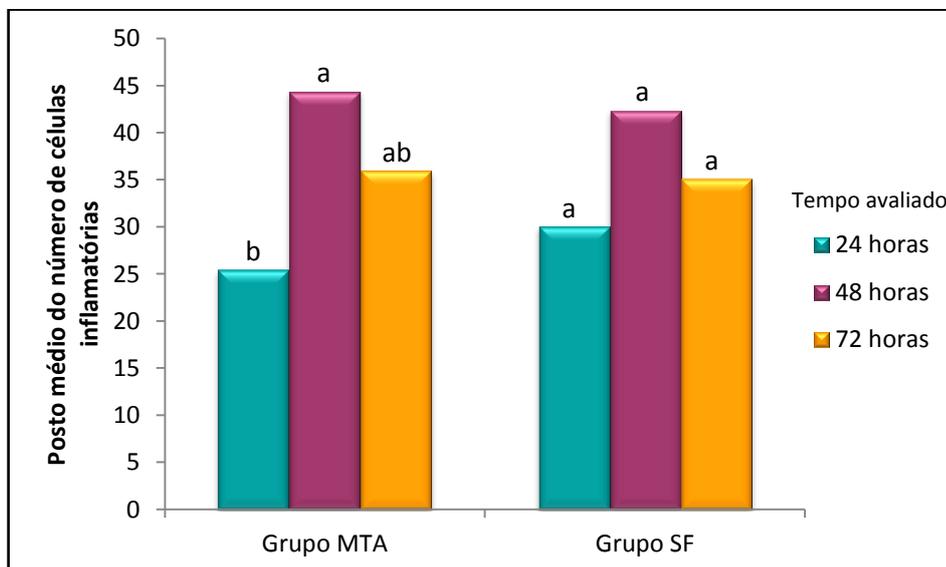


Gráfico 2 - Representação gráfica do resultado do teste Kruskal-Wallis para o número de células inflamatórias em 24, 48 e 72 horas no Grupo MTA e SF.

Fonte: Do autor

Nota: Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$); grupos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

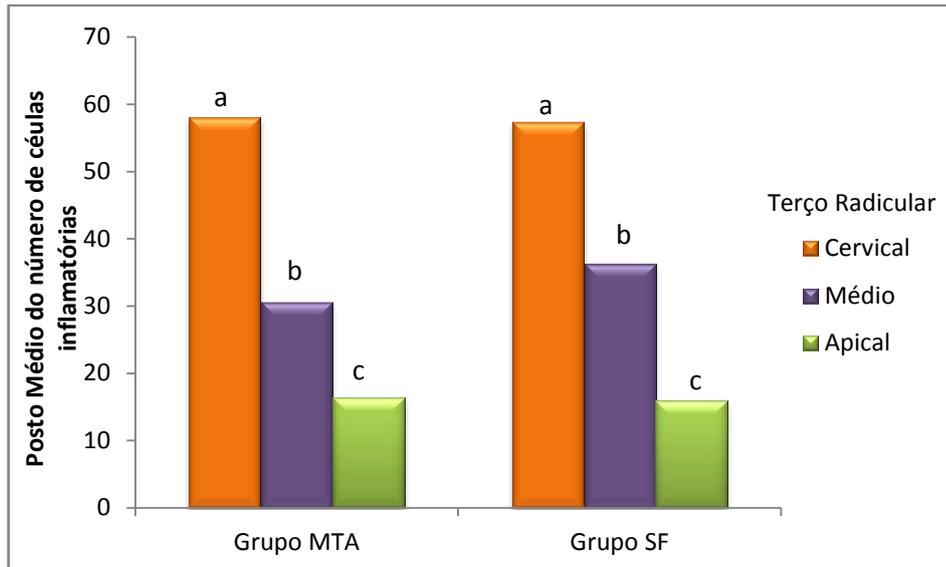


Gráfico 3 - Representação gráfica do resultado do teste Kruskal-Wallis para o número de células inflamatórias nos terços radiculares para o Grupo MTA e o SF.

Fonte: Do autor

Nota: Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$); grupos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

5.1.2 Quantificação da densidade vascular

Ao comparar o grupo MTA com o grupo SF, não houve diferença estatística em relação à densidade vascular no período de 24, 48 e 72 horas ($p > 0,05$) (Gráfico 4).

Para ambos os materiais utilizados nesse estudo, ao analisar os períodos após o tratamento, não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$). Portanto, a densidade vascular em 24, 48 e 72, após pulpotomia, é estatisticamente igual no grupo MTA e no grupo SF (Gráfico 5).

Houve diferença significativa em relação à densidade vascular, para ambos os grupos, quando comparados os terços radiculares do dente tratado, no qual foi observada maior vascularização no terço radicular médio ($p < 0,05$) (Figuras 10-15 (D-F)); os terços cervical (Figuras 10-15 (A-C)) e apical (Figuras 10-15 (G-I)) foram estatisticamente iguais (Gráfico 6).

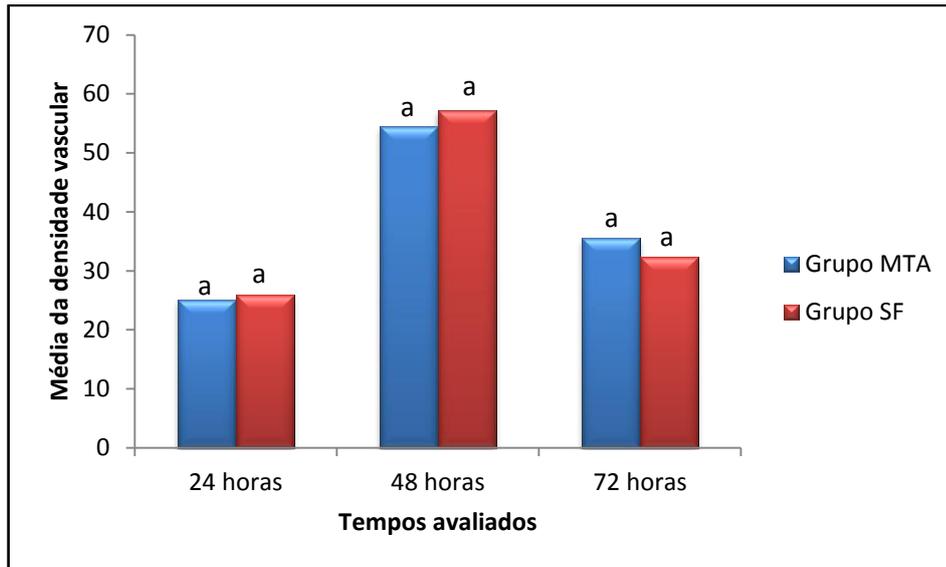


Gráfico 4 - Representação gráfica do resultado do teste t para a diferença de médias da densidade vascular dos grupos MTA e SF nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Fonte: Do autor

Nota: Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$); grupos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

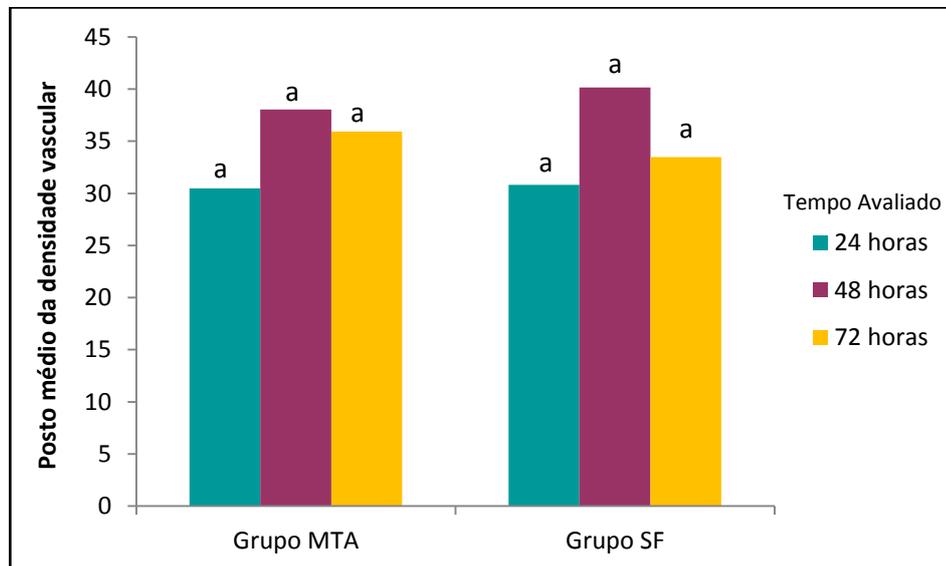


Gráfico 5 - Representação gráfica do resultado do teste Kruskal-Wallis para a densidade vascular em 24, 48 e 72 horas nos grupos MTA e SF.

Fonte: Do autor

Nota: Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$); grupos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

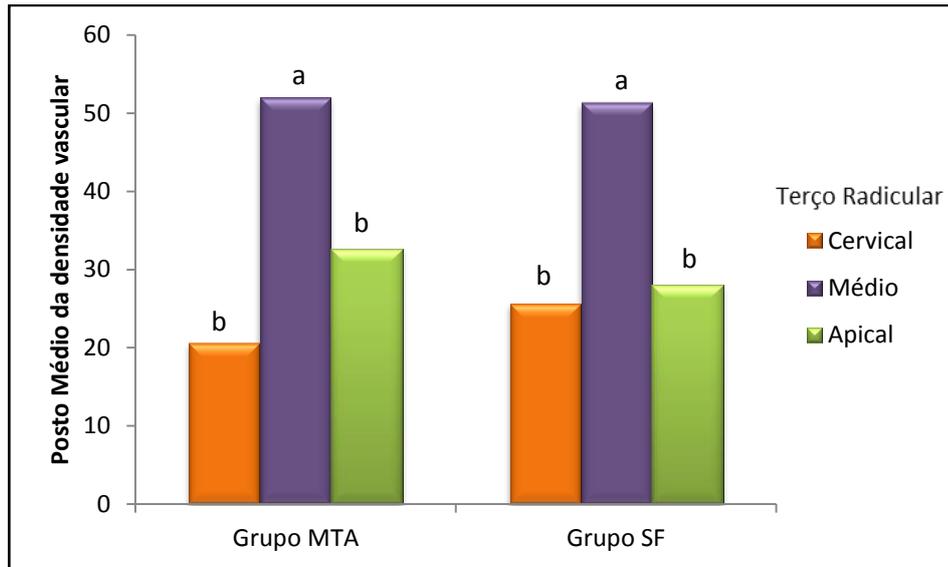


Gráfico 6 - Representação gráfica do resultado do teste Kruskal-Wallis para a densidade vascular nos terços radiculares para o Grupo MTA e o SF.

Fonte: Do autor

Nota: Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$); grupos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

Não foi encontrada diferença significativa ao se correlacionar o grau de inflamação com a densidade, tanto para o material MTA como para o SF ($p = 0,7189$).

5.2 ANÁLISE DESCRITIVA DOS CORTES CORADOS EM HE

Visando proporcionar melhor interpretação a descrição dos fenômenos histopatológicos dos cortes corados em HE foi dividida de acordo com o grupo experimental.

5.2.1 Grupo MTA

Nos períodos de 24, 48 e 72 horas verificou-se um grande número de células inflamatórias presentes no terço radicular cervical, no qual as células estavam agrupadas no tecido pulpar adjacente ao material capeador (Figuras 10-12 (A-C)). Verificou-se em alguns cortes histológicos necrose superficial, em contato com o material (Figuras 10, 11 (A-C)), estando o tecido mais profundo com características

de normalidade (Figuras 10-12 (A-C)). A intensidade do infiltrado inflamatório diminuiu gradativamente nos terços médio e apical, sendo que as células inflamatórias estavam praticamente ausentes na região apical (Figuras 10-12 (G-I)). Também foi observado que o tecido conjuntivo apresentava-se organizado exibindo diversos fibroblastos entre os vários feixes de fibras colágenas, além de apresentar vasos sanguíneos rodeados por células inflamatórias, tendo predominantemente maior vascularização no terço médio (Figuras 10-12 (D-F)). O período de 48 horas mostrou uma maior reação inflamatória em comparação aos demais períodos (Figuras 11). Para todos os períodos experimentais, observou-se um infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos.

5.2.1 Grupo SF

Nos períodos de 24, 48 e 72 horas observou-se maior número de células inflamatórias presentes no terço radicular cervical, sendo que o tecido adjacente ao material capeador apresenta-se praticamente acelular seguido de uma de camada de células inflamatórias dispersas (Figuras 13, 15 (A-C)). Nesta região em alguns cortes histológicos verificaram-se áreas necróticas (Figuras 13, 14 (A-C)). A intensidade do infiltrado inflamatório diminuiu gradativamente nos terços médio e apical, com células inflamatórias escassas na região apical. Verificou-se que em alguns cortes o tecido conjuntivo mais profundo mostrava-se mais desorganizado (Figuras 13; 15 (D-F)), com alta vascularização predominando no terço médio (Figuras 13-15 (D-F)). O período de 48 horas mostrou maior inflamação em comparação aos demais períodos (Figura 14). Para todos os períodos experimentais, observou-se uma resposta inflamatória predominada por neutrófilos.

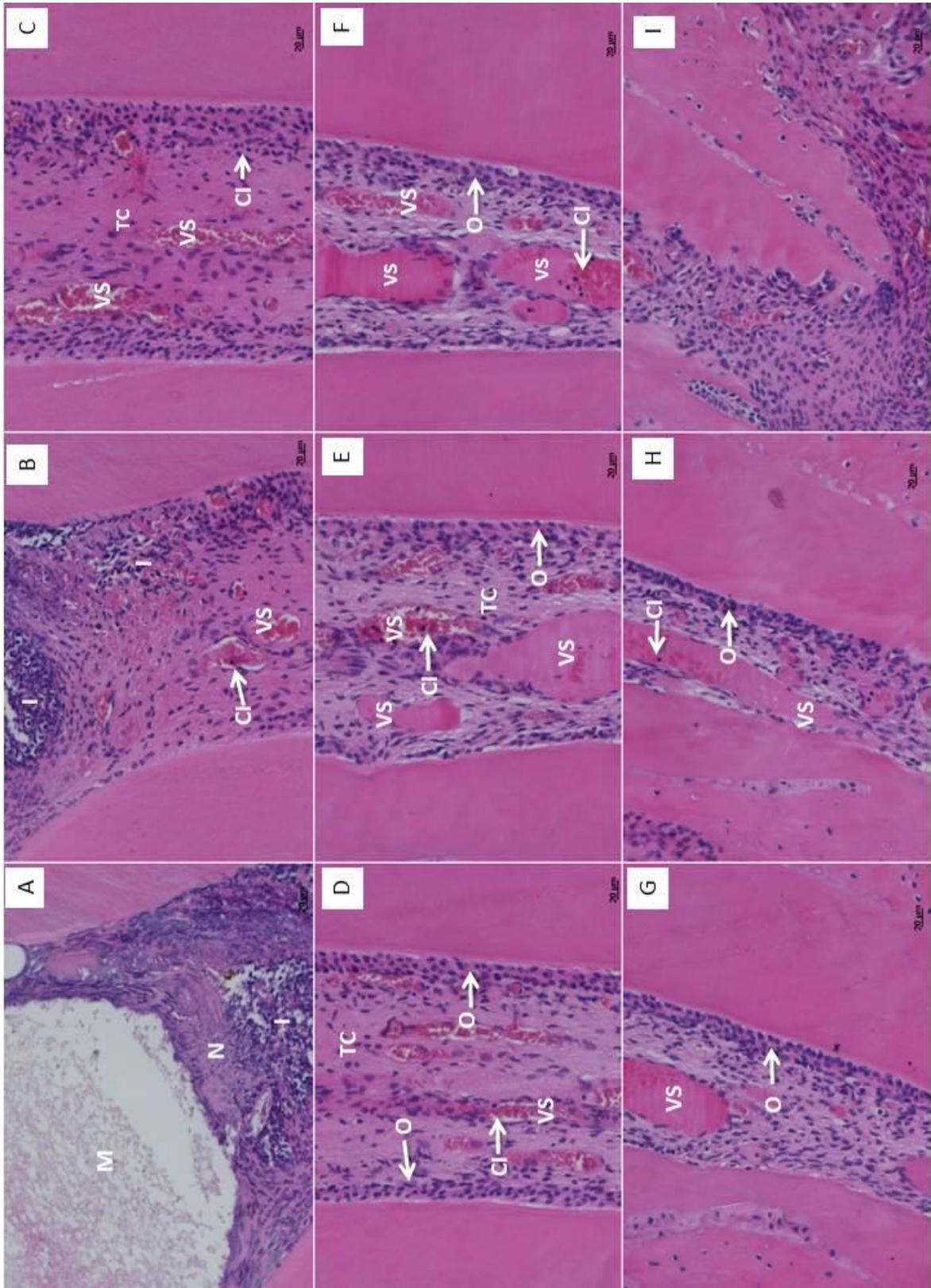


Figura 10 – Fotomicrografias dos terços radiculares de um único dente do grupo MTA, no período experimental de 24 horas, as quais foram coradas com HE.

Legenda: (A-C) terço cervical com presença de infiltrado inflamatório (I) localizado abaixo do material capeador (M), com necrose (N) superficial. (D-F) terço médio, apresentando maior número de vasos sanguíneos (VS), tecido conjuntivo (TC) normal e odontoblasto (O) organizados na periferia pulpar. (G-I) terço apical com diminuição da vascularização (VS). Presença de células inflamatórias (CI) no interior dos vasos sanguíneos. Aumento de 40x.

Fonte: Do autor

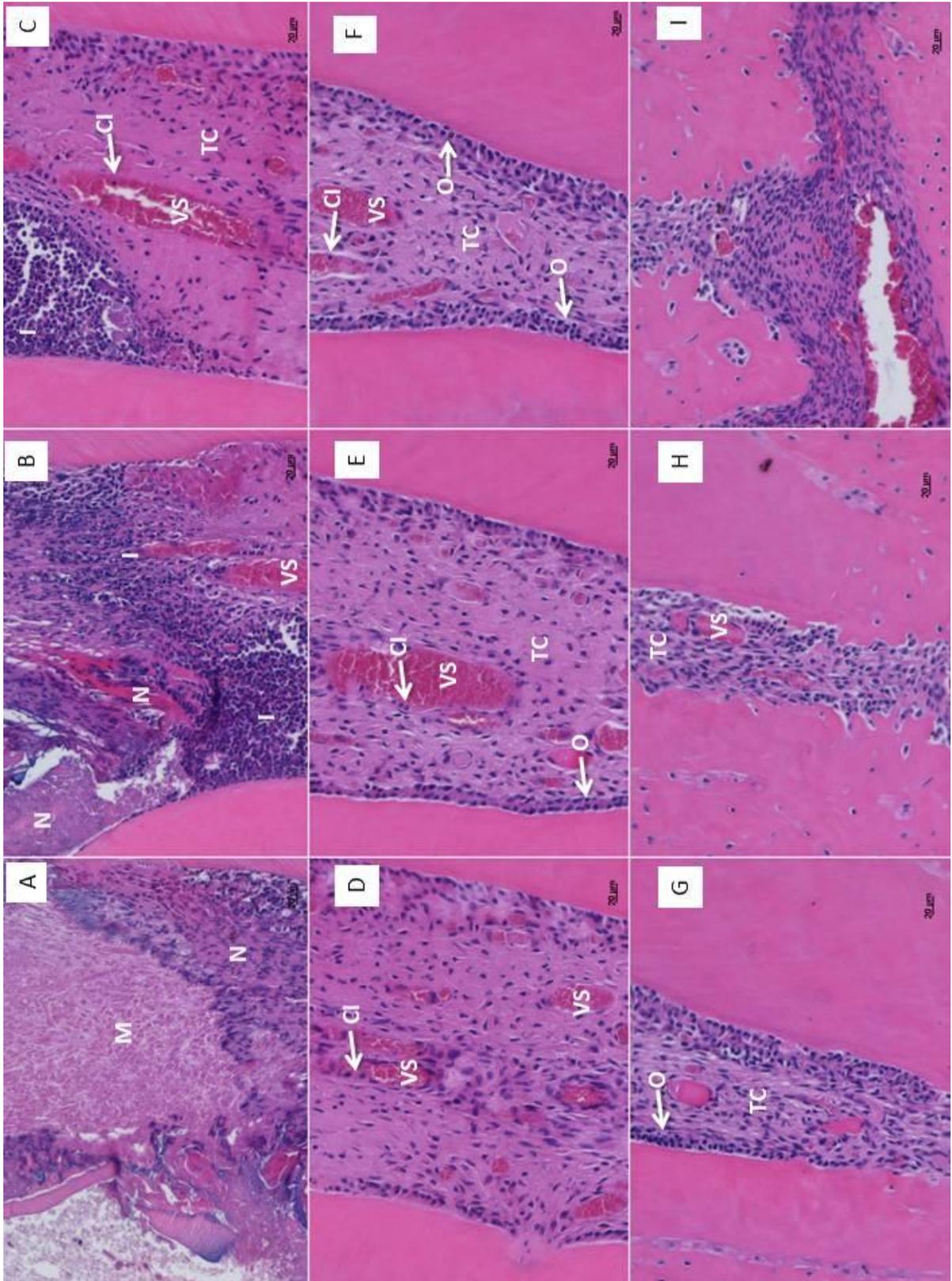


Figura 11 – Fotomicrografias dos terços radiculares de um único dente do grupo MTA, no período experimental de 48 horas, as quais foram coradas com HE.

Legenda: (A-C) terço cervical com infiltrado inflamatório (I) denso abaixo do material (M) e necrose (N) superficial. (D-F) terço médio mostrando vasos sanguíneos calibrosos (VS), o tecido conjuntivo (TC) normal e odontoblasto (O) organizados na periferia pulpar. (G-I) terço apical pouco vascularizado (VS). Presença de células inflamatórias (CI) no interior dos vasos sanguíneos. Aumento de 40x.

Fonte: Do autor

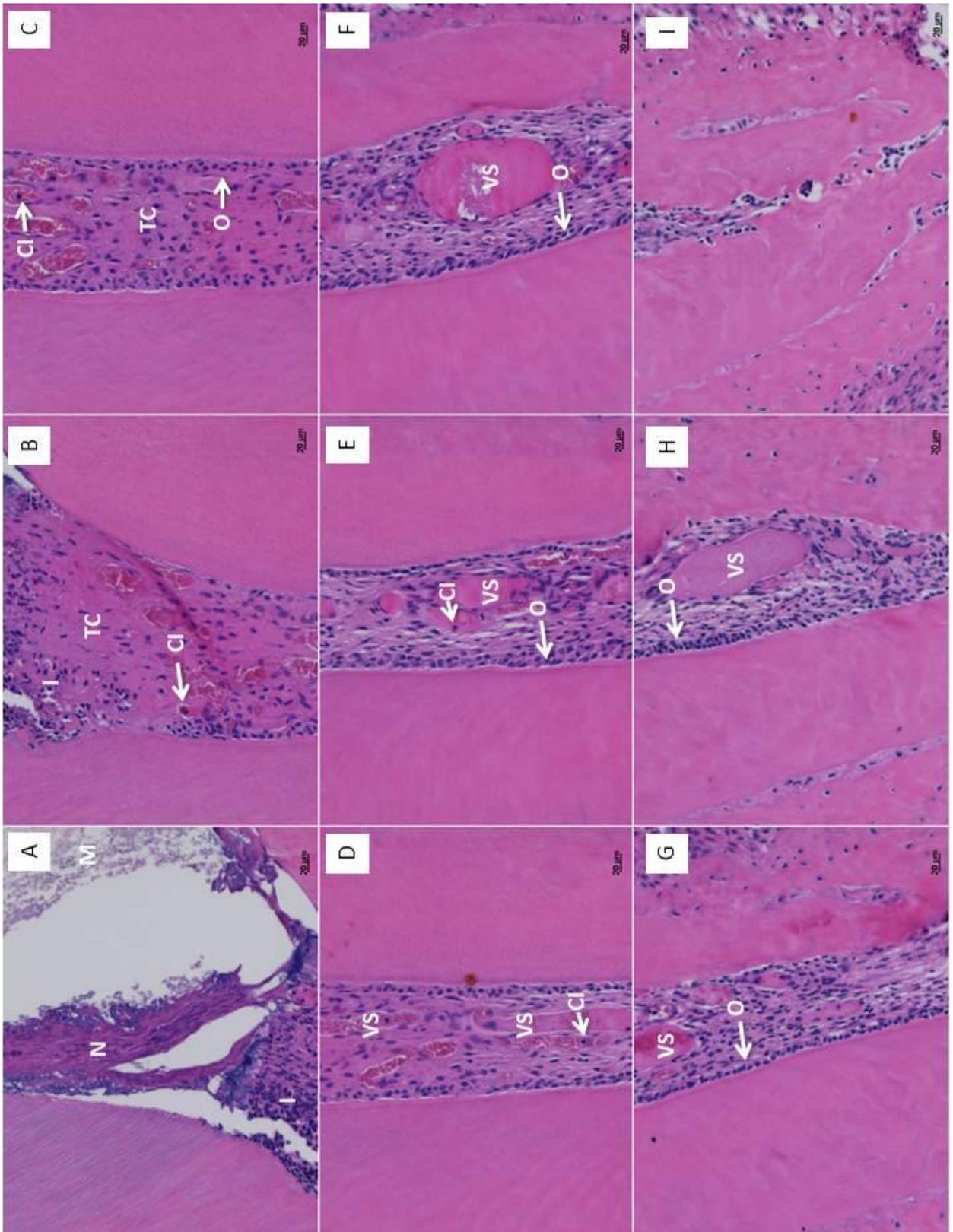


Figura 12 – Fotomicrografias dos terços radiculares de um único dente do grupo MTA, no período experimental de 72 horas, as quais foram coradas com HE.

Legenda: (A-C) terço cervical com necrose superficial (N) infiltrado inflamatório abaixo do material (M), poucas células inflamatórias (CI) no tecido mais profundo e tecido conjuntivo (TC) normal. (D-F) terço médio com vasos sanguíneos calibrosos (VS) e odontoblasto (O) organizados na periferia pulpar. (G-I) terço apical com poucos vasos sanguíneos (VS). Presença de células inflamatórias (IC) no interior dos vasos sanguíneos. Aumento de 40x.

Fonte: Do autor

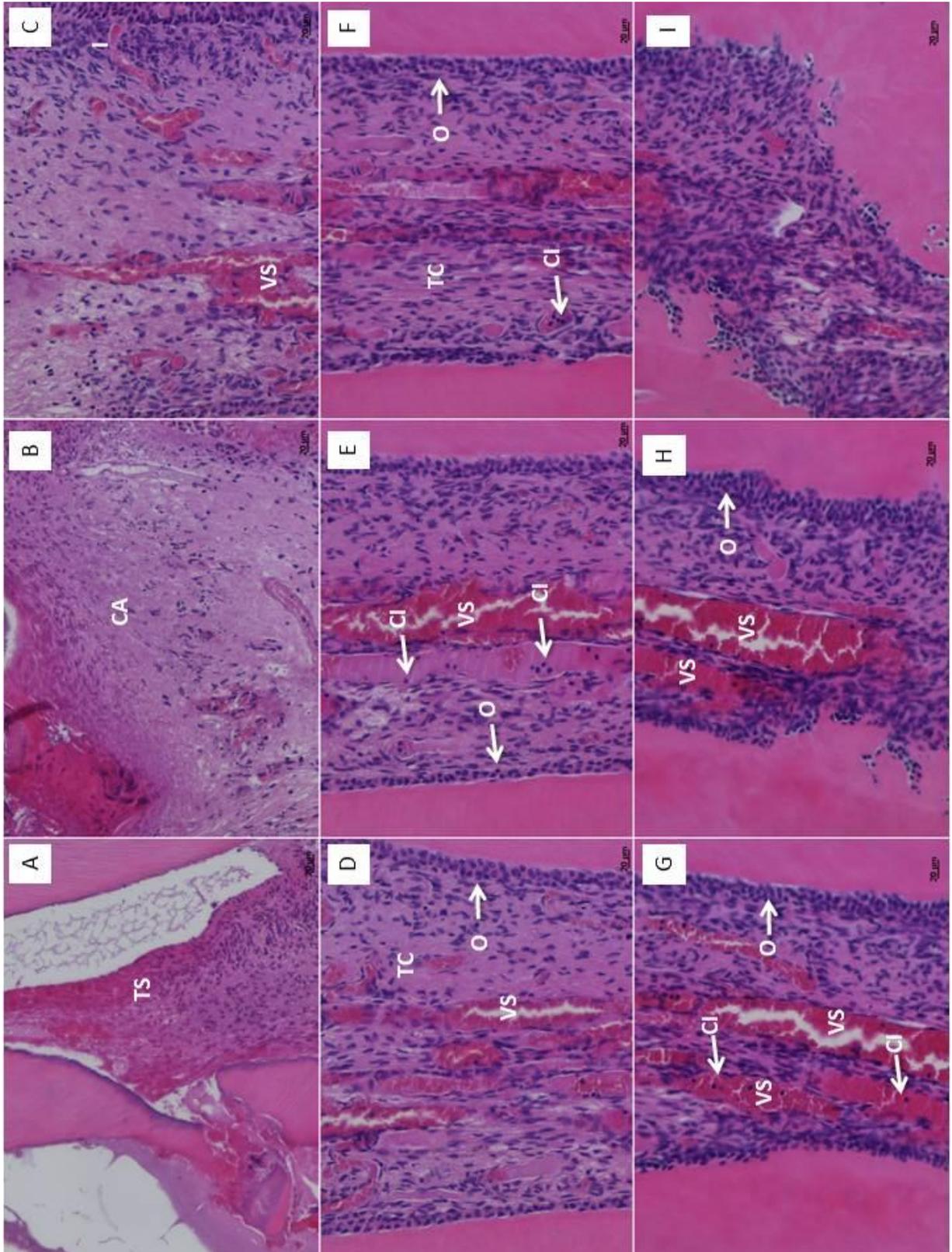


Figura 13 – Fotomicrografias dos terços radiculares de um único dente do grupo SF, no período experimental de 24 horas, as quais foram coradas com HE.

Legenda: (A-C) terço cervical apresentando tecido superficial (TS) em contato com material mais avermelhado e logo abaixo se observa a presença de uma camada acelular, presença de infiltrado inflamatório (I). (D-F) terço médio, em que se verifica o maior número de vasos sanguíneos (VS), o tecido conjuntivo (TC) desorganizado e odontoblasto (O) organizados na periferia pulpar. (G-I) terço apical com vasos sanguíneos (VS). Presença de células inflamatórias (CI) no interior dos vasos sanguíneos. Aumento de 40x.

Fonte: Do autor

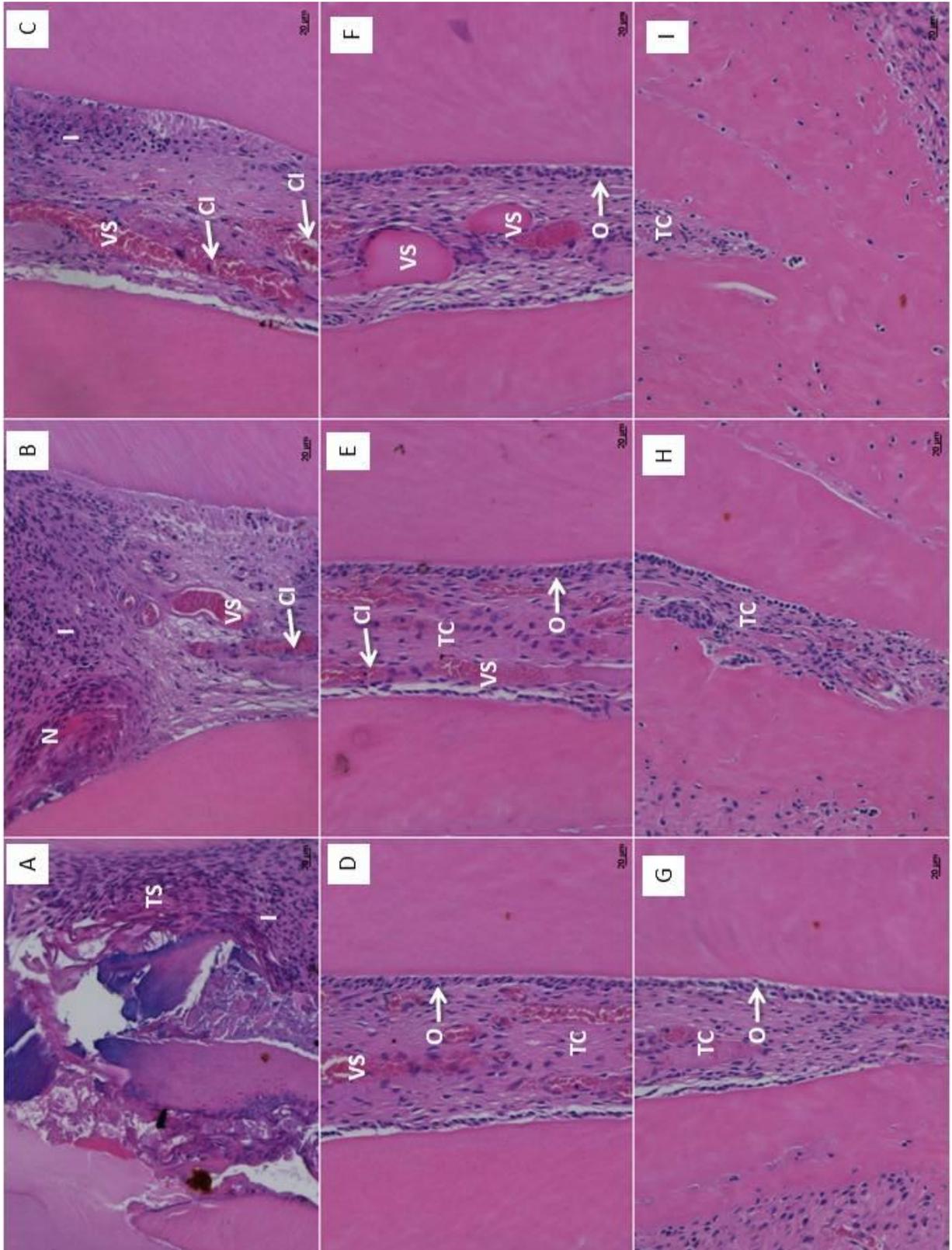


Figura 14 – Fotomicrografias dos terços radiculares de um único dente do grupo SF, no período experimental de 48 horas, as quais foram coradas com HE.

Legenda: (A-C) terço cervical com tecido superficial (TS) em contato com material mais avermelhado com grande concentração do infiltrado inflamatório (I) disperso pelo tecido pulpar coronário e necrose (N) superficial. (D-F) terço médio com maior número de vasos sanguíneos (VS), o tecido conjuntivo (TC) organizado e odontoblasto (O) distribuídos na periferia pulpar. (G-I) terço apical com poucos vasos sanguíneos (VS). Presença de células inflamatórias (CI) no interior dos vasos sanguíneos. Aumento de 40x.

Fonte: Do autor

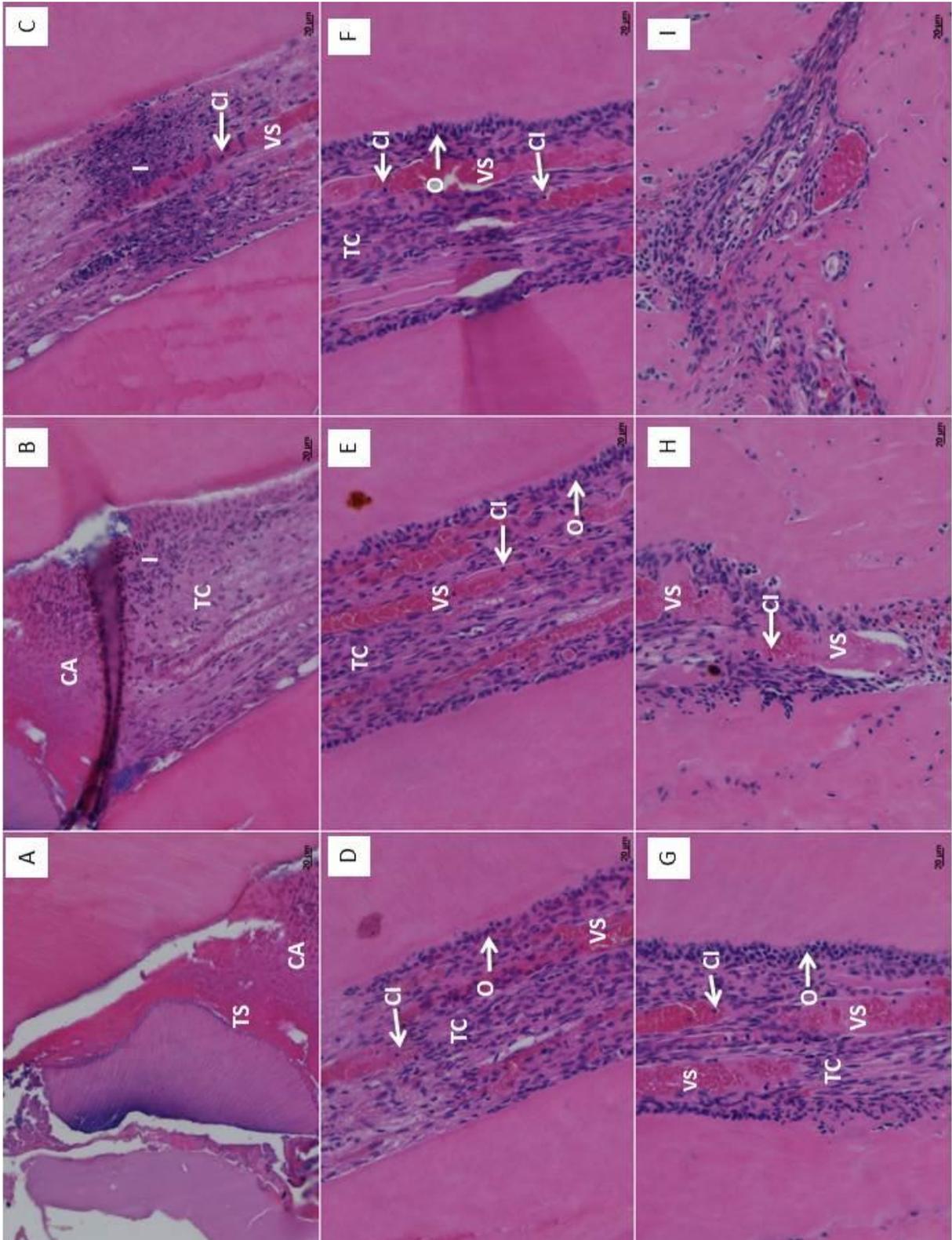


Figura 15 – Fotomicrografias dos terços radiculares de um único dente do grupo SF, no período experimental de 72 horas, as quais foram coradas com HE.

Legenda: (A-C) terço cervical com tecido superficial (TS) em contato com material mais avermelhado e logo abaixo a presença de uma camada acelular e presença de infiltrado inflamatório (I) disperso pelo tecido pulpar coronário. (D-F) terço médio, com presença de vasos sanguíneos (VS) o tecido conjuntivo (TC) e odontoblasto (O) apresentam-se desorganizados. (G-I) terço apical com presença de vasos sanguíneos (VS) o tecido conjuntivo (TC) demonstra-se desorganizado e os odontoblasto (O) organizados na periferia pulpar. Presença de células inflamatórias (CI) no interior dos vasos sanguíneos. Aumento de 40x.

Fonte: Do autor

5.3 QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO PARA IL-6

Como a interação tripla foi significativa ($p=0,0039$) (Tabela 1), foi necessário realizar o desdobramento. Ressalva-se que para a interpretação dos dados que os menores valores representam uma maior imunoeexpressão, enquanto que o maior valor representa uma menor expressão da IL-6.

Desse modo, avaliando o período experimental para um mesmo terço radicular e material, verificou-se que nas amostras do grupo MTA, no terço cervical, 24 horas foi estatisticamente diferente de 48 e 72 horas ($p < 0,05$), no qual a maior expressão da marcação foi observada em 24 horas após pulpotomia. Em relação ao terço médio MTA, não houve diferença estatística entre os períodos experimentais ($p > 0,05$). Na análise do terço apical do grupo MTA, houve diferença estatística tanto entre 24 e 72 horas, como também entre 48 e 72 horas ($p < 0,05$), com maior expressão em 72 horas. Para a análise no grupo SF, em relação ao terço cervical não foi encontrada diferença estatística ($p > 0,05$). Já no terço médio e apical, houve diferença tanto entre 24 e 48 horas como entre 48 e 72 horas ($p < 0,05$), observando-se maior expressão de IL-6 às 24 horas após o procedimento (Tabela 2).

Em relação à análise do terço radicular dentro de um mesmo período experimental e grupo, observou-se que no Grupo MTA, no período de 24 horas após pulpotomia, houve diferença estatística entre os três terços ($p < 0,05$), sendo que o terço cervical mostrou maior imunoeexpressão, com diminuição da marcação no terço médio e apical gradativamente. No período de 48 e 72 horas, não foi encontrada diferença estatística entre os terços radiculares ($p > 0,05$). Para as amostras do grupo SF, no tempo experimental de 24 horas, não foi encontrada diferença estatística entre aos terços ($p > 0,05$). Em relação ao período de 48 horas, observou-se diferença estatística entre o terço cervical e o apical ($p < 0,05$), com maior marcação da IL-6 no terço cervical. Para o período de 72 horas, houve diferença entre o terço cervical com o terço médio e apical, sendo que a maior marcação para IL-6 ocorreu no terço cervical ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Ao comparar um material com o outro em um mesmo período experimental e terço radicular foi possível observar que, no terço cervical, houve diferença estatística entre os materiais apenas no período de 24 horas ($p < 0,05$), sendo que o grupo MTA apresentou maior imunoeexpressão para IL-6. Em relação ao terço médio,

a diferença estatística foi observada apenas no período de 72 horas ($p < 0,05$) após o tratamento com maior imunopositividade também para o material MTA. No terço apical, houve diferença estatística entre os materiais nos período de 24 horas ($p < 0,05$), com maior expressão da marcação no grupo SF, e em 72 horas ($p < 0,05$) após o procedimento, com maior expressão de IL-6 para o grupo MTA (Tabela 2).

5.4 ANÁLISE DESCRITIVA DOS CORTES SUBMETIDOS À IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA IL-6

Nos cortes histológicos da polpa dentária submetidos à reação de imunohistoquímica, observou-se a expressão citoplasmática de IL-6 em odontoblastos e em eventuais células inflamatórias presentes no tecido pulpar (Figura 16). Ocasionalmente uma marcação difusa para IL-6 foi encontrada na matriz extracelular do tecido conjuntivo (Figura 16).

A polpa dentária apresentou uma marcação para IL-6 de intensidade leve a moderada, dependendo do material utilizado, do período de tempo e terço radicular avaliado.

Tabela 1 - Análise de variância a 3 critérios, considerando material (MTA branco ou SF 15,5%), o período de avaliação (24, 48, 72 horas) e o terço radicular (cervical, médio e apical) como fontes de variação

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	p valor
Material	1	648,00	648,00	0,006
Período	2	2542,08	1271,54	> 0,0001
Terço	2	5462,33	2731,16	> 0,0001
Material x Período	2	230,58	115,29	0,242
Material x Terço	2	151,00	75,50	0,3916
Período x Terço	4	832,22	208,08	0,0442
Material x Período x Terço	4	1385,16	346,29	0,0039
Resíduo	54	4273,50	79,13	
Total	71	15526,00	218,67	

Fonte: Do Autor

Nota: GL: Grau de liberdade; SQ: Soma de quadrados; QM: Quadrado médio.

Tabela 2 - Expressão média de IL-6 nos terços radiculares do tecido pulpar remanescente após pulpotomia com MTA branco ou FS 15,5% durante os períodos experimentais

MATERIAL	TERÇO RADICULAR	PERÍODO (h)	EXPRESSÃO IL-6
MTA	Cervical	24	120.00 ^{a,A,Ω}
		48	150.00 ^{b,A,Ω}
		72	142.25 ^{b,A,Ω}
	Médio	24	142.25 ^{a,B,Ω}
		48	154.25 ^{a,A,Ω}
		72	143.25 ^{a,A,§}
	Apical	24	170.25 ^{a,C,Ω}
		48	162.00 ^{a,b,A,Ω}
		72	150.75 ^{b,A,§}
SF	Cervical	24	137.50 ^{a,A,§}
		48	152.25 ^{a,A,Ω}
		72	142.50 ^{a,A,Ω}
	Médio	24	145.00 ^{a,A,Ω}
		48	164.50 ^{b,A,B,Ω}
		72	157.75 ^{a,b,B,Ω}
	Apical	24	153.25 ^{a,A,§}
		48	171.75 ^{b,B,Ω}
		72	164.50 ^{a,b,B,Ω}

Fonte: do Autor

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os períodos de avaliação para um mesmo terço radicular de dentes tratados com MTA ou SF ($p < 0.05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os terços radiculares para um mesmo período de avaliação de dentes tratados com MTA ou SF. Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre o material (MTA ou SF) para um mesmo período de avaliação e mesmo terço radicular.

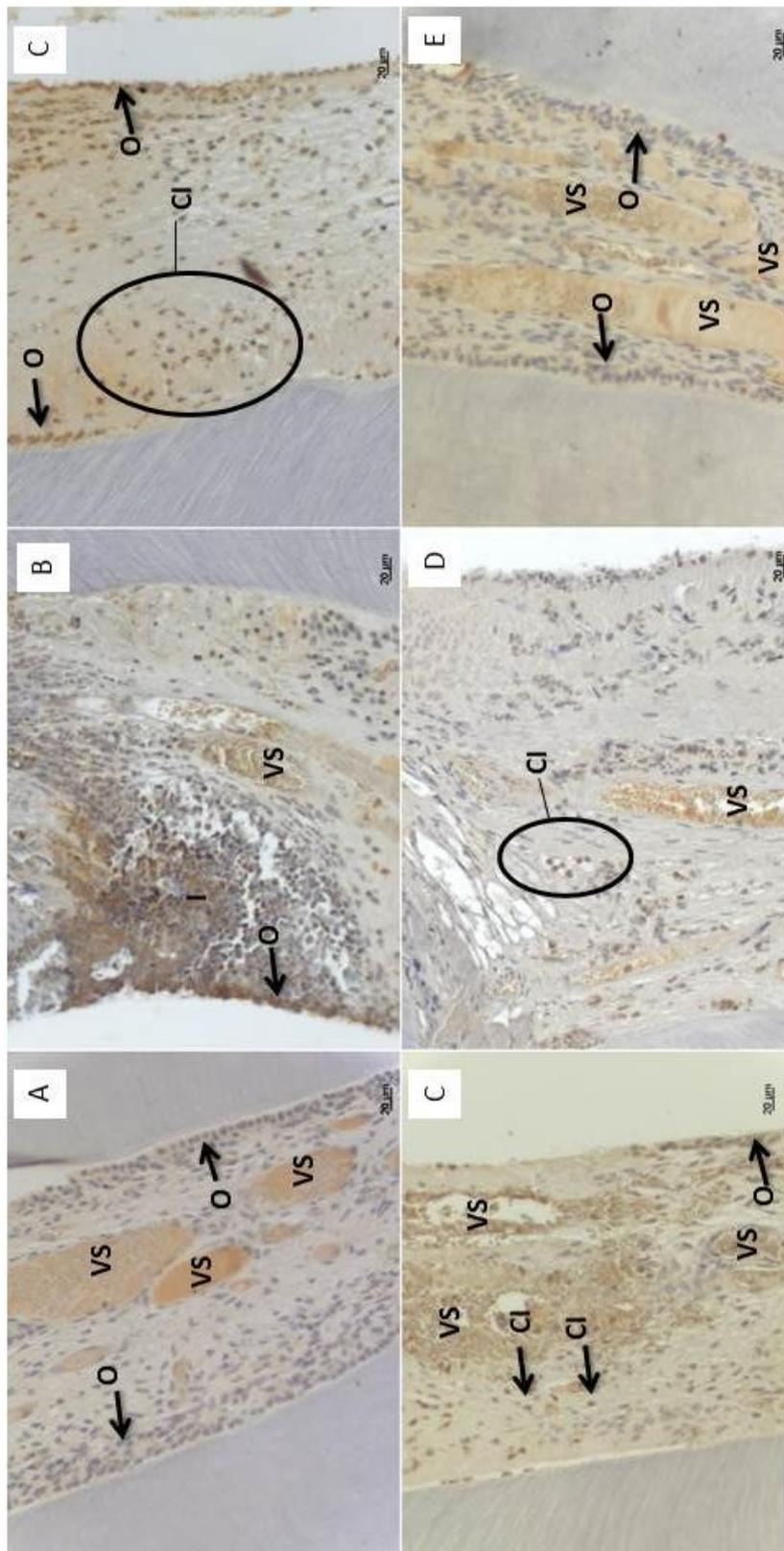


Figura 16 – Fotomicrografias dos terços cervical ou médio radicular de diversos dentes submetidas à reação imuno-histoquímica para detecção de IL- 6 nos grupos MTA e SF.
 Legenda: (A-C) Grupo MTA e (D-F) grupo SF nos períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, mostrado a imunomarcação do citoplasma de células inflamatórias (CI) e de odontoblastos (O). (VS) Vasos sanguíneos. Aumento de 40x.

Fonte: Do autor

6 DISCUSSÃO

Os recentes progressos no campo da biologia celular e molecular, bem como o melhor conhecimento acerca do desenvolvimento dentário, contribuíram para o surgimento de novos materiais, mais biocompatíveis, indicados para pulpotomia de dentes decíduos (SAKAI et al., 2009). Deste modo, visando ampliar o conhecimento sobre o mecanismo de ação, as vantagens, as desvantagens e as indicações dos materiais capeadores pulpares, estudos sobre esses agentes têm sido constantes na literatura (DOMINGUEZ et al., 2003; GODHI; SOOD; SHARMA, 2011; MORETTI et al., 2008; SAKAI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013).

A interação entre materiais capeadores em contato com o tecido pulpar é influenciada por muitos fatores, incluindo a composição do material, a concentração química, produtos de degradação e a capacidade do tecido para responder a estes agentes. O conhecimento da maneira com que estes materiais dentários interagem com o tecido pulpar é fundamental para a compreensão de como esse tecido pode ser ferido e posteriormente reparado ou regenerado durante procedimentos restauradores dentários (FERRACANE; COOPER; SMITH, 2010; MURRAY; GARCÍA GODOY; GARCÍA GODOY, 2007; YASUDA et al., 2008).

Por fatores éticos, estudos *in vivo* não possibilitam avaliar as reações iniciais que ocorrem quando da colocação de um material capeador sobre o remanescente pulpar radicular, já que dentes decíduos humanos não podem e não devem ser extraídos logo após o tratamento de pulpotomia. Portanto, justifica-se o modelo em animais para avaliação das respostas celulares iniciais (CENGIZ et al., 2005; KRAMER et al., 2014; SCARPARO et al., 2011; TRAN et al. 2012).

O modelo experimental deste estudo envolveu a utilização de ratos, visto que seus molares, incluindo o tecido pulpar, apresentam-se anatômica, histológica, biológica e fisiologicamente semelhantes aos molares humanos (DAMMASCHKE, 2010). As pulpotomias foram realizadas nos molares inferiores de ratos conforme descrições prévias na literatura (BARBOSA SILVA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008; CENGIZ et al., 2005; TRAN et al. 2012).

Alguns dos fatores limitantes da utilização do modelo animal de ratos foram a impossibilidade de se realizar isolamento absoluto, dificuldade em se ter uma visualização adequada do campo de trabalho e, por mais cuidado na eliminação das raspas de dentina, algumas amostras apresentaram-se com raspas durante a

avaliação histológica.

O MTA foi eleito para o esse estudo por ser um material amplamente utilizado com altas taxas de sucesso clínico, radiográfico e histológico em pulpotomia de dentes decíduos (AEINEHCHI et al., 2007; AGAMY et al., 2004; CAICEDO et al., 2006; CHACKO; KURIKOSE, 2006; DOMINGUEZ et al., 2003; EIDELMAN; HOLAN; FUKS, 2001; KARABUCAK et al., 2005; LIN et al., 2014; MORETTI et al. 2008; NIRANJANI et al., 2015; ODABAS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; PARANJPE et al., 2011; SAKAI et al., 2009; SRINIVASAN; JAYANTHI, 2011). Porém, seu alto custo impossibilita seu uso em muitos países e no sistema público de saúde, além da sua associação com a alteração de cor do elemento dentário (AL-HAJ ALI; AL-JUNDI; DITTO, 2015; WALKER et al., 2013).

Devido a isto, terapias alternativas vêm sendo pesquisadas a fim de se encontrar um material de baixo custo e com taxas de sucessos semelhantes às do MTA (STRINGHINI JUNIOR; VITCEL; OLIVEIRA, 2015). Seleccionamos o sulfato férrico 15,5% por ser um material barato e, apesar de vários estudos demonstrarem alta taxa de sucesso clínico e radiográfico (ERDEM et al., 2011; FUKS, 2002; PENG et al., 2007; NEAMATOLLAHI; TAJIK, 2006; SONMEZ; SARI; ÇETINBAS, 2008; HAVALÉ et al., 2013; YILDIZ; TOSUN, 2014), poucos são os estudos histológicos com a utilização deste material (CANNON et al., 2011; FUKS, 1997; SHAYEGAN; PETEIN; ABBEELE, 2008).

Muitas pesquisas foram realizadas avaliando clínica e radiograficamente as reações pulpare frente aos materiais capeadores utilizados em pulpotomias (AEINEHCHI et al., 2007; AGAMY et al., 2004; CAICEDO et al., 2006; DOMINGUEZ, 2003; EIDELMAN; HOLAN; FUKS, 2001; FUKS et al., 1997; LIN et al., 2014; MORETTI et al. 2008; NIRANJANI et al., 2015; ODABAS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; SAKAI et al., 2009; SHAYEGAN; SRINIVASAN; JAYANTHI, 2011). No entanto, as reações iniciais ainda não estão bem elucidada (SHAHI et. al., 2010) e acredita-se que falhas nas pulpotomias possam estar relacionadas com reações inflamatórias agudas subclínicas (BARBOSA SILVA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008; SHAHI et. al., 2010). Além disso, existem poucos estudos histológicas e imuno-histoquímicas envolvendo a utilização do MTA e do SF, justificando, portanto, a realização do presente trabalho.

No grupo MTA, verificou-se maior número de células inflamatórias no terço cervical. Também foi possível observar no tecido adjacente ao material capeador a

presença de infiltrado inflamatório e até mesmo áreas necróticas. A presença de tecido necrótico sugere que o MTA, de maneira similar ao hidróxido de cálcio, inicialmente causa uma necrose por coagulação em contato com o tecido conjuntivo pulpar, reação esta devido à alta alcalinidade do produto utilizado (KOMABAYASHI; SPANGBERG, 2008).

Assim, os materiais à base de MTA, após a hidratação, liberam íons hidroxilas, proporcionando ao meio um pH alcalino (FORMOSA et al., 2012; GRECH; MALLIA; CAMILLERI, 2013). O meio alcalino estimula o recrutamento de leucócitos, neutrófilos (SILVA et al., 2015) e a diferenciação de plasmócitos (SARAIVA et al., 2017). Desse modo, entende-se que o MTA apresenta atividade potencialmente curativa promovendo a cicatrização de feridas na parte coronária do dente, mantendo a integridade da polpa após a pulpotomia, resultados estes observados por Bodem et al. (2004), Barbosa Silva; Vieira; Sobrinho (2008), Camilleri et al. (2005), Moretti et al. (2008) e Sakai et al. (2009).

Estudos relatam que o MTA, utilizado como material capeador, permite que o tecido remanescente continue vital, apresentando funções fisiológicas normais, estimulando a formação de tecido de mineralizado e, além disso, não apresentando nenhum efeito deletério ao germe do dente permanente sucessor (ANSARI; RANJPOUR, 2010; CAICEDO et al., 2006; CARDOSO- SILVA et al., 2011)

Para o grupo SF, verificou-se um maior número de células inflamatórias no terço cervical. Na análise morfológica, foi possível observar que o tecido em contato com o material mostrava-se com uma coloração mais avermelhada, seguido de camada aparentemente acelular. Acreditamos que esta característica morfológica seja decorrente da ação hemostática do material, em que um complexo férrico protéico é formado, e a sua membrana sela mecanicamente os vasos cortados. Segundo Ranly e Garcia-Godoy (2000), a prevenção da formação do coágulo sanguíneo permite a precipitação de uma barreira protéica no local de amputação.

Vale ressaltar que a colocação direta de OZE sobre o tecido da polpa foi relatado como causadora de inflamação em pulpotomias com SF (Smith; Seale; Nunn, 2000), visto que as moléculas do eugenol, presentes na base de OZE, são pequenas e podem se difundir com facilidade pela polpa, causando uma inflamação crônica subclínica (CASAS et al., 2005; HAVALE et al., 2013; MORETTI et al., 2008; ODABAS al., 2012; YILDIZ; TOSUN, 2014). Por outro lado, o complexo de íons férricos formado pelo SF na superfície do remanescente pulpar pode atuar como

uma barreira para componentes irritativos do OZE (RANLY, 1994). Devido a este fato, acreditamos que esta barreira tenha restringido o processo inflamatório e desorganização tecidual causados pelo OZE e não pelo SF, para uma região imediatamente abaixo à base capeadora.

Em uma revisão sistemática da literatura, as taxas de sucesso clínico encontradas em tratamentos com o SF variaram de 78% a 100% e a de sucesso radiográfico de 42% a 97% (PENG et al., 2007). Entretanto, não existem muitas pesquisas que demonstrem seu sucesso histológico quando aplicados com este fim (CANNON et al., 2011; CLEATON-JONES et al., 2002; FUKS et al., 1997; SHAYEGAN; PETEIN; ABBEELE, 2008). De acordo com Cleaton-Jones et al. (2002), mesmo com possíveis falhas nos achados histológicos em casos que se utilizaram SF, a pulpotomia pode apresentar sucesso clínico e radiográfico.

Entre os dois materiais estudados no presente trabalho não houve diferença significativa na reação tecidual do remanescente pulpar causada pelos materiais. Porém, através da análise histológica do tecido pulpar, observou-se que o grupo SF apresentou dentes com um infiltrado inflamatório ligeiramente maior que o grupo MTA, além de uma maior desorganização e vascularização do tecido mais profundo.

Em dentes de suínos, após 3 semanas da realização de pulpotomias, Shayegan, Petein e Abbeele (2008) verificaram não haver diferença significativa entre fosfato beta-tricálcico, MTA e cimento Portland branco em termos de resposta inflamatória, sendo esta menor do que aquela provocada pelo SF e formocresol.

Além disso, em ambos os grupos, o infiltrado inflamatório diminuiu no terceiro dia, indicando o início da fase de resolução do processo inflamatório. A diminuição do número de células inflamatórias no terceiro dia de avaliação também foi detectada por Reyes-Carmona et al. (2010). Em seu trabalho, após pulpotomia com MTA, os neutrófilos foram as células predominantes no primeiro dia no remanescente pulpar próximo ao material capeador e o recrutamento de neutrófilos diminuiu do primeiro até o terceiro dia, quando principalmente macrófagos e linfócitos migraram para o tecido.

Portanto, no presente estudo foi possível observar que, em ambos os grupos experimentais, o maior número de células inflamatórias ocorreu 48 horas após a pulpotomia, corroborando com o pico entre 24 e 48 horas do recrutamento de neutrófilos, os quais migram dos vasos sanguíneos para o espaço perivascular, sendo direcionados para a lesão ou irritantes (MELKER et al., 2006). Após o pico da

inflamação em 48 horas, houve a resposta imunológica do hospedeiro, envolvendo eventos celulares e ocasionando a diminuição do número de células inflamatórias às 72 horas.

Atualmente, há evidências de que a inflamação é um pré-requisito para o reparo do tecido (EMING, KRIEG, DAVIDSON, 2007; GOLDBERG et al., 2008). O equilíbrio entre os mediadores estimulatórios e inibitórios durante as diversas fases da reparação é crucial para se alcançar a homeostase do tecido após a lesão (EMING, KRIEG, DAVIDSON, 2007).

O saldo existente entre a infecção, a inflamação e a reparação é fundamental para o prognóstico do tratamento (SIMON et al., 2012). Os eventos inflamatórios podem contribuir para as fases iniciais da reparação pulpar, principalmente, se houver ligação direta entre a liberação de citocinas e o comprometimento de algumas células pulpares em relação ao fenótipo progenitor de odontoblastos ou osteoblastos (GOLDBERG et al., 2008).

Segundo Goldberg et al. (2008), a reparação celular tem início após o controle da inflamação, com a substituição da parte lesada ou necrótica por células indiferenciadas, que após diferenciação darão origem a um tecido semelhante ao anterior. Tais autores citam ainda três fases sucessivas na renovação celular: ligeira inflamação associada com o recrutamento celular, proliferação celular preenchendo o local da lesão e, em seguida, a diferenciação celular na polpa, originando novos odontoblastos para a produção de dentina reparadora.

As células imunes e residentes do hospedeiro produzem e liberam várias citocinas que exercem um papel complexo, porém de forma coordenada sobre a linha de eventos celulares e moleculares envolvidos no desencadeamento e progressão do processo inflamatório (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008; FRANZ et al., 2011).

Dentre as interleucinas, a IL-6 é uma importante reguladora da inflamação e tem seus níveis aumentados nos processos inflamatórios (SCHELLER et al, 2011). Trata-se de uma citocina multifuncional inflamatória é secretada por monócitos, macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e linfócitos T (FONSECA et al., 2016; SCHELLER et al. ,2011), sendo sintetizada em resposta a um trauma ou uma infecção, que pode ativar células específicas exercendo assim um papel importante na reação inflamatória e reabsorção óssea (OLIVEIRA et al., 2017).

Inicialmente, a IL-6 induz o recrutamento de neutrófilos e, em seguida, atua

na transição da inflamação aguda para a inflamação crônica, modulando a apoptose dos polimorfonucleares, recrutando monócitos e estimulando sua diferenciação em macrófagos. Também exerce papel na diferenciação de linfócitos B e T, a partir da apresentação de antígeno, além de atuar na regulação do metabolismo ósseo e em algumas funções neurais (SCHELLER et al., 2011). Assim, a IL-6 pode ser considerada um potente mediador da resposta inflamatória e marcador da inflamação (RINCON, 2012). Como em nosso estudo foi observada uma marcação de leve a moderada para IL-6 após utilização de MTA e SF, sugere-se a ocorrência de um processo inflamatório brando.

Tem sido observada após implantação de materiais à base de silicato de cálcio em subcutâneo de ratos correlação entre reação inflamatória e imunoexpressão de IL-6 (FONSECA et al., 2016; SILVA et al., 2015). Neste estudo, foi possível observar que houve uma maior expressão da IL-6 nos terços radiculares do tecido pulpar remanescente após pulpotomia com MTA branco, durante os períodos experimentais. Níveis elevados dessa citocina podem estar correlacionados à extensão da inflamação e edema do tecido pulpar e ao seu papel como um mediador da resposta do hospedeiro em função da injúria tecidual e infecção (ELSALHY; AZIZIEH; RAGHUPATHY 2013).

No presente trabalho, observou-se uma maior expressão da IL-6 no terço cervical das amostras de ambos os grupos ao longo do tempo experimental, sendo essa expressão de leve a moderada, o que sugere sua participação no processo inflamatório decorrente da utilização de ambos os materiais capeadores empregados neste estudo. Porém, não foram encontrados trabalhos na literatura sobre análise imuno-histoquímica para esses materiais, evidenciando a necessidade de mais estudos com essa metodologia.

7 CONCLUSÃO

Não houve diferença entre o grau de inflamação e densidade vascular entre os dentes tratados com MTA branco e SF 15,5%, porém os dentes tratados com MTA apresentaram melhores características histológicas. A inflamação inicial ocorreu principalmente no terço cervical radicular para ambos os materiais, podendo observar que as células inflamatórias ficaram aglomeradas no tecido adjacente ao MTA, enquanto que estas células distribuíram-se mais difusamente no tecido próximo ao SF. Além disso, a IL-6 teve uma participação de leve a moderadora na resposta inflamatória inicial em ambos os grupos com maior expressão em dentes tratados com o material MTA.

REFERÊNCIAS

- AEINEHCHI, M. et al. Randomized controlled trial of mineral trioxide aggregate and formocresol for pulpotomy in primary molar teeth. **Int. Endod. J.**, v. 40, n. 4, p. 261-267, 2007.
- AGAMY, H.A. et al. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotomized primary teeth. **Pediatr. Dent.**, v. 26, n. 4, p.302-309, 2004.
- ALBUQUERQUE, D. S.; GOMINHO, L. F.; SANTOS, R. A. Histologic evaluation of pulpotomy performed with ethyl-cyanoacrylate and calcium hydroxide. **Braz. Oral Res.**, v. 20, n. 3, p. 226-230, 2006.
- AL-DLAIGAN, Y. H. Pulpotomy Medicaments used in Deciduous Dentition: An Update. **J Contemp Dent Pract.**, v. 16 n. 6, p. 486-503, 2015.
- AL-HAJ ALI, S. N.; AL-JUNDI, S. H.; DITTO, D. J. In vitro toxicity of formocresol, ferric sulphate, and grey MTA on human periodontal ligament fibroblasts. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.**, v. 16, n. 1, p. 51-55, 2015.
- ALSUBAIT, A.; AL-HAIDAR, S.; AL-SHARYAN, N. A Comparison of the Discoloration Potential for EndoSequence Bioceramic Root Repair Material Fast Set Putty and ProRoot MTA in Human Teeth: An In Vitro Study. **J. Esthet Restor Dent.**, v. 29, n. 1, p. 59-67, 2016.
- American Academy of Pediatric Dentistry, AAPD, Reference Manual 2016-2017. Guideline on Pulp Therapy for Primary and Immature Permanent Teeth. **Pediatr. Dent.**, v. 38, n. 6, p. 280-288, 2017.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Semin Immunol.**, v. 20, n. 2, p. 86-100, 2008.
- ANSARI, G.; RANJPOUR, M. Mineral trioxide aggregate and formocresol pulpotomy of primary teeth: a 2-year follow-up. **International Endodontic Journal**, v. 43, n. 5, p. 413-418, 2010.
- ASGARY, S.; SHIRVANI, A.; FAZLYAB, M. MTA and Ferric Sulfate in Pulpotomy Outcomes of Primary Molars: A Systematic Review and Meta-Analysis. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2014.
- AUGSBURGUER, R. A.; PETERS, D. D. In vitro effects of ice, skin refrigerant, and CO2 snow on intrapulpal temperature. **J. Endod.**, v.7, n.3, p.110-116, 1981.
- BARBOSA SILVA, M. J.; VIEIRA, L. Q.; SOBRINHO, A. P. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.105, n.5, p. 70-76, 2008.
- BARKHORDAR, R.A. et al., M.Z.; Interleukin-1 β activity and collagen synt hesis in

human dental pulp fibroblasts. *J Endod.*, v. 28, n. 3, p. 157-159, 2002.

BODEM, O. et al. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate in a primary molar: a case report. *Int. J. Paediatr. Dent.*, v. 14, n. 5, p. 376-379, 2004.

BJØRNDAL, L.; MJÖR, I. A. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: Dental caries--characteristics of lesions and pulpal reactions. *Quintessence Int.*, v. 32, n. 9, p. 717-736, 2001.

CAICEDO, R. et al. Clinical, radiographic and histological analysis of the effects of mineral trioxide aggregate used in direct pulp capping and pulpotomies of primary teeth. *Aust. Dent. J.*, v. 51, n. 4, p. 297-305, 2006.

CAMILLERI, J. et al. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent. Mater.*, v. 21, n. 4, p. 297-303, 2005.

CANNON, M. et al. Early response of mechanically exposed dental pulps of swine to antibacterial-hemostatic agents or diode laser irradiation. *J. Clin. Pediatr. Dent.*, v. 35, n. 3, p. 271-276, 2011.

CARDOSO - SILVA, C. et al. Clinical study of Mineral Trioxide Aggregate in primary molars. Comparison between Grey and White MTA- a long term follow-up (84 months). *J. Dent.*, v. 39, n. 2, p. 187-193, 2011.

CASAS, M. J. et al. Do we still need formocresol in pediatric dentistry? *J. Can. Dent. Assoc.*, v. 71, n. 10, p. 749-751, 2005.

CASTRO, A. Current concepts in vital pulpotomies in primary teeth. *J. Mich. Dent. Assoc.*, v. 87, n. 1, p. 26-28, 2005.

CENGIZ, S. B. et al. Histological comparison of alendronate, calcium hydroxide and formocresol in amputated rat molar. *Dent. Traumatol.*, v. 21, n. 5, p. 281-288, 2005.

CHACKO, V.; KURIKOSE, S. Human pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA): a histologic study. *J. Clin. Pediatr. Dent.*, v. 30, n. 3, p. 203-209, 2006.

CLEATON-JONES, P. et al. Ferric sulphate and formocresol pulpotomies in baboon primary molars: histological responses. *Euro J Paediatr Dent*; v. 3, n.3, p. 121-125, 2002.

CONTI, T. R. et al. Pulpotomies with Portland cement in human primary molars. *J Appl. Oral Sci.*, v. 17, n. 1, p. 66-69, 2009.

COOPER, P. R. et al. Inflammation–regeneration interplay in the dentine–pulp complex. *J. Dent.*, v. 38, n. 9 , p. 687-697, 2010.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia estrutural e Funcional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

- DEAN, J. A. Comparison of eletrosurgical and formocresol pulpotomy procedures in children. **Int. J. Paed. Dent.**, v. 12, n. 3, p. 177-182, 2002.
- DALTOÉ, M. O. et al. Expression of Mineralization Markers during Pulp Response to Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. **J Endod.**, v. 42, n. 4, p. 596-603, 2016.
- DALPIAN, D. M. et al. Clinical and radiographic outcomes of partial caries removal restorations performed in primary teeth. **Am J Dent.** V. 27, n. 2, p. 68-72, 2014.
- DAMMASCHKE, T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. **Lab. Anim.**, v. 44, n. 1, p.1-6, Oct. 2009.
- DEERY, C. Formocresol and ferric sulfate have similar success rates in primary molar pulpotomy. In carious primary molars does a pulpotomy performed with ferric sulphate, compared with formocresol, result in greater clinical/radiographic success. **Evid. Based Dent.**, v. 6, n. 3, p. 70, 2005.
- DOMINGUEZ, M. S. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp – therapy materials. **J. Endod.**, v. 29, n. 5, p. 324-333, 2003.
- DUANGTHIP, D. et al. Non-surgical treatment of dentin caries in preschool children – systematic review. **BMC Oral Health.** v. 15, n. 44, p. 1-10, 2015.
- EIDELMAN, E.; HOLAN G.; FUKS A. Mineral trioxide aggregate vs formocresol in pulpotomized primary molars: a preliminary report. **Pediat Dent.**, v. 23, n. 1, p. 15-18, 2001.
- ELSALHY, M.; AZIZIEH, F.; RAGHUPATHY, R. Cytokines as diagnostic markers of pulpal inflammation. **Int Endod J.**, v. 46, n. 6, p. 573-580, 2013.
- EL MELIGY, O. A.; ALLAZZAM, S.; ALAMOUDI, N. M. Comparison between biodentine and formocresol for pulpotomy of primary teeth: A randomized clinical trial. **Quintessence Int.**, v. 47, n. 7, p. 571-580. 2016.
- EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. **J. Invest. Dermatol.**, v. 127, n. 3, p. 514-525, 2007.
- ERDEM, A. P. et al. Success rates of mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol pulpotomies: a 24-month study. **Pediatr. Dent.**, v. 33, n. 2, p. 165-170, 2011.
- FARSI, N. et al. Success of mineral trioxide aggregate in pulpotomized primary molars. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 29, n. 4, p. 307-311, 2005.
- FEI, A. L.; UDIN, R. D.; JOHNSON, R. A clinical study of ferric sulfate as a pulpotomy agent in primary teeth. **Pediatr. Dent.**, v. 13, n. 6, p. 327-332, 1991.
- FELMAN, D.; PARASHOS, P. Coronal tooth discoloration and white mineral trioxide aggregate. **J. Endod.**, v. 39, n. 4, p. 484-487. 2013.

FERRACANE, J. L.; COOPER, P. R.; SMITH, A. J. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? **Odontology**., v. 98, n. 1, p. 2-14, Feb. 2010.

FONSECA, T. S. et al. In vivo evaluation of the inflammatory response and IL-6 immunoexpression promoted by Biodentine and MTA Angelus. **Int Endod J.**, v. 49, n. 2, p. 145-153, 2016.

FORMOSA, L. M. et al. The microstructure and surface morphology of radiopaque tricalcium silicate cement exposed to different curing conditions. **Dent Mater.**,v. 28, n. 5, p. 584-595. 2012.

FRANZ, S. et al. Immune responses to implants – a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials.**, v. 32 n. 28, p. 6692 -709, 2011.

FRENKEL, G.; KAUFMAN, A.; ASHKENAZI, M. Clinical and radiographic outcomes of pulpotomized primary molars treated with white or gray mineral trioxide aggregate and ferric sulfate--long-term follow-up. **J. Clin. Pediatr. Dent.**, v. 37, n. 2, p. 137-141, 2012.

FUKS, A. B. et al. Ferric sulfate versus dilute formocresol in pulpotomized primary molars: long-term follow-up. **Pediatr. Dent.**, v. 19, n. 5, p. 327-330, 1997.

FUKS, A. B. Current concepts in vital primary pulp therapy. **Eur. J. Paediatr. Dent.**, v. 3, n. 3, p. 115-120, 2002.

FUKS, A. B.; PAPAGIANNIOLIS, L. Pulpotomy in primary teeth: review of the literature according to standardized criteria. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.**, v. 7, n. 2, p. 64-71, 2006.

FUKS, A. B. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. **Pediatr. Dent.**, v. 30, n. 3, p. 211-219, 2008.

FUNTEAS, U. R.; WALLACE, J. A.; FOCHTMAN, E. W. A comparative analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. **Aust Endod J.**, v. 29, n. 1, p. 43-44, 2003.

GEMMELL, E.; SEYMOUR, G. J. Interleukin 1, interleukin 6 and transforming growth factor-production by human gingival mononuclear cells following stimulation with *Prphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. **J Periodontal Res.**, v. 28, n. 2, p.122-129, 1993.

GODHI, B.; SOOD, P. B.; SHARMA, A. Effects of mineral trioxide aggregate and formocresol on vital pulp after pulpotomy of primary molars: An in vivo study. **Comtemp. Clin. Dent.**, v. 2, n. 4, p. 296-301,2011.

GOLDBERG, M. et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. **Pharmacol Res.**, v. 58; n. 2; p. 137 - 147, 2008.

GOMES-FILHO, J. E. et al. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. **J. Endod.**, v. 35, n. 11, p. 1577-1579, 2009.

GOYAL, P. et al. CLINICAL EFFICACY OF VARIOUS MEDICAMENTS USED FOR PULPOTOMY IN PRIMARY MOLARS – A COMPARATIVE STUDY. **Int J Res Dev Pharm L Sci**; v. 5, n. 3, p. 2107-2116, 2016.

GRECH, L.; MALLIA, B.; CAMILLERI, J. Characterization of set intermediate restorative material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. **Int Endod J.**, v. 46, n. 7, p. 632-641, 2013.

HANNAS, A. R. et al. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta. Odontol.**, v. 65, n. 1, p. 1-13, 2007.

HAGHGOO, R.; AHMADVAND, M. Evaluation of pulpal response of deciduous teeth after direct pulp capping with bioactive glass and mineral trioxide aggregate. **Contemp. Clin. Dent.**, v. 7, n. 3, p. 332-335, 2016.

HRABÁK, A.; BAJOR, T.; CSUKA, I. The effect of various inflammatory agents on the phagocytosis and cytokine profile of mouse and rat macrophages. **Inflamm Res.**, v. 57, n. 2, p. 75-83, 2008.

HAVALE, R. et al. Clinical and radiographic evaluation of pulpotomies in primary molars with formocresol, glutaraldehyde and ferric sulphate. **Oral Health Dent Manag.**, v. 12, n. 1, p. 24-31, 2013.

HELLE, M. et al. Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities. **Eur. J. Immunol.**, v. 18, n. 6, p. 957-959, 1988.

HOLAN, G.; EIDELMAN, E.; FUKS, A. B. Long-term evaluation of pulpotomy in primary molars using mineral trioxide aggregate or formocresol. **Pediatr. Dent.**, v. 27, n. 2, p. 129-135, 2005.

HOLAN, G.; FUKS, A. B.; KELTZ, N. Success rate of formocresol pulpotomy in primary molars restored with stainless steel crow vs amalgam. **Pediatr. Dent.**, v. 24, n. 3, p. 212-216, 2002.

HOLLAND, R. et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 25, n. 3, p. 161-166, 1999.

HUI, T. et al. Epigenetic regulation in dental pulp inflammation. **Oral Dis.**, v. 23, n. 1, p. 22-28, 2017.

IBRICEVIC, H.; AL-JAME, Q. Ferric sulphate and formocresol in pulpotomy of primary molars: long term follow-up study. **Eur. J. Paediatr. Dent.**, v. 4, n. 1, p. 28-32, 2003.

IZUMI, T. et al. Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. **Arch. Oral Biol.**, v. 40, n. 7, p. 609-614, 1995.

JUNQUEIRA, M. A. **Estudo da Resposta Pulpar Após o Uso de Diferentes Materiais Cappedores em Pulpotomias**. 2015. 98f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2015.

KARABUCAK, B. et al. Vital pulp therapy with mineral trioxide aggregate. **Dent. Traumatol.**, v. 21, n. 4, p. 240-243, 2005.

KIM, J. et al. Evaluation of reparative dentin formation of ProRoot MTA, Biodentine and BioAggregate using micro-CT and immunohistochemistry. **Restor Dent Endod.**, v. 41, n. 1, p. 29-36, 2016.

KOH, E. T. et al. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. **J. Biomed. Mater Res.**, v. 37, n. 3, p. 432-439, 1997.

KOMABAYASHI, T.; SPANGBERG, L. S. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyzer. **J Endod.**, v. 34, n. 1, p. 94-98, 2008.

KRAMER, P. R. et al. Capping a pulpotomy with calcium aluminosilicate cement: comparison to mineral trioxide aggregates. **J. Endod.**, v. 40, n. 9, p. 1429-1434, Sep. 2014.

LAURENT, P.; CAMPS, J.; ABOUT, I. Biodentine(TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. **Int. Endod. J.**, v. 45, n. 5, p. 438-448, 2012.

LEE, H. et al. Comparative Study of Pulpal Responses to Pulpotomy with ProRoot MTA, RetroMTA, and TheraCal in Dogs' Teeth. **J Endod.**, v. 41, n. 8, p. 1317-1324. 2015.

LEMON, R. R.; STEELE, P. J.; JEANSONNE, B. G. Ferric sulfate hemostasis: effect on osseous wound healing. Left in situ for maximum exposure. **J. Endod.**, v. 19, n. 4, p. 170-173, 1993.

LIMA, R. V. et al. Pulp repair after pulpotomy using different pulp capping agents: a comparative histologic analysis. **Pediatr. Dent.**, v. 33, n. 1, p. 14-18, 2011.

LIN, P. Y. et al. Primary molar pulpotomy: a systematic review and network meta-analysis. **J. Dent.**, v. 42, n. 9, p. 1060-1077, 2014.

MALEKAFZALI, B.; SHEKARCHI, F.; ASGARY, S. Treatment outcomes of pulpotomy in primary molars using two endodontic biomaterials. A 2-year randomised clinical trial. **Eur. J. Paediatr. Dent.**, v. 12, n. 3, p. 189-193, 2011.

MARCIANO, M. A.; DUARTE, M. A.; CAMILLERI, J. Dental discoloration caused by bismuth oxide in MTA in the presence of sodium hypochlorite. **Clin Oral Investig.**, v.

19, n. 9, p. 2201-2209, 2015.

MARKOVIC, D.; ZIVOJINOVIC, V.; VUCETIC, M. Evaluation of three pulpotomy medicaments in primary teeth. **Eur. J. Paediatr. Dent.**, v. 6, n. 3, p. 133-138, 2005.

MAROTO, M. et al. Dentin bridge formation after mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomies in primary teeth. **Am. J. Dent.**, v. 18, n. 3, p. 151-154, 2005.

MASSI, S. et al. pH, calcium ion release and setting time of an experimental MTA-based root canal sealer. **Journal of Endodontics**. v. 37, n. 6, p. 844-846, 2011.

MELKER, H. E. et al. Antimicrobial efficacy of medicated root canal filling materials. **J Endod.** v. 32, n. 2, p. 148-151, 2006.

MENEZES, R. et al. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and white portland cements as wound dressings. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 98, n. 3, p. 376-379, 2004.

MORETTI, A. B. S. et al. The effectiveness of MTA, calcium hydroxide and formocresol for pulpotomies in primary teeth. **Int. Endod. J.**, v. 41, n. 7, p. 547-555, 2008.

MURRAY, P. E.; GARCÍA GODOY, C.; GARCÍA GODOY, F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 12, n. 3, p. 258-266, 2007.

NEAMATOLLAHI, H.; TAJIK, A. Comparison of clinical and radiographic success rates of pulpotomy in primary molars using Formocresol, Ferric Sulfate and Mineral Trioxide Aggregate (MTA). **J. Dentistry**, v. 3, n. 1, p. 6-14, 2006.

LOURENÇO-NETO, N. et. al. Immunolocalization of dentin matrix protein-1 in human primary teeth treated with different pulp capping materials. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 104, n. 1, p. 165-169. 2016.

NIBALI, L. et al. Interleukin-6 in oral diseases: a review. **Oral Dis.**, v. 18, n. 3, p. 236-246, 2012.

NIRANJANI, K. et al. Clinical evaluation of success of primary teeth pulpotomy using mineral trioxide aggregate(®), laser and biodentine(TM)- an in vivo study. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 9, n. 4, p. 35-37, 2015.

NOSRAT, A.; PEIMANI, A.; ASGARY, S. A preliminary report on histological outcome of pulpotomy with endodontic biomaterials vs calcium hydroxide. **Restor. Dent. Endod.**, v. 38, n. 4, p. 227-233, 2013.

ODABAS, M. E. et al. A new haemostatic agent's effect on the success of calcium hydroxide pulpotomy in primary molars. **Pediatr. Dent.**, v. 33, n. 7, p. 529-534, 2011.

ODABAS, M. E. et al. Clinical and radiographic success rates of mineral trioxide aggregate and ferric sulphate pulpotomies performed by dental students. **Eur. J.**

Paediatr. Dent., v. 13, n. 2, p. 118-122, 2012.

OLATOSI, O. O.; SOTE, E. O.; ORENUGA O. O. Effect of mineral trioxide aggregate and formocresol pulpotomy on vital primary teeth: a clinical and radiographic study. **Niger J Clin Pract.**, v. 18. n. 2, p. 292-296. 2015.

OLGART, L.; EDWAL, L.; GRAZELIUS, B. Involvement of afferent nerves in pulpal blood-flow reactions in response to clinical and experimental procedures in the cat. **Arhc. Oral Biol.**, v. 6, n. 8, p. 575-581,1991.

OLIVEIRA, T. M. et al. Clinical, radiographic and histologic analysis of the effects of pulp capping materials used in pulpotomies of human primary teeth. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.**, v. 14, n. 2, p. 65-71, 2013.

OLIVEIRA, P. A. et al.,Cimetidine reduces interleukin-6, matrix metalloproteinases-1 and -9 immunoexpression in the gingival mucosa of rat molars with induced periodontaldisease. **J Periodontol.**; v. 88, n. 1, p. 100-111, 2017.

PAPAGIANNOULIS, L. Clinical studies on ferric sulphate as a pulpotomy medicament in primary teeth. **Eur. J. Paediatr. Dent.**, v. 3, n. 3, p. 126-132, 2002.

PARANJPE, A. et al. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. **J. Endod.**, v. 37, n. 12, p. 1691-1695, 2011.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. **J. Endod.**, v. 36, n. 1, p. 16-27, 2010.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. **J. Endod.**, v. 36, v. 3, p. 400-413. 2010.

PARISAY, I., GHODDUSI, J., FORGHANI, M. A Review on Vital Pulp Therapy in Primary Teeth. **Iran Endod J.**, v. 10, n. 1, p. 6-15. 2015.

PARK, S. H. et al. Inflammation of the Dental Pulp. **Mediat Inflamm.** v. 2015, p. 1-2, 2015.

PENG, L. et al. Evaluation of formocresol versus ferric sulphate primary molar pulpotomy: a systematic review and meta-analysis. **Int. Endod. J.**, v. 40, n. 10, p. 751-757, 2007.

PRATI, C.; GANDOLFI, M. G. Calcium silicate bioactive cements: Biological perspectives and clinical applications. **Dent Mater.**, v. 31, n. 4, p. 351-370,2015.

RANLY, D. M. Pulpotomy therapy in primary teeth: new modalities for old rationales. **Pediatr Dent**; v. 16, n. 6, p. 403-9, 1994.

RANLY, D. M.; GARCIA-GODOY, F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. **J Dent.**, v. 28, n. 3, 153-161, 2000.

REYES-CARMONA, J. F. et al. Host-mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. **J. Endod.**, v. 36, n. 8, p. 1347-1353, 2010.

RINCON M. Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. **Trends Immunol.**, v. 33, n. 11, p. 571-577, 2012.

RUBY, J. D. et al. A randomized study of sodium hypochlorite versus formocresol pulpotomy in primary molar teeth. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 23, n. 2, p. 145-152, 2013.

RUIFROK, A. C.; JOHNSTON, D. A. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. **Anal Quant Cytol Histol.**, v. 23, n. 4, p. 291-299, 2001.

SAKAI, V. T. et al. Pulpotomy of human primary molars with MTA and Portland cement: a randomised controlled trial. **Brit. Dent. J.**, v. 207, n. 3, p. 128-129, 2009.

SALAKO, N. et al. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate and formocresol as pulpotomy agents in rat molars. **Dent. Traumatol.**, v. 19, n. 6, p. 314-320, 2003.

SARAIVA, J. A. et al. Reduced interleukin-6 immunoexpression and birefringent collagen formation indicate that MTA Plus and MTA Fillapex are biocompatible. **Biomed Mater.** 2017.

SARKAR, N. K. et al. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. **J. Endod.**, v. 31, n. 2, p. 97-100, 2005.

SCARPARO, R. K. et al. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. **J Endod**; v. 37, n. 8, p. 1069-73, 2011.

SHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta.**, v. 813, n. 5, p. 878-888, 2011.

SHAHI, S. et al. Effect of mineral trioxide aggregates and Portland cements on inflammatory cells. **J. Endod.**, v. 36, n. 5, p. 899-903, 2010.

SHAYEGAN, A.; PETEIN, M., ABBEELE, A. V. Beta-tricalcium phosphate, white mineral trioxide aggregate, white Portland cement, ferric sulfate, and formocresol used as pulpotomy agents in primary pig teeth. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 105, n. 4, p. 536-542, 2008.

SILVA, A. C. O. et al. Interleukin-1 beta and interleukin-8 in healthy and inflamed dental pulps. **J. Appl. Oral Sci.**, v.17, n.5, p.527-532, 2009.

SILVA, G. F. et al. Microparticulated and nanoparticulated zirconium oxide added to calcium silicate cement: evaluation of physicochemical and biological properties. **J Biomed Mater Res A.**, v. 102, n. 12, p. 4336-4345, 2015.

SIMON, S. R. et al. Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic. **Adv. Dent.**

Res., v. 23, n. 3, p. 340-345, 2011.

SITARU, A.; HANTOIU, T.; MONEA, M. Tissue reactions induced by dental pulp capping materials. **European Scientific Journal**. v. 10, v. 9. p. 95-104, 2014.

SMITH, N. L.; SEALE, N. S.; NUNN, M. E. Ferric sulfate pulpotomy in primary molars: a retrospective study. **Pediatr. Dent.**, v. 22, n. 3, p. 192-199, 2000.

SONI, H. K. Biodentine Pulpotomy in Mature Permanent Molar: A Case Report. **J Clin Diagn Res.**, v. 10, n. 7, p. 9-11. 2016.

SONMEZ, D.; SARI, S.; CETINBAS, T. A Comparison of four pulpotomy techniques in primary molars: a long-term follow-up. **J. Endod.**, v. 34, n. 8, p. 950-955, 2008.

SRINIVASAN, V.; PATCHETT, C. L.; WATERHOUSE, P. J. Is there life after Buckley's formocresol? Part I – a narrative review of alternative interventions and materials. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 16, n. 2, p. 117-127, 2006.

SRINIVASAN, D.; JAYANTHI, M. Comparative evaluation of formocresol and mineral trioxide aggregate as pulpotomy agents in deciduous teeth. **Indian. J. Dent. Res.**, v. 22, n. 3; p. 385-390, 2011.

STERIN-BORDA, L. et al. Differential signalling pathways involved in cholinceptor-dependent stimulation of nitric oxide isoforms in dental pulp. **Int. Endod. J.**, v. 40, n. 7, p. 544-552, 2007.

STRANGE, D. M. et al. Outcome of formocresol/ZOE sub- base pulpotomies utilizing alternative radiographic success criteria. **Pediatr. Dent.**, v. 23, n. 4, p. 331-336, 2001.

STRINGHINI JUNIOR, E.; VITCEL, M. E.; OLIVEIRA, L. B. Evidence of pulpotomy in primary teeth comparing MTA, calcium hydroxide, ferric sulphate, and electrosurgery with formocresol. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.**, v. 16, n. 4, p. 303-312, 2015.

TORABINEJAD, M., et al. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **J. Endod.**, v. 21, n. 7, p. 349-353, 1995.

TORABINEJAD, M.; CHIVIAN, N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **J. Endod.**, v. 25, n. 3, p. 197-205, 1999.

TRAIRATVORAKUL, C.; KOOTHIRATRAKARN, A. Calcium hydroxide partial pulpotomy is an alternative to formocresol pulpotomy based on a 3-year randomized trial. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 22, n. 5, p. 382-389, 2012.

TRAN, X. V. et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. **J Dent Res**; v. 91, n.12, p. 1166-71, 2012.

TROPE, M. Regenerative Potential of Dental Pulp. **J Endod.**, v. 34, n. 7, p. S13 – 17,

2008.

TROWBRIDGE, H. Histology of pulpal inflammation. In: Hargreaves K, Goodis H, editors. Seltzer and Bender's Dental Pulp. Carol Stream: **Quintessence**, p. 227-245, 2002.

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

WALKER, L. A. et al. Current Trends in Pulp Therapy: A Survey Analyzing Pulpotomy Techniques Taught in Pediatric Dental Residency Programs. **J. Dent. Child. (Chic.)**, v. 80, n. 1, p. 31-35, 2013.

WATERHOUSE, P. J.; NUNN, J. H.; WHITWORTH, J. M. An investigation of the relative efficacy of Buckley and calcium hydroxide in primary molar vital pulp therapy. **Brit. Dent. J.**, v. 188, n. 1, p. 32-36, 2000.

YASUDA, Y. et al. Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells. **J. Oral Rehabil.**, v. 35, n. 12, p. 940-946, 2008.

YILDIRIM, C. et al. Clinical and Radiographic Evaluation of the Effectiveness of Formocresol, Mineral Trioxide Aggregate, Portland Cement, and Enamel Matrix Derivative in Primary Teeth Pulpotomies: A Two Year Follow-Up. **J Clin Pediatr Dent.**, v. 40. n. 1, p. 14-20. 2016.

YILDIZ, E.; TOSUN, G. Evaluation of formocresol, calcium hydroxide, ferric sulfate, and MTA primary molar pulpotomies. **Eur. J. Dent.**, v. 8, n. 2, p. 234-240, 2014.

ZANINI, M. et al. Biodentine induces immortalized murine pulp cell differentiation into odontoblast-like cells and stimulates biomineralization. **J. Endod.**, v. 38, n. 9, p. 1220-1226, Sep. 2012.

ZARZAR, P. A. Formocresol mutagenicity following primary tooth pulp therapy: an in vivo study. **J. Dent.**, v. 31, n. 7, p. 479-485, Sep. 2003.

ANEXO A – Comitê de Ética

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas/MG - CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 - Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 09 de junho de 2014.

Profª. Vivien Thiemy Sakai

Prezada Professora,

O projeto sob sua coordenação, registro nº 570/2014, intitulado "Estudo histológico e imunoistoquímico da resposta pulpar inicial após o uso de diferentes materiais capeadores em pulpotomias em molares de ratos Wistar" está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovanni de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA - Unifal-MG