

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LEOPOLDO COSME SILVA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL E MINERALIZAÇÃO DE DOIS
MATERIAIS EXPERIMENTAIS A BASE DE MTA PARA ENDODONTIA EM
DENTES DECÍDUOS**

Alfenas/MG

2017

LEOPOLDO COSME SILVA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TECIDUAL E MINERALIZAÇÃO DE DOIS
MATERIAIS EXPERIMENTAIS A BASE DE MTA PARA ENDODONTIA EM
DENTES DECÍDUOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Orientador: Profa. Dra. Naiana Viana Viola Nícoli

Coorientador: Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho

ALFENAS/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Silva, Leopoldo Cosme.

Avaliação da resposta tecidual e mineralização de dois materiais experimentais a base de MTA para endodontia em dentes decíduos. / Leopoldo Cosme Silva. -- Alfenas/MG, 2017.

69 f.

Orientadora: Naiana Viana Viola Nícoli .

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) -
Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Inflamação. 2. Pulpotomia. 3. Obturação do Canal Radicular.
4. Macrófagos. 5. Dente Decíduo. 6. Endodontia. I. Nícoli, Naiana
Viana Viola. II. Título.

CDD-617.6



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 13113-000



LEOPOLDO COSME SILVA

"Avaliação da resposta tecidual e mineralização de dois materiais experimentais a base de MTA para endodontia em dentes deciduos"

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.

Aprovado em: 13/02/2017

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

Assinatura:

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

Assinatura:

Profa. Dra. Maristela Soares Swerts Pereira
Instituição: UNIFENAS

Assinatura:

AGRADECIMENTOS

À minha família

Aos meus pais **Lucélia e Leonardo**, por sempre me apoiarem em minhas decisões, além de serem meus exemplos de humildade e honestidade. As minhas queridas irmãs **Larissa e Luciana** que sempre estiveram presente em toda a minha caminhada e vibrando com cada conquista. Agradeço pela compreensão e amizade. Ao **Cláudio** pelo companheirismo, incentivo e ajuda o que me permitiu ir além dos “muros da universidade”; Aos meus cunhados **Anderson e Erivelton** que sempre estão na torcida. Á **Helena**, minha sobrinha, que mesmo tão pequena já é capaz de nos alegrar e encher a casa de felicidade e união.

A Deus e aos anjos da guarda

Pela proteção e por ser meu guia durante a execução deste trabalho, onde nos momentos difíceis, de insegurança, incertezas e angustias, soube me acalantar e me preparar para as próximas etapas.

Ao **Programa Nacional de Cooperação Acadêmica - Procad 2013- CAPES** pelo financiamento deste trabalho. Obrigado pela possibilidade da parceria entre UNESP-FOA e UNIFAL-MG o qual foi essencial para a realização deste estudo.

A UNIFAL-MG;

A **Prof^a. Dr^a. Vivien Thiemy Sakai**, por inicialmente aceitar ser minha orientadora e depois por me receber de forma tão generosa como um membro de sua linha de pesquisa. Obrigado por estar sempre ao lado deste trabalho, por ter me dado oportunidades para crescer. Sua participação em minha formação foi essencial, pois seu profissionalismo, ética, competência e dedicação são admiráveis e um caminho a ser seguido. Sempre irei me lembrar com muito carinho dos trabalhos que me proporcionou e dos artigos que participei, os quais me fizeram estudar e aprender. Sinto-me muito honrado em ter passado esses dois anos ao seu lado. Obrigado!!!

A **Profª. Drª. Naiana Viana Viola Nícoli**, minha orientadora, agradeço pelo apoio e atenção. Agradeço pelas vezes que dedicou o seu tempo me ajudando e orientando, mesmo durante sua gravidez e licença maternidade. Obrigada por me incentivar e me ajudar a crescer sempre. Obrigada por seus conselhos, ensinamentos que tanto me auxiliaram na prática da clínica endodôntica e no meio científico, o que me estimulam sempre a ir atrás do melhor. Obrigado!!!

A **Profª. Drª. Ana Betariz Moretti**, pela amizade, pelo acolhimento, pelas palavras de carinho, pelas correções de artigos aos domingos e via áudio!!! Obrigada por confiar em mim!

A pós douturanda **Nádia Marques** pelo companheirismo, amizade e por todos os conhecimentos ensinados durante os trabalhos com as SHED!!!

A **Profª. Drª. Elaine Manso de Carvalho** por fazer despertar o gosto pela endodontia, pelos ensinamentos clínicos durante o estágio docente, pela amizade e pelas boas conversas durante os intervalos.

A **Profª. Drª. Daniela Coelho de Lima** e **Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano** pela oportunidade de realizar iniciação científica, ainda na graduação, o que me despertou o interesse pela pós-graduação. Pelo incentivo com que me ajudaram a crescer nesses anos de convivência e pela disponibilidade constante em ajudar e transmitir o conhecimento. Ambos são exemplos de dedicação ao próximo e dedicação a docência. Obrigado!!!

Ao **Corpo docente do Programa de Pós Graduação em ciências Odontológicas da UNIFAL-MG** e ao **Corpo docente do curso de Odontologia da UNIFAL-MG** agradeço por tudo que me ensinaram e pelas oportunidades oferecidas durante esses anos.

Aos **Amigos de mestrado da UNIFAL**, por dividirem comigo esta etapa em especial a amiga **Marília Beatriz** pela amizade, pelas duplas formadas e pelo companheirismo. A convivência com você me engrandeceu e tornou o aprendizado

mais prazeroso. A aluna de iniciação científica **Nathalia Alvarez** pela dedicação e colaboração com a pesquisa de mestrado. Torcerei sempre pelo seu sucesso, pois é dedicada e atenciosa.

Aos **Funcionários da Odontopediatria (Sônia, Luzia, Paloma, Mônica, Patrícia) e da Endodontia (Dona Luzia, Dona Ermelinda)** obrigado pela convivência agradável e por entender os atendimentos a pacientes fora dos horários da clínica. Ao **Biotério** da UNIFAL-MG e seus funcionários, pelo auxílio e acolhimento, por ceder seus equipamentos e dependências para a realização deste trabalho.

Aos **Funcionários da pós-graduação da UNIFAL-MG (Fabiana e Jane)**, pelo auxílio nos problemas e assuntos burocráticos. À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste estudo. Obrigado!!!

A todas as pessoas que direta ou indiretamente e de maneira não menos importante colaboraram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

a UNESP-FOA;

Ao **meu co-orientador Prof Dr. João Eduardo Gomes Filho**, agradeço pela dedicação, apoio e atenção, que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Agradeço pelas vezes que dedicou o seu tempo me ajudando e orientando. Obrigado pelo incentivo a pesquisa e por ser um exemplo de pesquisador a ser seguido. Obrigado por me receber no Departamento de Endodontia da UNESP-Campus Araçatuba e por me proporcionar a convivência com pessoas que buscam a ciência de forma responsável. Obrigado!!!

Ao **Prof Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra**, pela recepção, pelos ensinamentos e pela prontidão em ensinar. Foi um grande prazer poder sanar as dúvidas com o senhor.

Ao **Prof Dr. Edilson Ervolino**, por me receber no Departamento de Histologia de forma tão receptiva e pelo auxílio no processamento da imunohistoquímica e também por permitir a utilização dos laboratórios do departamento.

Ao **Prof Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem** por permitir a parceria entre UNIFAL e UNESP, o que foi essencial para o andamento deste trabalho.

Aos **Amigos do mestrado e doutorado da UNESP**, pela força, por me acolherem de forma tão amigável no departamento o que me fez sentir estar “em casa” durante todos os períodos que aqui estive... De fato, se isso fosse diferente, a caminhada seria um pouco mais árdua. O espírito de Equipe do departamento realmente é ímpar, todos sempre dispostos a ajudar o que me fez aprender muito. Em especial a **Francine Benetti**, obrigado por estar ao meu lado durante todo o processo laboratorial, pelas palavras de incentivo. Sua dedicação à pós-graduação é admirável e exemplar!!! Obrigado Fran!!! Ao **Renan** e a **Marjo** pela ajuda durante o processamento imunohistoquímico, o que deixou o trabalho menos cansativo e mais divertido. A **India** e a **Chris** pela disposição em ajudar nas análises das lâminas!!!

Aos **Funcionários do Departamento de Endodontia da UNESP (Elaine e Peterson)**, obrigado pela recepção, por toda a ajuda no período que estive aqui, em especial a **Nelcy**, que não mediu esforços para que este trabalho fosse concluído, obrigado também pelas palavras de carinho e atenção nos momentos difíceis.

A **Empresa Angelus** por fornecer os materiais estudados nesta pesquisa.

***“Você não sabe o quanto eu caminhei
Pra chegar até aqui
Percorri milhas e milhas antes de dormir
Eu não cochilei
Os mais belos montes escalei
Nas noites escuras de frio chorei”
-Cidade Negra, 2002***

RESUMO

O desenvolvimento de materiais biocompatíveis para indicação na terapia endodôntica de dentes decíduos são de fundamental importância. Modificações têm sido propostas ao trióxido agregado mineral (MTA) para obtenção de um material com melhores propriedades para utilização em pulpotomia de dentes decíduos (MEPulpo-MTA) e um material para ser utilizado para obturação dos canais radiculares da dentição decídua (MEPulpect-MTA). O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento biológico e a deposição de estruturas mineralizadas desses materiais e compará-los ao MTA. Foram utilizados 30 ratos machos, os quais foram divididos em 4 grupos: 1: MEPulpo-MTA - Angelus®; 2: MEPulpect-MTA - Angelus®; 3: MTA convencional-Angelus®; 4: Controle – tubo vazio. Cada animal recebeu 4 implantes no subcutâneo, sendo 3 tubos com diferentes materiais e 1 tubo vazio (controle). Decorrido os períodos de 7, 15, 30, 60 e 90 dias os animais foram eutanasiados e processados para inclusão em historesina. Os cortes obtidos dos implantes no subcutâneo foram corados em hematoxilina e eosina para análise morfológica e morfométrica das células inflamatórias, e submetidos ao método de Von Kossa e Luz Polarizada para identificação de estrutura mineralizada. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro–Wilk e quando passaram no teste de normalidade foi realizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey e quando não passaram pela normalidade foi realizado Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Na contagem de células inflamatórias aos 7 e 15 houve diferença estatisticamente significativa entre MEPulpo-MTA e MTA, onde o infiltrado inflamatório foi superior para MEPulpo-MTA e aos 30, 60 e 90 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p < 0,05$). Em todos os períodos houve formação de estrutura mineralizada para MTA e MEPulpo-MTA detectados pelo método Von Kossa, o qual apresentou diferença estatisticamente significativa entre os materiais somente aos 90 dias ($p < 0,05$), onde maior área de marcação para Von Kossa foi para MEPulpo-MTA e sob luz polarizada não houve diferença estatisticamente significativa entre os materiais nos períodos avaliados ($p < 0,05$). Na contagem células inflamatórias para

MEPulpect-MTA houve diferença estatisticamente significativa comparado com o MTA, onde o infiltrado inflamatório foi superior no MEPulpect-MTA em todos os períodos analisados ($p < 0,05$). Marcação de Von Kossa e estruturas birrefringentes a Luz Polarizada foram positivas em todos os materiais testados e em todos os tempos analisados. Pode-se concluir que o MEPulpo-MTA apresentou características de biocompatibilidade e depositou estruturas mineralizadas semelhantes aos MTA. O MEPulpect-MTA mostrou áreas de mineralização semelhantes ao MTA, porém não foi bem tolerado pelo tecido.

Palavras chave: Inflamação. Pulpotomia. Obturação do canal radicular. Dente Decíduo. Endodontia.

ABSTRACT

The development of biocompatible materials for indication in endodontic therapy of primary teeth is of fundamental importance. Modifications have been proposed to mineral aggregate trioxide (MTA) to obtain a material with better properties for use in pulpotomy of deciduous teeth (MEPulpo-MTA) and a material to be used to obturate root canals of the deciduous dentition (MEPulpect-MTA). The objective of this study was to evaluate the biological behavior and the deposition of mineralized structures of these materials and to compare them to the MTA. Thirty male rats were used, which were divided into 4 groups: 1: MEPulpo-MTA-Angelus®; 2: MEPulpect-MTA-Angelus®; 3: Conventional MTA-Angelus®; 4: Control - empty tube. Each animal received 4 implants in the subcutaneous, 3 tubes with different materials and 1 empty tube (control). After the periods of 7, 15, 30, 60 and 90 days the animals were euthanized and processed for inclusion in historesin. The cuts obtained from the subcutaneous implants were stained with hematoxylin and eosin for morphological and morphometric analysis of the inflammatory cells, and submitted to Von Kossa and Polarized Light for identification of mineralized structure. The results were submitted to the normality test of Shapiro-Wilk and when they passed the normality test the ANOVA test was performed, followed by the Tukey test and when they did not go through normality, Kruskal-Wallis followed the Dunn's test. Values of $p < 0.05$ were considered significant. In the count of inflammatory cells at 7 and 15, there was a statistically significant difference between MEPulpo-MTA and MTA, where the inflammatory infiltrate was higher for MEPulpo-MTA and at 30, 60 and 90 days there was no statistically significant difference between them ($p < 0, 05$). In all periods, there was a mineralized structure formation for MTA and MEPulpo-MTA detected by the Von Kossa method, which presented a statistically significant difference between the materials only at 90 days (Kossa marking and birefringent structures at Polarized Light were positive in all materials tested and at all times analyzed. It can be concluded that MEPulpo-MTA presented characteristics of biocompatibility and deposited mineralized structures similar to MTA. MEPulpect-MTA showed areas of mineralization similar to MTA, but not well tolerated by the tissue.

Key- words: Inflammation. Pulpotomy. Root canal filling. Tooth deciduos.
Endodontics.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Número de células inflamatórias (média-desvio padrão/mediana mínimo e máximo), espessura da cápsula fibrosa, capacidade de biomineralização por marcação de von Kossa (VK) (área μm^2) e estruturas birrefringentes a luz polarizada (POL) (área μm^2).....	32
TABELA 1-	Número de células inflamatórias (média-desvio padrão/mediana mínimo e máximo), espessura da cápsula fibrosa, capacidade de biomineralização pela marcação de Von Kossa (VK) e estruturas birrefringentes a luz polarizada (POL).....	41

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1-	A: Tubo vazio medindo 10 mm de comprimento x 1,6 mm de diâmetro; B: Tubo preenchido com o material.....	25
FIGURA 2-	Divulsão dos tecidos para inserção dos tubo e inserção do tubo com ajuda de pinça clínica.....	26
FIGURA 3-	Distribuição dos materiais no dorso dos animais.....	26
FIGURA 4-	A: Tubos aderidos ao subcutâneo dos animais; B: Tubo removido com tecido circundante.....	28
FIGURA 5-	Resposta inflamatória ao Grupo Controle (tubos vazios) aos 7 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 90 (E) dias; MTA Branco aos 7 (F), 15 (G), 30 (H) ,60 (I) e 90 (J) dias e material experimental a base de MTA para pulpotomia (MEPulpo-MTA) aos 7 (K), 15 (L), 30 (M) ,60 (N) e 90 (O) dias. Coloração com hematoxilina-eosina (10x).....	33
FIGURA 6-	Mineralização em reposta ao Grupo Controle (tubos vazios) aos 7 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 90 (E) dias; MTA Branco aos 7 (F), 15 (G), 30 (H) ,60 (I) e 90 (J) dias e material experimental a base de MTA para pulpotomia (MEPulpo-MTA) aos 7 (K), 15 (L), 30 (M) ,60 (N) e 90 (O) dias. Áreas pretas representam mineralização a partir do método de Von Kossa (10x).....	34
FIGURA 7-	Mineralização em resposta ao Grupo Controle (tubos vazios) aos 7 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 90 (E) dias; MTA Branco aos 7 (F), 15 (G), 30 (H) ,60 (I) e 90 (J) dias e material experimental a base de MTA para pulpotomia (MEPulpo-MTA) aos 7 (K), 15 (L), 30 (M) ,60 (N) e 90 (O) dias. As estruturas no tecido birrefringentes a luz polarizada representam cristais de calcita (10x)	35

FIGURA 8-	Resposta inflamatória ao Grupo Controle (tubos vazios) aos 7 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 90 (E) dias; MTA Branco aos 7 (F), 15 (G), 30 (H) ,60 (I) e 90 (J) dias e material experimental a base de MTA para pulpectomia (MEPulpect-MTA) aos 7 (K), 15 (L), 30 (M) ,60 (N) e 90 (O) dias. Coloração com hematoxilina-eosina (10x).....	42
FIGURA 9-	Mineralização em resposta ao Grupo Controle (tubos vazios) aos 7(A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 90 (E) dias; MTA Branco aos 7 (F), 15 (G), 30 (H) ,60 (I) e 90 (J) dias e material experimental a base de MTA para pulpectomia (MEPulpect-MTA) aos 7 (K), 15 (L), 30 (M) ,60 (N) e 90 (O) dias. Áreas pretas representam mineralização a partir do método de Von Kossa (10x).....	43
FIGURA 10-	Mineralização em resposta ao Grupo Controle (tubos vazios) aos 7 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 90 (E) dias; MTA Branco aos 7 (F), 15 (G), 30 (H) ,60 (I) e 90 (J) dias e material experimental a base de MTA para pulpectomia (MEPulpect-MTA) aos 7 (K), 15 (L), 30 (M) ,60 (N) e 90 (O) As estruturas no tecido birrefringentes a luz polarizada representam cristais de calcita (10x)	44
QUADRO 1-	Composição dos materiais conforme descrito pelo fabricante.	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

FC	- Formocresol
SF	- Sulfato Férrico
MTA	- Agregado Trióxido Mineral
HC	- Hidróxido de cálcio
BD	- Biodentine
ZOE	- Óxido de zinco e eugenol
Ca²⁺	- Íon cálcio
OH⁻	- Íon hidroxila
PMCC	- Paramonoclorofenol Canforado
MEPulpo-MTA	- Material a base de MTA para pulpotomia
MEPulpect-MTA	- Material a base de MTA para obturação dos canais radiculares da dentição decídua
CO₂	- Dióxido de carbono
H&E	- Hematoxilina & Eosina
POL	- Estruturas birrefringentes de luz polarizada
pH	- Potencial hidrogeniônico
VK	- Von Kossa
µm	- Micrómetro
µm²	- Micrómetros quadrados
H&E	- Hematoxilina e eosina
SD	- Desvio padrão
Min	- Mínimo
Max	- Máximo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	PULPOTOMIA E MATERIAIS CAPEADORES.....	20
2.2	TRATAMENTO PULPAR RADICAL DE DENTES DECÍDUOS E MATERIAIS OBTURADORES.....	25
3	PROPOSIÇÃO.....	27
4	MATERIAL E MÉTODO	28
4.1	EXPERIMENTO.....	28
4.2	EUTANÁSIA.....	31
4.3	FIXAÇÃO E PREPARO PARA PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	32
4.3.1	Inclusão em glicol metacrilato (HISTORESIN-LEICA®).....	32
4.3.3	Processamento histotécnico.....	32
4.3.4	Formas de análise.....	33
5	RESULTADOS.....	35
5.1	PARTE 1- AVALIAÇÃO DO MATERIAL EXPERIMENTAL A BASE DE MTA PARA PULPOTOMIA DE DENTES DECÍDUOS.....	35
5.2	PARTE 2- AVALIAÇÃO DO MATERIAL EXPERIMENTAL A BASE DE MTA PARA OBTURAÇÃO DOS CANAIS RADICULARES DE DENTES DECÍDUOS.....	42
6	DISCUSSÃO.....	48
6.1	PARTE 1- DISCUSSÃO DO MATERIAL EXPERIMENTAL A BASE DE MTA PARA PULPOTOMIA DE DENTES DECÍDUOS.....	48
6.2	PARTE 2- DISCUSSÃO DO MATERIAL EXPERIMENTAL A BASE DE MTA PARA OBTURAÇÃO DOS CANAIS RADICULARES DE DENTES DECÍDUOS.....	50
7	CONCLUSÃO.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	69

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de materiais biocompatíveis, principalmente aqueles usados em pulpotomias e pulpectomias de dentes decíduos são de fundamental importância, pois os mesmos podem manter a integridade e funcionalidade da dentição decídua na cavidade bucal até que esses dentes esfoliem (CASTRO, 2005). Algumas exigências são necessárias para que estes materiais possam ser indicados, tais como: ter poder bacteriostático, promover vedamento das cavidades onde serão inseridos, resistir à umidade, ser radiopaco e ser biocompatível (GROSSMAN, 1982). Além disso, o material deve ser estéril, reabsorver conforme a rizólise (nos casos de materiais obturadores de dentes decíduos), ser de fácil inserção e remoção (BOGEN; KUTTLER, 2009).

Sempre que as condições clínicas (exposição pulpar por cárie, polpa resistente ao corte, sangramento vermelho vivo, hemostasia inferior a 5 minutos) e radiográficas (ausência de reabsorções e lesão periapical, reabsorção de no máximo 1/3 da raiz radicular) forem ideais, pulpotomias devem ser indicadas, pois elas permitem o crescimento radicular dos dentes decíduos (NIRANJANI et al., 2015). Após a remoção da polpa coronária inflamada um material deve ser inserido na região e materiais como formocresol (FC), sulfato férrico (SF), Agregado Trióxido Mineral (MTA), hidróxido de cálcio (HC) e Biodentine® (BD) são utilizados neste tipo de procedimento (BERGER 1965; CETINBAS, 2008; DIAS 2010; FRANSSON; WOLF; PETERSSON, 2015; JEEVANI et al., 2014; MORI et al., 2009; MULDER; THOMSON, 2003; PENG et al., 2006; RITWIK, 2013; PAWAR; KOKATE; SHAH, 2013; PENG et al., 2006; VIOLA, 2012; VINGERLING, 1986). O MTA, devido a sua biocompatibilidade, poder de vedamento e sua capacidade de induzir a formação de estrutura mineralizada na região onde é inserido, é considerado o material de escolha para este tipo de tratamento (PENG et al., 2006; THOMSON, 2003; VIOLA, 2012).

Contudo, o MTA possui algumas propriedades físico-químicas que são inferiores às ideais. O cimento resultante da mistura do pó com água destilada é difícil de ser manipulado, sua consistência granular dificulta sua inserção nas cavidades, seu tempo de trabalho é inferior a 4 min e seu tempo de presa é extenso,

o que pode favorecer sua solubilidade, desintegração ou desalojamento do material na região inserida (BORTOLUZZI et al., 2006; KOGAN et al., 2006; LEE et al., 2004; TORABINEJAD et al., 1995).

Quando ocorre uma pulpíte irreversível ou necrose pulpar o procedimento indicado é a remoção tanto da polpa coronária quanto da polpa radicular (AAPD, 2001; THOMAZ et al., 1994). Neste procedimento é realizado o preparo biomecânico através de instrumentos endodônticos, soluções irrigadoras e auxiliares para promover a limpeza e modelagem dos canais radiculares, os quais, posteriormente, devem ser preenchidos com um material que não seja tóxico aos tecidos periapicais e nem ao germe do dente permanente (LOPES, SIQUEIRA, 2004; THOMAZ, et al., 1994). Além disso, este material deve sofrer reabsorção que acompanhando o processo natural de rizólise (PRAMILA, et al., 2016). Entre os materiais mais utilizados estão pastas à base de óxido de zinco e eugenol (OZE), pastas à base de iodofórmio (Guedes Pinto) e pastas à base de hidróxido de cálcio (CERQUEIRA et al., 2008; COLL, SADRIAN, 1996). Entretanto, pastas a base de ZOE fica densas após a presa, o que pode interferir na reabsorção da pasta conforme a rizólise do dente decíduo; pastas a base de HC são solúveis podendo deixar espaços vazios dentro do canal radicular, o que prejudica o selamento do canal radicular e as pastas idofornadas, como a Guedes Pinto, podem pigmentar a coroa dentária (ANTONIAZZI et al., 2015; CERQUEIRA et al., 2008; FUKS 2002).

No intuito de melhorar as características físicas, químicas e biológicas dos materiais utilizados na terapia endodôntica da dentição decídua, novos materiais estão em desenvolvimento, como é o caso de materiais a base de MTA. Entre eles, está um material a base de MTA para pulpotomia (MEPulpo-MTA) que se apresenta na forma de pó e líquido. O pó é composto por silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, óxido de zircônia, fluoreto de cálcio, óxido de silício, óxido de ferro e o líquido: água destilada, plastificante e cloreto de cálcio. Além desse material, a Angelus® também vem estudando um material para obturação dos canais radiculares da dentição decídua (MEPulpect-MTA) que se apresenta na forma de pasta única composta por: silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, resina salicilato, pigmentação, tungstato de cálcio, óxido de silício e resina diluente Para que esses materiais possam ser utilizados, estudos sobre o comportamento biológico devem ser realizados (GANDOLFI, et al., 2008; LAO; MARINO; BARTOLD, 2006).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta sessão apresentamos a revisão da literatura

2.1 PULPOTOMIA E MATERIAIS CAPEADORES

A polpa dentária é ricamente vascularizada, innervada e possui capacidade de cura em resposta a vários estímulos, bem como à lesão local. Pulpotomia consiste na remoção da polpa coronária viva, porém inflamada devido à agressão oriunda de lesão de cárie ou devido a traumatismo com exposição pulpar (AGAMY et al., 2004; MAROTO et al., 2005; RITWIK, 2013). É um procedimento frequentemente utilizado em odontopediatria e sua indicação se dá através do diagnóstico e das condições pulpares tais como: polpa vital e polpa radicular não infectada (DE SOUZA; HOLLAND, 1974; 1975; HUTH et al., 2005; PENG et al., 2007; SAKAI et al., 2009). Além desses fatores, os aspectos macroscópicos do tecido pulpar vital devem ser: consistente ao corte e sangramento de cor vermelho vivo com hemostasia inferior a cinco minutos. (AGUILAR; LINSUWANONT, 2011). Estudos com acompanhamento em longo prazo mostram que esse procedimento, quando bem indicado e realizado de forma correta, possui cerca de 85% a 94% de sucesso (OLATOSI et al., 2015; RAJASEKHARAN et al., 2016; STRINGHINI JUNIOR et al., 2015).

É uma técnica que envolve menos tempo e custo preservando as condições pulpares radiculares, diminuindo o risco de acidentes durante o tratamento, além de ser uma técnica com maior aceitação pelo paciente em comparação com a pulpectomia (ASGARY; EGHBAL; GHODDUSI 2014). Em contrapartida, existe a possibilidade de ocorrência de reabsorções e calcificações radiculares, o que contraindicaria esta técnica (SÖNMEZ, DURUTÜRK, 2008). A literatura destaca que ao se comparar pulpotomia e tratamento radical da polpa coronária e radicular, este último remove a função proprioceptiva e sensitiva do dente, diminui sua vida útil e é uma técnica que envolve maiores custos e tempo, o que pode dificultar o tratamento (AGUILAR, LINSUWANONT, 2011; CAPLAN et al., 2005).

No passado preconizava-se o uso de materiais capeadores que promovessem a fixação dos tecidos da polpa dentária como o FC, porém mesmo tendo sido considerado o “padrão ouro” para tratamento das pulpotomias, atenção tem sido dada ao potencial carcinogênico do FC, sendo assim, a literatura enfatiza seus efeitos maléficos e conseqüentemente sua contraindicação (ANSARI; RANJPOUR 2010; HUTH et al., 2005; JUNIOR; VITCEL; OLIVEIRA 2015; KING; McWHORTER; LEWIS 1998; SEALE 2002; SONMEZ; SARI; SUBRAMANIAM et al., 2009; NIRANJANI et al., 2015;).

O material ideal para pulpotomia deve ser bactericida, ser inofensivo às células e estruturas circundantes, promover a cicatrização do tecido pulpar e formar uma tecido mineralizado na região onde é inserido (PAPAGIANNOULIS 2006; SONMEZ, SARI, CETINBAS 2008). No intuito de confirmar a formação de estrutura mineralizada induzidos por materiais utilizados em endodontia algumas técnicas têm sido aplicadas tais como: quantificação de fosfato e de cálcio, difração de raios-X, espectrometria, entre outras (BELLOWS; AUBIN; HEERSCHE 1987; GERSTENFELD et al., 1987; IWAMOTO et al., 1993; REY et al., 1995). Apesar de serem aceitáveis para verificação de formação de estrutura mineralizada, muitos pesquisadores não têm acesso aos instrumentos para sua realização. Outra técnica, relativamente simples, usada com certa frequência para avaliar a formação de estrutura mineralizada é a técnica de von Kossa, a qual avalia a precipitação de cálcio sobre material orgânico (nódulos de calcificação) (GOMES-FILHO et al., 2008; 2009; OWEN et al., 1990; UENO et al., 1992;). Alguns trabalhos avaliaram a deposição de estrutura mineralizada no subcutâneo de ratos, através da técnica de von Kossa verificando áreas de calcificação distrófica positiva (GOMES-FILHO, et al., 2008; HOLLAND, et al., 2002; MARTINS et al., 2016; TORABINEJAD et al., 1998). Outro método para avaliar a formação de estrutura mineralizada é a luz polarizada, pois ela revela partículas de carbonato de cálcio que são birrefringentes a luz polarizada demonstrando o processo de mineralização (DESAI, CHANDLER 2009; HOLLAND et al., 2002; OLDENBOURG 2013; TAGGER, TGGER, KAFIR et al., 1988;).

Houve um grande avanço científico nos materiais envolvidos nos tratamentos conservadores. O desafio para estes materiais é promover condições ideais para reparo do elemento dental (ANSARI; RANJPOUR, 2010). Dessa forma,

materiais como SF, MTA, HC e Biodentine® tem sido estudados, os quais são bons substitutos para o FC (RAJASEKHARAN et al., 2014).

O sulfato férrico é utilizado como um agente hemostático em odontologia e mostrou resultados promissores como um material capeador para pulpotomias de dentes decíduos (FEI, UDIN, JOHNSON 1991; STRINGHINI JUNIOR et al., 2015). A literatura evidencia que o sulfato férrico produz uma resposta inflamatória local e reversível nos tecidos moles da boca sem efeitos tóxicos ou nocivos (HAVALE et al., 2013). Em contato com o sangue, os íons férricos formam um complexo férrico, e a membrana deste veda mecanicamente os vasos sanguíneos cortados, proporcionando hemostasia. Além disso, um complexo de proteína aglutinada, que produz um coágulo de sangue, provoca a oclusão dos orifícios capilares. Portanto, foi proposto como um agente para pulpotomia já que o seu mecanismo de controle da hemorragia pode minimizar as possibilidades de inflamação e reabsorção interna e acredita-se que isto pode estar associado com a formação do coágulo na região (CETINBAS 2008; HAVALE et al., 2013; FEI, UDIN, JOHNSON 1991; SONMEZ, SARI,).

Em uma revisão sistemática que incluiu 11 estudos, as taxas de sucesso clínico e radiográfico de tratamentos com SF variaram de 78% a 100% e de 42% a 97%, respectivamente. A principal desvantagem do SF é que ele dificulta o desenvolvimento de uma ponte dentinária que protege a polpa radicular de uma futura infecção, inconveniente que pode ser superado por outros materiais como HC, MTA e Biodentine (DIAS 2010; PENG et al., 2007).

Desde sua introdução em 1920 por Hermann, o HC tem sido amplamente usado na terapia endodôntica de dentes permanentes e decíduos (DIAS 2010; MORI et al., 2009). O HC apresenta-se como um sal cristalino, branco e suavemente solúvel que, em solução, se dissocia em íons cálcio e íons hidroxila exibindo uma alta alcalinidade (pH 12) (NARITA et al., 2010). O HC é utilizado por suas propriedades antimicrobianas e pela sua habilidade de induzir formação de tecido duro (NARITA et al., 2010; WITHERSPOON et al., 2006). É uma substância que causa um efeito destrutivo nas membranas celulares e estruturas proteicas das bactérias, além de propriedades antiexsudativas, de dissolução tecidual, de indução do reparo pela formação de tecido duro (ESTRELA 1995; FOREMAN; BARNES 1990; NARITA et al., 2010). Existem várias teorias para a formação de tecido duro

pelo HC. Uma delas é a de que a capacidade mineralizadora do HC inclui a alta alcalinidade do material, que produz um ambiente favorável para a fosfatase alcalina, uma enzima envolvida no processo de mineralização. Esta enzima estimula a liberação dos íons fosfato, a partir dos ésteres de fosfato do organismo, que ao reagirem com os íons cálcio, se precipitam na forma de hidroxiapatita (ESTRELA 1995; FAVA; SAUNDERS 1999). Contudo, os materiais à base de HC tendem a se dissolver ao longo do tempo e deixar um espaço vazio por baixo da restauração, o que torna uma desvantagem do material (MENTE et al., 2014).

O MTA surgiu na Odontologia em 1993, desenvolvido pelo professor Mahmoud Torabinejad na Universidade de Loma Linda, nos Estados Unidos, com o objetivo de selar comunicações entre o dente e a superfície externa principalmente em perfurações radiculares patológicas ou iatrogênicas, bem como em obturações retrógradas (LEE; MONSEF; TORABINEJAD 1993; TORABINEJAD; CHIVIAN, 1999). A natureza hidrofílica das partículas do MTA permite seu uso mesmo na presença de umidade, proporcionando vedamento e adaptação marginal superiores aos demais materiais, além de possuir boa atividade antimicrobiana (AL-HEZAIMI et al., 2005; LEE et al., 1995; TORABINEJAD, WATSON, PITT FORD 1993; TORABINEJAD et al., 1995). O MTA possui pH alcalino em torno de 12,5, excelente adaptação marginal, baixa solubilidade, baixa infiltração bacteriana, resistência ao deslocamento e baixa citotoxicidade (DUARTE et al., 2003; SLUYK; MOON; HARTWELL 1998; SANTOS, et al., 2005; SIPERT, et al., 2005). É um material estéril, bioindutivo, radiopaco, não sensível à umidade e à contaminação por sangue, além de ser capaz de proporcionar reparo biológico (AL-HEZAIMI et al., 2005; LEE et al., 1995; TORABINEJAD, WATSON, PITT FORD 1993; TORABINEJAD et al., 1995).

Celik et al. (2013) compararam o uso de MTA e HC em 139 molares decíduos com indicação de pulpotomia. Após 24 meses de acompanhamento, as taxas de sucesso clínico foram de 98% para o grupo tratado com MTA e 77% para o grupo tratado com HC. Na análise radiográfica, o grupo MTA obteve sucesso também de 98% e o HC de 45%. Os autores concluíram que esses materiais apresentam tanto sucesso clínico como radiográfico, mas que o MTA possui melhores resultados quando comparado com HC.

O Biodentine® (Septodont, Sair Maur de Fossés, France) é um cimento de silicato tricálcico, que vem sendo estudado. O produto é indicado para pulpotomias,

perfurações, reabsorções, apicificação, obturações retrógradas e como material restaurador. Biodentine® é baseado em um policarboxilato modificado e pertence à mesma classe do MTA, mas com aparentes vantagens químicas, mecânicas e de manuseio. Sua forma de apresentação é em pó (cápsula) e líquido (pipeta). A parte em pó, acondicionada em cápsula, é constituída principalmente por silicato tricálcico (tornando-o similar ao MTA). Também contém pequenas proporções de silicato dicálcico, carbonato de cálcio e óxido de zircônio, usado como radiopacificador. O líquido, mantido numa pipeta, é composto de água, polímero hidrossolúvel e cloreto de cálcio, que funciona como um agente acelerador de presa da mistura. A dispensação do Biodentine® é feita através de cinco (05) gotas do líquido sobre o pó. Em seguida, a cápsula é colocada num misturador (amalgamador) durante 30 segundos. A mistura obtida após o preparo apresenta brilho e consistência similar ao cimento de fosfato, fácil manuseio, rapidez no tempo de presa (12 minutos) e alta resistência em curto prazo (CAMILLERI 2011; RAJASEKHARAN et al., 2014).

A elevada pureza dos componentes do Biodentine®, associada à maior capacidade de absorção e concentração de íons de cálcio na dentina, menor tempo de presa, resistência à força de compressão e microdureza, são algumas das vantagens ressaltadas (GRECH, MALLIA, CAMILLERI 2013; HAN, OKIJI 2013). Os estudos sobre a citotoxicidade, atividade antimicrobiana, genotoxicidade e características físicas são favoráveis o que o torna recomendável para uso clínico (GRECH, MALLIA, CAMILLERI 2013; MORI et al., 2015; PENG et al., 2011;). Também foi confirmada sua capacidade de induzir a deposição de dentina terciária reacional e reparadora, via estímulo da atividade odontoblástica, com influência positiva no reparo através da diferenciação das células pulpares e da biomineralização (HAN, OKIJI, 2013; LUO et al., 2014; NOWICKA et al., 2013).

Em um estudo em dentes de cães, De Rossi et al. (2014) avaliaram a resposta pulpar e periapical, através de exame radiográfico e análise histopatológica, após pulpotomias com BD e MTA. Pontes de tecido mineralizada foram mais evidentes, através de exame radiográfico, no grupo tratado com BD (96,8%) do que naquele tratado com MTA (72,2%). A integridade da lâmina dura, ausência de rarefações periapicais e reabsorção radicular tanto interna como externa foram observadas em ambos os grupos. Os autores concluíram que o BD apresentou compatibilidade tecidual e permitiu a formação de ponte de estrutura

mineralizada e ressaltaram que os achados para Biodentine são semelhantes aos resultados do MTA.

Analisando dados da literatura Junior et al. (2015) compararam quatro protocolos para pulpotomias: uso do MTA, HC, SF e FC. Nesta revisão sistemática foi encontrado que a taxa de sucesso quando se usa MTA em pulpotomias de dentes decíduos é em torno de 94,6%. Os achados deste estudo corroboram com os achados de Peg et al. (2006), Srinivasan e Jayanthi (2011), Celik et al. (2013).

2.2 TRATAMENTO PULPAR RADICAL DE DENTES DECÍDUOS E MATERIAIS OBTURADORES

Tratamento pulpar radical de dentes decíduos é a completa remoção da polpa coronária e radicular. Este procedimento é realizado em dentes decíduos que estejam com a polpa inflamada de forma irreversível e quando há necrose do sistema de canais radiculares (WALIA 2014). Estudos relatam altas taxas de sucesso em procedimentos envolvendo a completa remoção da polpa coronária e radicular (BARR et al. 1991; COLL et al. 1988, FLATIZ et al. 1989, ROSENDAHL, WEINERT-GRODD 1995, MORTAZAVI, MESBAHI 2004, OZALP et al. 2005, PRIMOSCH et al. 2005; TRAIRATVORAKUL, CHUNLASIKAIWAN 2008), porém tem suas controvérsias, tais como: a complexa anatomia dos canais radiculares de dentes decíduos, reabsorção radicular fisiológica que é inerente a este grupo de dente, proximidade com os dentes sucessores permanentes, diagnóstico complexo devido à imaturidade do paciente (PRAMILA et al., 2016). Além disso, os materiais de obturação de dentes decíduos precisam ser reabsorvidos conforme ocorre a rizólise da dentição decídua (FUKS et al., 2000; FUKS 2002).

Pastas à base de óxido de zinco e eugenol (ZOE) são utilizadas para obturação dos canais radiculares, as quais foram avaliadas por Coll & Sadrian (1996). Os autores relataram que após inserção no canal radicular essas pastas se comportam de forma densa e isso faz com que este material resista à reabsorção. Os autores ainda salientam seu potencial irritante aos tecidos apicais possivelmente devido ao eugenol.

Materiais que contêm iodofórmio também são utilizados na obturação do canal radicular de dentes decíduos (CERQUEIRA et al., 2008). Seu uso tem sido indicado devido a sua atividade antibacteriana e fácil reabsorção da pasta. No entanto, a rápida eliminação deste material pelo organismo deixa espaços vazios no interior do canal radicular o que pode ser um fator prejudicial ao sucesso do tratamento endodôntico, além de causar manchamento na coroa dentária (KUBOTA; GOLDEN; PENUGONDA 1992). Cerqueira et al (2008) relataram que a utilização de materiais à base de iodo, quando em contato com os tecidos vivos, pode causar efeitos tóxicos.

Pastas de HC também têm sido utilizadas como um material obturador Segundo Nurko & Garcia-Godoy (1999), Mortazavi & Mesbahi (2004) e Trairatvorakul & Chunlasikaiwan (2008) sua utilização apresenta condições favoráveis ao sucesso do tratamento, pois tem rápida reabsorção, é inofensiva para os germes dos dentes permanentes, possui radiopacidade, após sua presa não se torna densa e é facilmente inserida e removida da cavidade.

No Brasil, a pasta Guedes-Pinto foi o material mais utilizado como obturador de dentes decíduos (BERGOLI et al., 2010). Ela é uma combinação de substâncias, tais como: iodofórmio, Rifocort[®] (pomada) e Paramonoclorofenol Canforado (PMCC) (GUEDES PINTO; PAIVA; BOZZOLA 1981). É uma pasta com grande potencial antimicrobiano e biocompatível (AMORIM et al., 2006). No entanto, um de seus componentes, o Rifocort[®], composto por uma associação de antibiótico com corticosteróide foi retirado do mercado, restringindo o uso atual desta pasta (ANTONIAZZI et al., 2015).

Na tentativa de substituir o Rifocort[®], ANTONIAZZI et al. (2015) propuseram uma nova associação de medicações. A partir dessas associações, os autores analisaram o potencial antimicrobiano contra: *S. aureus*, *S. mutans*, *S. oralis*, *E. coli* e *B. subtilis*. Para isso o Rifocort[®] foi substituído por Nebacetin[®]. Os autores concluíram que essa nova associação de substâncias é passível de ser utilizado no tratamento de dentes decíduos, porém os autores ressaltam que são necessários mais estudos para avaliar a biocompatibilidade destas associações, de modo a permitir a sua utilização clínica.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse estudo foi avaliar a resposta tecidual inflamatória e capacidade de mineralização dos materiais: material experimental à base de MTA indicado para pulpotomia de dentes decíduos (MEPulpo-MTA) (Angelus®), e material experimental à base de MTA indicado para obturação dos canais radiculares de dentes decíduos (MEPulpect-MTA) (Angelus®) frente a implantes de tubos de polietileno em tecido subcutâneo de ratos. Objetivos específicos foram: análise morfológica e morfométrica da resposta inflamatória tecidual e observar por meio da Luz Polarizada e coloração de Von Kossa a presença de estruturas mineralizadas

4 MATERIAL E MÉTODO

Nesta sessão apresentamos a metodologia deste trabalho

4.1- EXPERIMENTO

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas-MG (Anexo A). Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), machos, com peso entre 250 a 300 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas identificadas (4 animais por gaiola), em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e consumo de ração sólida e água *ad libitum* durante todo período experimental. Para sedação e anestesia foi utilizada a associação dos fármacos: Ketamina-80mg/kg (Avenco Inc., Fort Dodge, IA) e Xilazina-4mg/kg (Mobyay Corp., Shawnee, KS). Assim, os animais receberam injeção intraperitoneal contendo 0,04mL/100g de Xilazina e 0,08mL/100g de Ketamina. Uma dosagem suplementar de anestésico foi administrada sempre que necessário para a sedação.

Os animais foram divididos em 5 períodos de análise: 7, 15, 30, 60 e 90 dias, sendo 6 animais por período, nos quais foram inseridos na região dorsal 4 tubos de polietileno contendo os seguintes materiais:

Quadro 1- Composição dos materiais conforme descrito pelo fabricante

Material	Composição
Material experimental a base de MTA para pulpotomia de dentes decíduos (Angelus®) - MEPulpo-MTA	Pó: Silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, óxido de zircônia, fluoreto de cálcio, óxido de silício, óxido de ferro Líquido: Água destilada, plastificante, cloreto de cálcio.
Material experimental a base de MTA para obturação dos canais radiculares de dentes decíduos (Angelus®) - MEPulpect-MTA MTA branco (Angelus®)	Pasta: Silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, resina salicilato, pigmentação, tungstato de cálcio, óxido de silício, resina diluente Pó: Silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, óxido de cálcio, óxido de bismuto. Líquido: Água destilada.

Fonte: Do autor

Antes da implantação, os materiais foram preparados de acordo com as instruções de seus fabricantes: MEPulpo-MTA: 1 medida para pó e 2 para o líquido; MTA Branco: 1 medida para pó e 1 para o líquido; MEPulpect-MTA: pasta única, sem necessidade de manipulação e posteriormente foram colocados no interior dos tubos de polietileno (120 tubos com: 10 mm de comprimento x 1,6 mm de diâmetro), previamente esterilizados em óxido de etileno, mantendo ambas extremidades abertas (Figura 1). Após a realização da tricotomia e asSepsia com solução de iodo a 5% da região dorsal do animal, duas incisões foram realizadas (aproximadamente 2 cm) com bisturi e lâmina 15, orientando-se na direção da cabeça para a cauda.

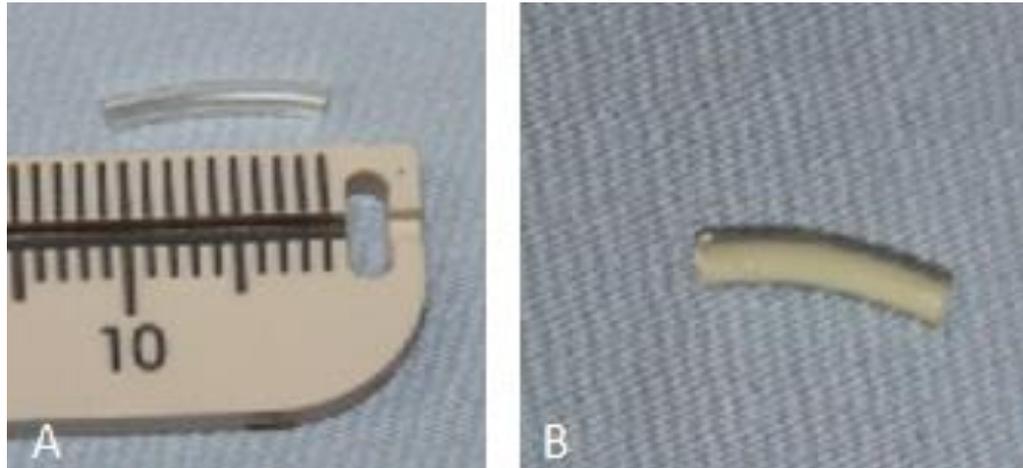


Figura 1- A: Tubo vazio medindo 10 mm de comprimento x 1,6 mm de diâmetro; B: Tubo preenchido com o material.

Fonte: Do autor

O tecido foi divulsionado criando-se duas bolsas paralelas às incisões e o tubo foi implantado (Figura 2). Cada animal recebeu 4 implantes (Figura 3) e o local da incisão foi suturado com pontos simples utilizando fio de seda (Seda 4-0, ETHICON, São José dos Campos, SP-Brasil).

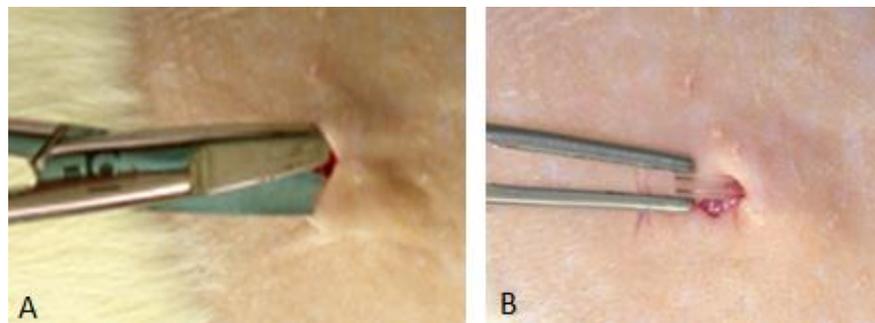


Figura 2- Divulsão dos tecidos para inserção dos tubo e inserção do tubo com ajuda de pinça clínica.

Fonte: Do autor

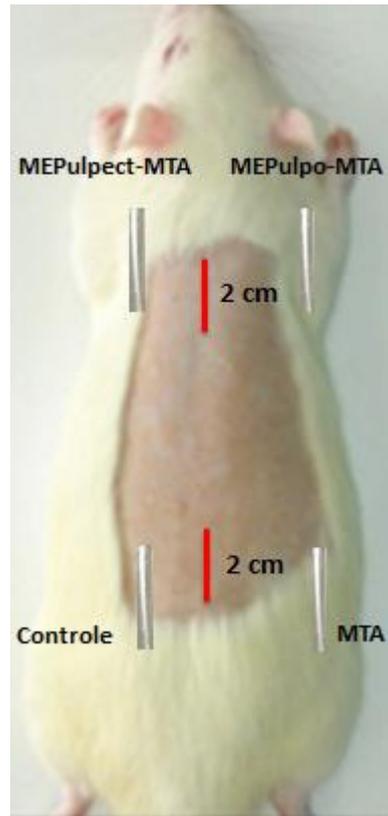


Figura 3- Distribuição dos materiais no dorso dos animais
Fonte: Do autor

4.2-EUTANÁSIA

Os animais foram eutanasiados aos 7, 15, 30, 60 e 90 dias pós-operatórios através de exposição ao CO₂ em câmara apropriada. Após a eutanásia, foi realizada tricotomia, identificação do tudo através da sensação tátil e uma incisão foi realizada no dorso do animal, distante do tubo. Os tecidos foram divulsionados distante da região do tudo, para que o tecido de interesse não fosse danificado. Após a localização visual dos tubos, os mesmos foram removidos com lâminas de bisturi e tesouras (Figura 4).

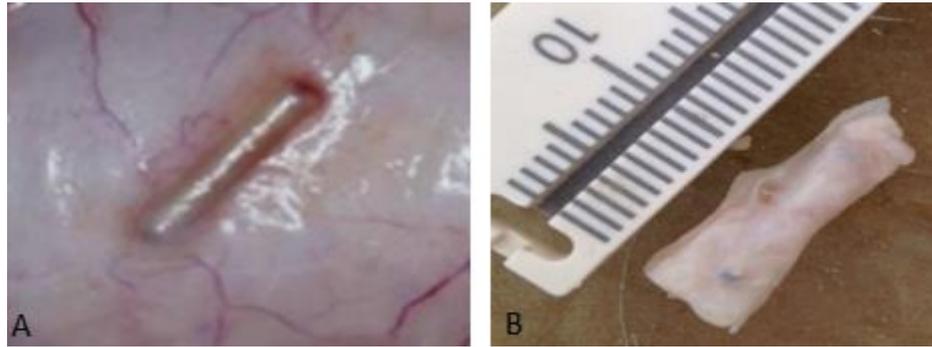


Figura 4- A: Tubos aderidos ao subcutâneo dos animais; B: Tubo removido com tecido circundante.
Fonte: Do autor

4.3- FIXAÇÃO E PREPARO PARA PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os tecidos foram fixados em formaldeído a 4% tamponado com fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,2 por 12 horas. Após esta etapa, o tecido foi preparado para inclusão em resina histológica (Leica®- Wetzlar, Alemanha).

4.3.1 Inclusão em glicol metacrilato (HISTORESIN-LEICA®)

- 1) Lavagem em água corrente no mínimo 5 horas;
- 2) Desidratação em álcool 70% por uma noite;
- 3) No dia seguinte:
 - ✓ Álcool 90% por 30 minutos;
 - ✓ Álcool 90% por 30 minutos;
 - ✓ Álcool 90% por 30 minutos;
 - ✓ Álcool 95% por 30 minutos;
 - ✓ Álcool 95% por 30 minutos;
 - ✓ Álcool 95% por 30 minutos;
- 4) As peças desidratadas foram colocadas na solução A ativada e deixadas por 72 horas (temperatura ambiente);
- 5) Os moldes de plástico próprio para inclusão em historesina foram lubrificados com spray de teflon, e as peças foram colocadas no interior dos moldes e cobertas com

resina e depois de polimerizada, os moldes foram preenchidos com resina acrílica autopolimerizante até que se tenha a polimerização.

4.3.3-Processamento histotécnico

Os blocos foram cortados em micrótomo (Leica®, São Paulo, SP, Brasil) com navalha de tungstênio na espessura de 3 μm para coloração em hematoxilina e eosina (H&E) e 10 μm para realização dos testes Von Kossa e Luz Polarizada. As etapas para cada métodos são descritos abaixo:

✓ Técnica para coloração em Hematoxilina e Eosina

- 1) Hidratar rapidamente em água destilada;
- 2) Colocar na Hematoxilina – 30 minutos;
- 3) Lavar em água corrente até remover o excesso de corante;
- 4) Colocar na Eosina – 5 minutos;
- 5) Lavar em água corrente até remover o excesso de corante;
- 6) Deixar secar na estufa, montar com Entelan e lamínula.

✓ Técnica para Coloração em Von Kossa

- 1) Hidratar rapidamente em água destilada;
- 2) Colocar sobre os cortes nitrato de prata 1% e deixar sob a luz solar por no mínimo 15 minutos;
- 3) Lavar em água corrente para remover o excesso de nitrato de prata;
- 4) Colocar no tiosulfato de sódio 5% - 30 segundos;
- 5) Lavar em água corrente - 1 minuto;
- 6) Colocar na safranina 0,5% - 30 segundos;
- 7) Lavar em água corrente para remover o excesso do corante.
- 8) Deixar secar na estufa, montar com Entelan e lamínula.

✓ Técnica para Luz Polarizada

- 1) Lâminas secas e montar com Entelan e lamínula.

4.3.4- Formas de análise

As secções em série de 3µm de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina, enquanto que 10µm foram processadas por coloração de von Kossa, ou diretamente examinado sob Luz Polarizada. A cápsula fibrosa ao redor do tubo foi avaliada e comparada visualmente e após a comparação foi estabelecido cápsula espessa ou fina. Os tecidos corados por H&E foram analisados em 10 campos microscópicos selecionados aleatoriamente a 40x de ampliação por um avaliador cego para a condição experimental pela contagem do número médio de células inflamatórias (MARTINS et al., 2016). No material MEPulpo-MTA a mineralização foram determinadas através da área de estrutura mineralizada em µm², utilizando o software Qwin (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). No material MEPulpect-MTA, a mineralização foi determinada a partir de presença ou ausência de marcação nos tecidos analisados. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e Shapiro–Wilk e quando passaram no teste de normalidade foi realizado o teste ANOVA seguido do teste de Tukey e quando não passaram pela normalidade foi realizado Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn's. Valores de p <0,05 foram considerados significativos. Após as análises os materiais foram comparados da seguinte forma: MTA com MEPulpo-MTA e MTA com MEPulpect-MTA.

5 RESULTADOS

Visando proporcionar melhor interpretação dos resultados, eles foram divididos em duas partes:

5.1 PARTE 1- AVALIAÇÃO DO MATERIAL EXPERIMENTAL A BASE DE MTA PARA PULPOTOMIA DE DENTES DECÍDUOS

Os cortes de porções do subcutâneo, contendo os implantes com os materiais testados foram submetidos ao método histoquímico para analisar a resposta inflamatória e estrutura mineralizada de forma quantitativa:

- Comparação do mesmo grupo em diferentes tempos de análise

Controle (tubos vazios)

Aos 7 e 15 dias observou-se infiltrado inflamatório intenso com presença de cápsula fibrosa espessa em volta do tubo (Fig. 5: A e B). A intensidade do infiltrado inflamatório foi reduzindo aos 30, 60 e 90 dias apresentando cápsula fibrosa fina em volta do tubo nos três períodos analisados (Fig. 5: C, D e E), respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa aos 7 dias em comparação com os períodos de 30, 60 e 90 dias com maior número médio de células inflamatórias para 7 dias ($p < 0,05$) (Tabela 1). Não foram observadas positividade para Von Kossa (Fig. 6: A, B, C, D e E) e estruturas birrefringentes a luz polarizada (Fig. 7: A, B, C, D e E).

MTA

Aos 7 e 15 dias observou-se infiltrado inflamatório moderado com presença de cápsula fibrosa espessa em volta do tubo. (Fig. 5: F e G). A intensidade do infiltrado inflamatório foi reduzindo aos 30, 60 e 90 dias apresentando cápsula fibrosa fina em volta do tubo nos três períodos analisados (Fig. 5: H, I e J), respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos analisados ($p>0,05$) (Tabela 1). Houve diferença estatisticamente significativa na técnica de Von Kossa nos períodos 7 e 15 dias em relação os períodos 30 e 90 dias com maior área de mineralização aos 7 e 15 dias ($p<0,05$) (Tabela 1) e para estruturas birrefringentes a luz polarizada houve diferença nos períodos 7 e 15 dias em relação aos 90 dias com maior área de mineralização aos 7 e 15 dias (Tabela 1).

Material experimental a base de MTA para PULPOTOMIA (MEPulpo-MTA)

Aos 7, 15 e 30 dias observou-se infiltrado inflamatório intenso com presença de cápsula fibrosa espessa em volta do tubo. (Fig. 5: K, L e M). Aos 60 e 90 dias observou-se redução do infiltrado inflamatório com presença de cápsula fibrosa fina em volta do tubo (Fig. 5: N e O). Houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 7 dias e 90 dias com maior número médio de células inflamatórias para 7 dias ($p<0,05$); 15 dias em comparação aos 60 e 90 dias com maior número médio de células inflamatórias para 15 dias ($p<0,05$) e aos 30 dias com 90 dias com maior número médio de células inflamatórias para 30 dias ($p<0,05$) (Tabela 1). Não houve diferença estatística significativamente para técnica de Von Kossa e para estruturas birrefringentes a luz polarizada (Tabela 1).

-Comparação entre os diferentes grupos no mesmo tempo de análise

Resposta inflamatória

O número de células inflamatórias na embocadura do tubo de polietileno foi determinada aos 7, 15, 30, 60 e 90 dias e os dados foram comparados em cada tempo (Tabela 1). Aos 7 dias houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controle e MTA e MTA com MEPulpo-MTA, sendo o MEPulpo-MTA o material com maior número médio de células inflamatórias na capsula fibrosa ($p < 0,05$). Após 15 dias houve diferença entre Controle/MTA com MEPulpo-MTA ($p < 0,05$). Aos 30 dias houve diferença estatística entre Controle com MTA/MEPulpo-MTA com redução no número de células inflamatórias do grupo MEPulpo-MTA ($p < 0,05$). Após 60 e 90 dias não houve diferença entre o número de células inflamatórias entre os grupos ($p > 0,05$).

Mineralização

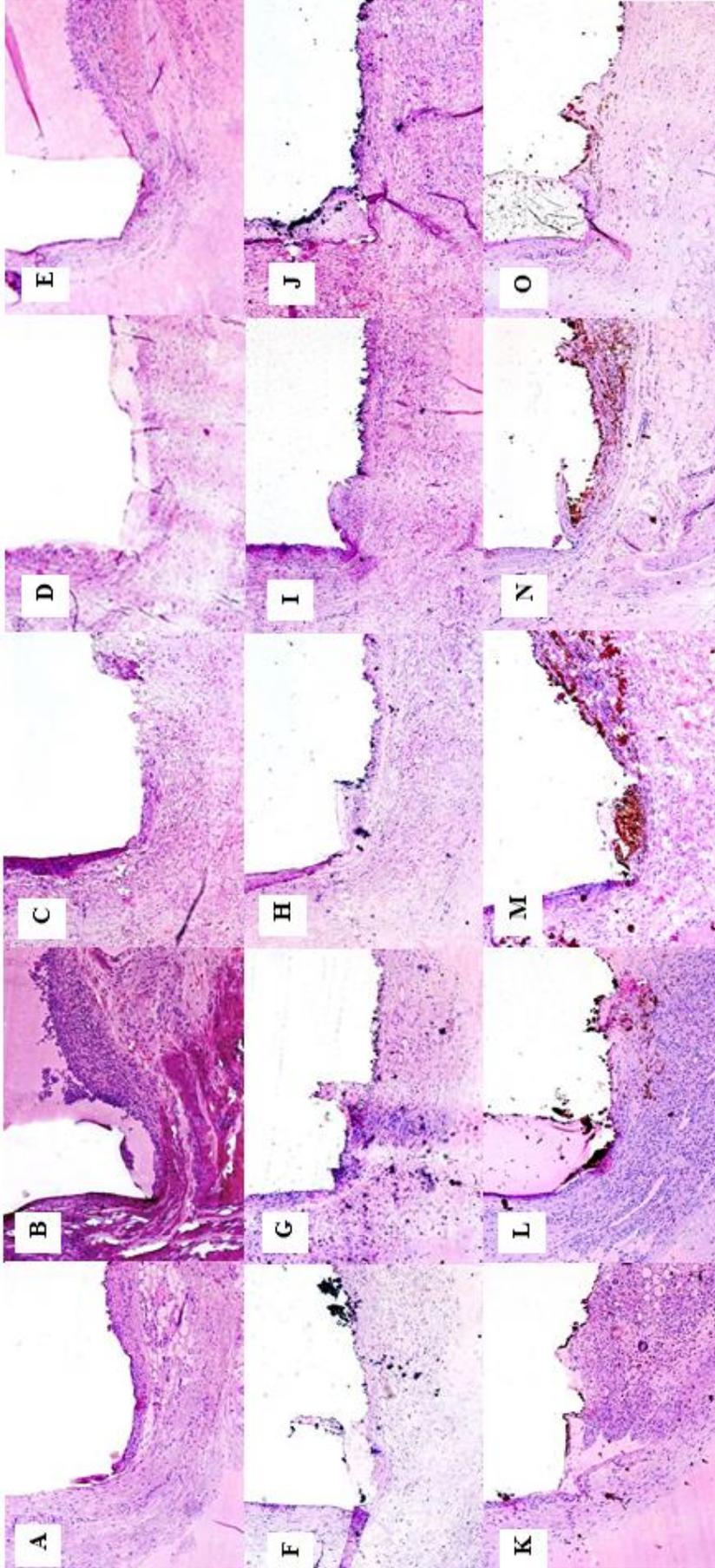
Os cortes de porções do subcutâneo, contendo os implantes com os materiais testados foram submetidos ao método histoquímico para detecção de calcificação (método de von Kossa) e apresentaram regiões da cápsula impregnadas em preto, ou seja, positivas ao método (Figura 6), exceto para grupo controle, onde não houve marcação. (Tabela 1). Aos 7, 15, 30 e 60 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre eles MTA e MEPulpo-MTA ($p > 0,05$). Aos 90 dias maior área de mineralização foi encontrada para MEPulpo-MTA, com diferença estatisticamente significativa quando comparada ao MTA ($p < 0,05$). Exceto no grupo controle, a birrefringência sob luz polarizada revelou a presença de partículas de carbonato de cálcio em todos os períodos analisados, sem diferença estatisticamente significativa entre eles ($p > 0,05$) (Figura 7).

Tabela 1- Número de células inflamatórias (média-desvio padrão/mediana mínimo e máximo), espessura da cápsula fibrosa, capacidade de biomineralização por marcação de von Kossa (VK) (área μm^2) e estruturas birrefringentes a luz polarizada (POL) (área μm^2).

Tempo	Material	Células Inflamatórias	VK	POL	Cápsula	n
		Média \pm SD/ Mediana (valor min-max)	Média \pm SD/ Mediana (valor min-max)	Média \pm SD/ Mediana (valor min-max)		
7 dias	Control	307 (264-328)aA	0aA	0aA	Espessa	6
	MTA	214 (\pm 50)bA	51365 (31723-99329)bA	64729 (38748-89105)bA	Espessa	
	MEPulpo-MTA	328 (\pm 69)aAB	15538 (1681-178434)bA	39930 (2980-128260)abA	Espessa	
15 dias	Control	254 (138-332)aAB	0aA	0aA	Espessa	6
	MTA	212 (\pm 45)aA	51253 (32558-73778)bA	45671 (24169-96900)bA	Espessa	
	MEPulpo-MTA	396(\pm 84)bA	24142 (20131-33237)abA	24446 (12515-34351)abA	Espessa	
30 dias	Control	149 (108-232)aB	0aA	0aA	Fina	6
	MTA	206 (\pm 88)bA	27652 (20184-32611)bB	29127 (17423-43998)bAB	Fina	
	MEPulpo-MTA	294 (\pm 107)bAB	35387 (25120-99970)bA	21538 (11738-34472)bA	Espessa	
60 dias	Control	134 (104-172)aB	0aA	0aA	Fina	6
	MTA	157 (\pm 64)aA	24965 (16840-31919)abAB	24836 (21956-31085)bAB	Fina	
	MEPulpo-MTA	204 (\pm 57)aBC	44193 (30507-67682)bA	20998 (18285-58402)bA	Fina	
90 dias	Control	142 (130-456)aB	0aA	0aA	Fina	6
	MTA	132 (\pm 31)aA	15736 (3889-16979)bB	16897 (10961-30939)bB	Fina	
	MEPulpo-MTA	138 (\pm 24)aC	28173 (19820-35860)cA	15458 (12563-17232)bA	Fina	

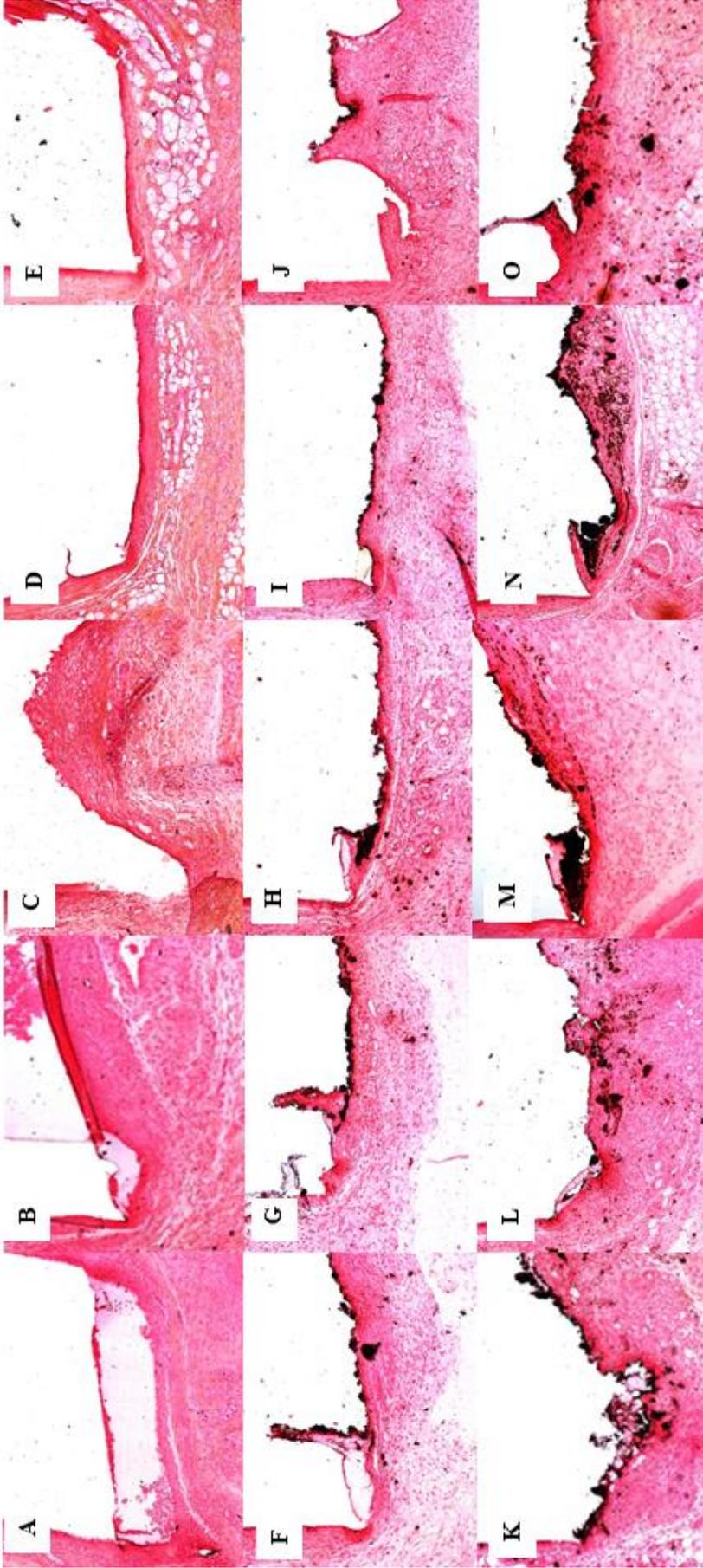
* Letras minúsculas iguais indicam não diferença estatística entre os grupos em cada tempo de análise ($p>0,05$); letras maiúsculas iguais indicam não diferença estatística entre cada grupo nos diferentes tempos de análise ($p>0,05$).

Fonte: Do autor



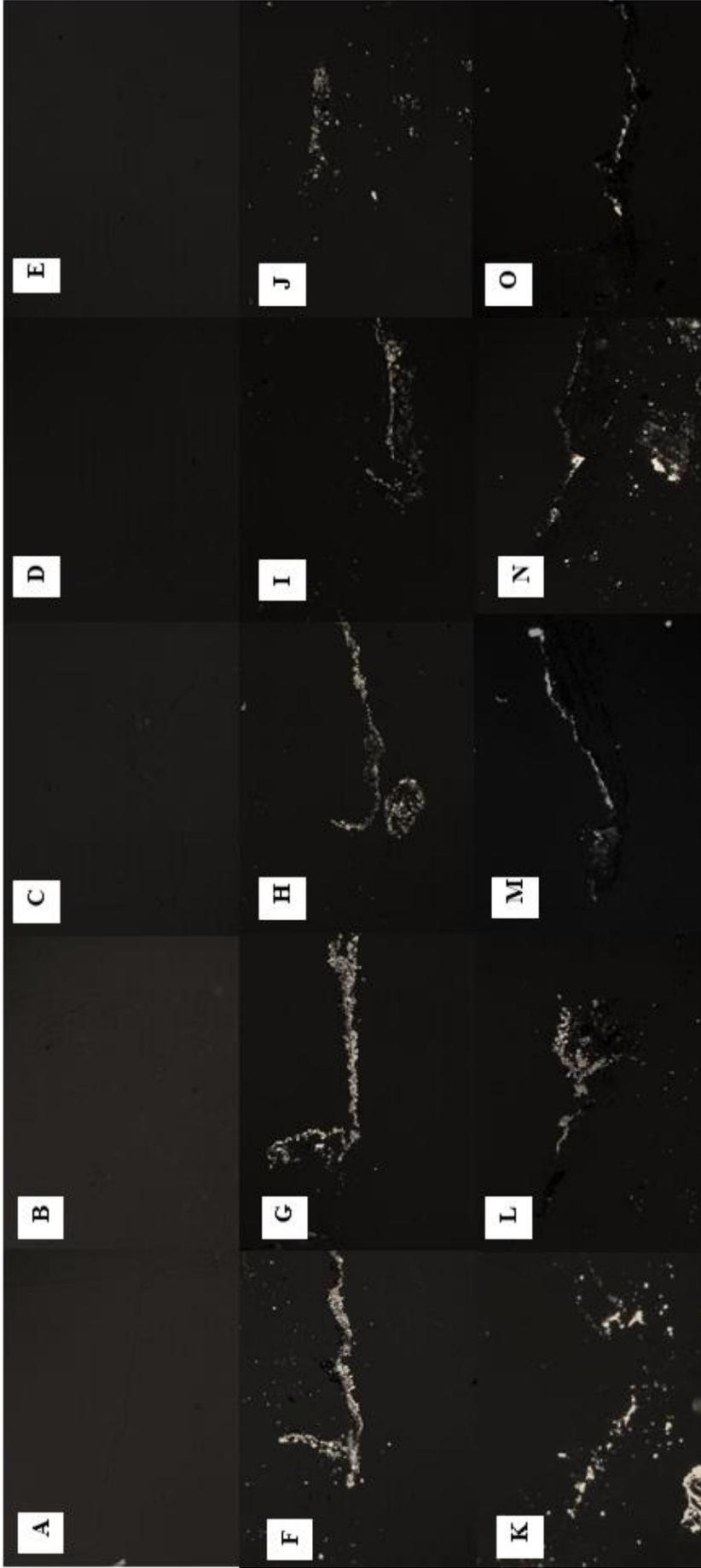
Fonte: Do autor

Figura 5. Resposta inflamatória ao Grupo Controle (tubos vazios) aos 7 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 90 (E) dias; MTA Branco aos 7 (F), 15 (G), 30 (H), 60 (I) e 90 (J) dias e material experimental a base de MTA para pulpotomia (MEPulpo-MTA) aos 7 (K), 15 (L), 30 (M), 60 (N) e 90 (O) dias. Coloração com hematoxilina-eosina (10x).



Fonte: Do autor

Figura 6: Mineralização em resposta ao Grupo Controle (tubos vazios) aos 7 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 90 (E) dias; MTA Branco aos 7 (F), 15 (G), 30 (H), 60 (I) e 90 (J) dias e material experimental a base de MTA para pulpotomia (MEPulpo-MTA) aos 7 (K), 15 (L), 30 (M) e 90 (N) e 90 (O). As áreas pretas representam mineralização a partir do método Von Kossa (x10)



Fonte: Do autor

Figura 7: Mineralização em resposta ao Grupo Controle (tubos vazios) aos 7 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 90 (E) dias; MTA Branco aos 7 (F), 15 (G), 30 (H), 60 (I) e 90 (J) dias e material experimental a base de MTA para pulpectomia (MEPulpect-MTA) aos 7 (K), 15 (L), 30 (M), 60 (N) e 90 (O). As estruturas no tecido birrefringentes a luz polarizada representam cristais de calcita (x10)

4.2 PARTE 2- AVALIAÇÃO DO MATERIAL EXPERIMENTAL A BASE DE MTA PARA OBTURAÇÃO DOS CANAIS RADICULARES DE DENTES DECÍDUOS

Os cortes de porções do subcutâneo, contendo os implantes com os materiais testados foram submetidos ao método histoquímico analisar a resposta inflamatória de forma quantitativa a e estrutura mineralizada de forma qualitativa:

- Comparação do mesmo grupo em diferentes tempos de análise

Controle (tubos vazios)

Aos 7 e 15 dias observou-se infiltrado inflamatório intenso com presença de cápsula fibrosa espessa em volta do tubo (Fig. 8: A e B). A intensidade do infiltrado inflamatório foi reduzindo aos 30, 60 e 90 dias apresentando cápsula fibrosa fina em volta do tubo nos três períodos analisados (Fig. 8: C, D e E), respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa aos 7 dias em comparação com os períodos de 30, 60 e 90 dias com maior número médio de células inflamatórias para 7 dias ($p < 0,05$) (Tabela 2). Não foram observadas positividade para Von Kossa (Fig. 9: A, B, C, D e E) e estruturas birrefringentes a luz polarizada (Fig. 10: A, B, C, D e E).

MTA

Aos 7 e 15 dias observou-se infiltrado inflamatório moderado com presença de cápsula fibrosa espessa em volta do tubo. (Fig. 8: F e G). A intensidade do infiltrado inflamatório foi reduzindo aos 30, 60 e 90 dias apresentando cápsula fibrosa fina em volta do tubo nos três períodos analisados (Fig. 9: H, I e J), respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos analisados ($p > 0,05$) (Tabela 2). Houve diferença estatisticamente significativa na

técnica de Von Kossa nos períodos 7 e 15 dias em relação os períodos 30 e 90 dias com maior área de mineralização aos 7 e 15 dias ($p < 0,05$) (Tabela 2) e para estruturas birrefringentes a luz polarizada houve diferença nos períodos 7 e 15 dias em relação aos 90 dias com maior área de mineralização aos 7 e 15 dias (Tabela 2).

Material experimental a base de MTA para PULPECTOMIA (MEPulpect-MTA)

Aos 7, 15, 30 e 60 dias observou-se infiltrado inflamatório intenso com presença de cápsula fibrosa espessa em volta do tubo (Fig. 8: K, L, M e N). Aos 90 dias observou-se diminuição do infiltrado inflamatório com presença de cápsula fibrosa fina em volta do tubo (Fig. 8: O). Houve diferença estatisticamente significativa ao se comparar o grupo aos 15 dias com 90 dias com maior número médio de células inflamatórias aos 15 dias ($p < 0,05$) (Tabela 2). Partículas de cálcio através da coloração de von Kossa foram marcadas em 100% de todos os períodos analisados (Fig. 9: K, L, M, N e O) e partículas de carbonato de cálcio através da birrefringência sob luz polarizada foram marcadas em 90% das espécimes aos 7 dias (Fig. 10: K) e em 100% nos demais períodos (Fig. 10: L, M, N e O), respectivamente.

Comparação entre os diferentes grupos no mesmo tempo de análise

Resposta inflamatória

O número de células inflamatórias na embocadura do tubo de polietileno foi determinado aos 7, 15, 30, 60 e 90 dias e os dados foram comparados em cada tempo (Tabela 2). O controle e o MTA foram semelhantes em relação ao número de células inflamatórias em todos os tempos analisados, com exceção de 7 dias, o qual o grupo controle foi observado maior número de células inflamatórias com diferença estatisticamente significativa do MTA ($p < 0,05$). O número de células inflamatórias foi maior para o material MEPulpect-MTA, o qual foi diferente estaticamente do MTA em

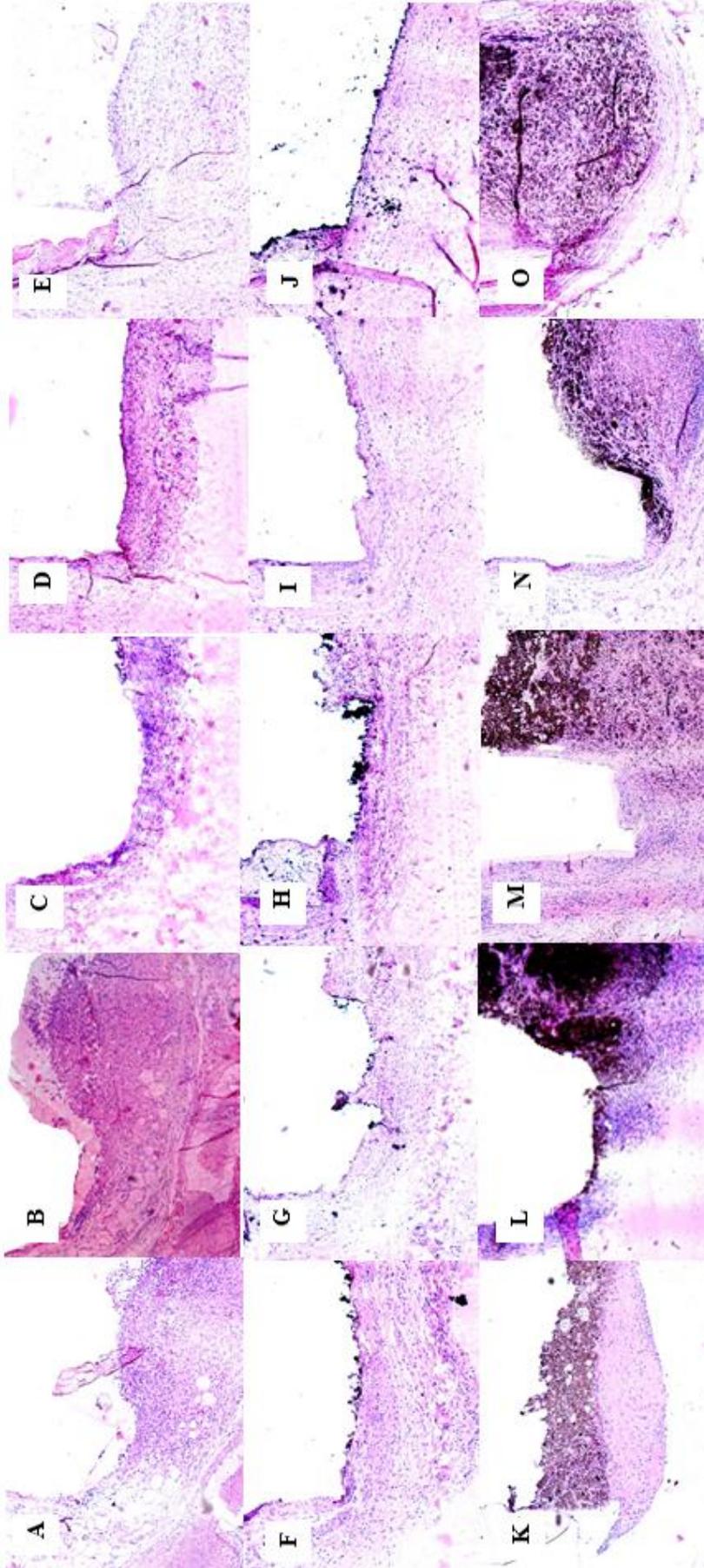
todos os tempos analisados ($p < 0.05$) com exceção aos 7 dias, onde grupo controle e MEPulpect-MTA foram iguais ($p > 0.05$).

Tabela 2: Número de células inflamatórias (média-desvio padrão/mediana mínimo e máximo), espessura da cápsula fibrosa, capacidade de biomineralização pela marcação de Von Kossa (VK) e estruturas birrefringentes a luz polarizada (POL).

Tempo	Material	Média \pm SD/ Mediana (valores min- max)	Cápsula	VK (%)	POL (%)	n
7 dias	Control ^{aA}	307 (263-327)	Espessa	0	0	6
	MTA ^{bA}	214 (\pm 50)	Espessa	100	100	
	MEPulpect-MTA ^{aAB}	293 (211-336)	Espessa	100	90	
15 dias	Control ^{aAB}	254 (137-331)	Espessa	0	0	6
	MTA ^{aA}	212 (\pm 45)	Espessa	100	100	
	MEPulpect-MTA ^{bA}	389 (295-606)	Espessa	100	100	
30 dias	Control ^{aB}	149 (107-231)	Fina	0	0	6
	MTA ^{aA}	206 (\pm 88)	Fina	100	100	
	MEPulpect-MTA ^{bAB}	368 (272-432)	Espessa	100	100	
60 dias	Control ^{aB}	134 (103-171)	Fina	0	0	6
	MTA ^{aA}	157 (\pm 64)	Fina	100	100	
	MEPulpect-MTA ^{bAB}	355 (290-392)	Espessa	100	100	
90 dias	Control ^{aB}	142 (129-155)	Fina	0	0	6
	MTA ^{aA}	132 (\pm 31)	Fina	100	100	
	MEPulpect-MTA ^{bB}	200 (180-292)	Fina	100	100	

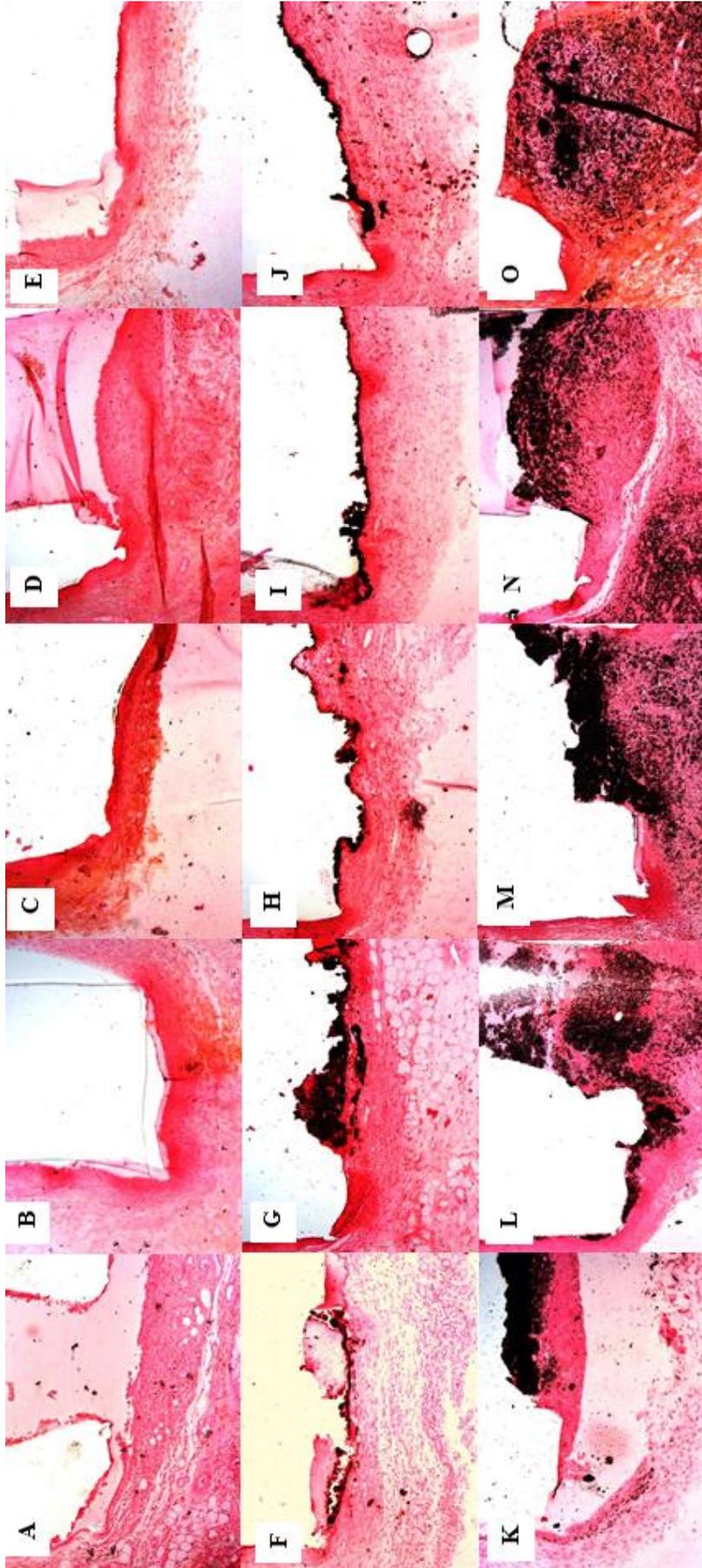
* Letras minúsculas iguais indicam não diferença estatística entre os grupos em cada tempo de análise ($p > 0,05$); letras maiúsculas iguais indicam não diferença estatística entre cada grupo nos diferentes tempos de análise ($p > 0,05$).

Fonte: Do autor



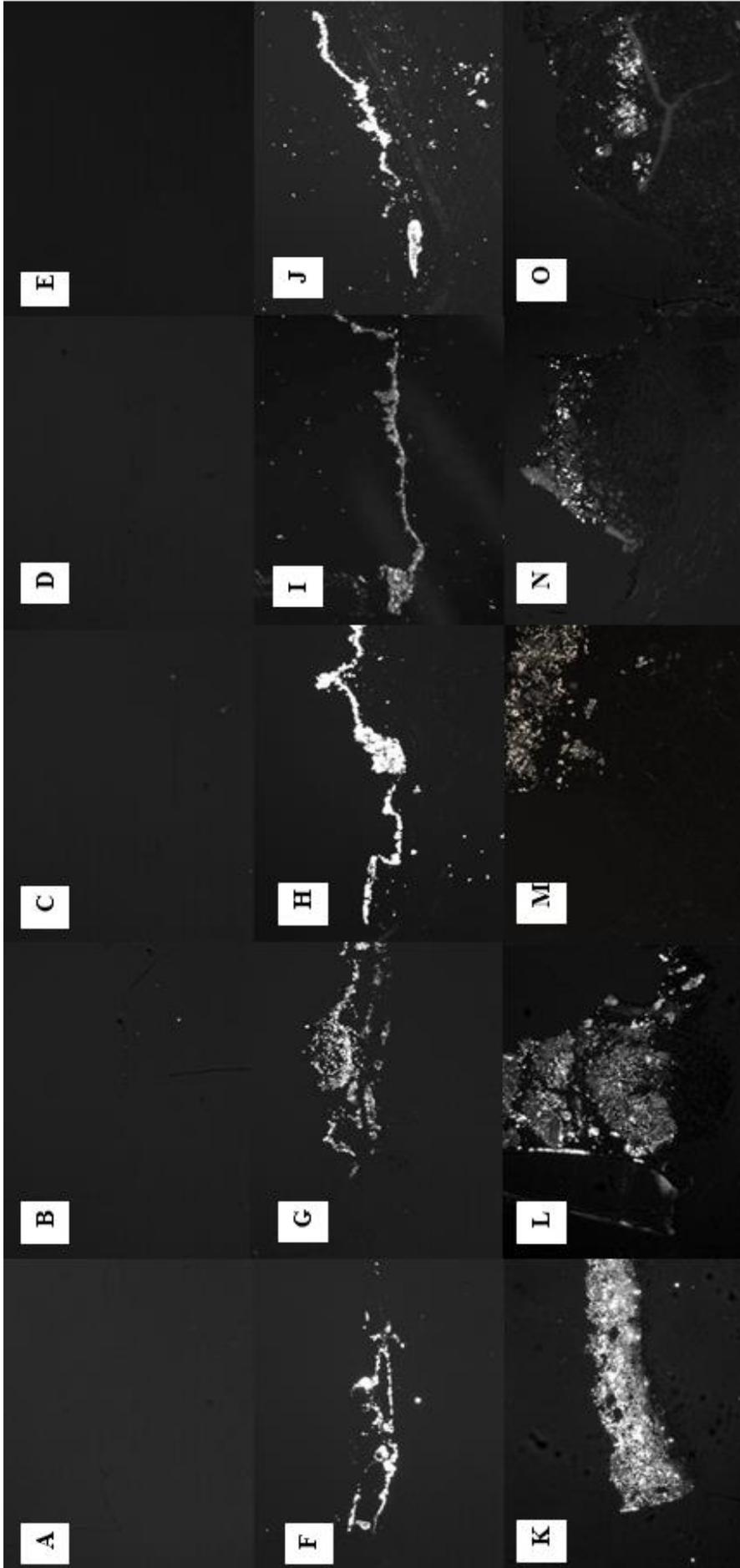
Fonte: Do autor

Figura 8: Resposta inflamatória ao Grupo Controle (tubos vazios) aos 7 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 90 (E) dias; MTA Branco aos 7 (F), 15 (G), 30 (H), 60 (I) e 90 (J) dias e material experimental a base de MTA para pulpectomia (MEPulpect-MTA) aos 7 (K), 15 (L), 30 (M), 60 (N) e 90 (O) dias. Coloração com hematoxilina-eosina (10x).



Fonte: Do autor

Figura 9: Mineralização em resposta ao Grupo Controle (tubos vazios) aos 7 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 90 (E) dias; MTA Branco aos 7 (F), 15 (G), 30 (H), 60 (I) e 90 (J) dias e material experimental a base de MTA para pulpectomia (ME Pulpsect-MTA) aos 7 (K), 15 (L), 30 (M), 60 (N) e 90 (O). As pretas representam mineralização a partir do método de Von Kossa (x10)



Fonte: Do autor

Figura 10: Mineralização em resposta ao Grupo Controle (tubos vazios) aos 7 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D) e 90 (E) dias; MTA Branco aos 7 (F), 15 (G), 30 (H), 60 (I) e 90 (J) dias e material experimental a base de MTA para pulpectomia (MEPulpect-MTA) aos 7 (K), 15 (L), 30 (M), 60 (N) e 90 (O). As estruturas no tecido birrefringentes a luz polarizada representam cristais de calcita (x10)

6 DISCUSSÃO

Visando proporcionar melhor entendimento, a discussão foi dividida em duas partes, assim como em resultados:

6.1 PARTE 1- DISCUSSÃO DO MATERIAL EXPERIMENTAL A BASE DE MTA PARA PULPOTOMIA DE DENTES DECÍDUOS

Vários métodos têm sido utilizados para avaliar a biocompatibilidade de cimentos endodônticos, incluindo testes de implantação em subcutâneo de ratos. Este método é considerado um dos testes mais adequados para determinar os efeitos que os materiais causam no tecido (BUENO et al., 2016; GOMES FILHO et al., 2008;). Para isso, são utilizados tubos de polietileno preenchidos com material e inseridos no subcutâneo dos ratos. Sendo assim, essa metodologia foi aplicada neste estudo, no qual os tubos vazios (controle) causaram reação inflamatória mais intensa nos períodos de 7 e 15 dias com diminuição nos demais tempos e tal condição se assemelha com os resultados de outros estudos (BUENO et al., 2016; GOMES et a., 2004, 2008; YALTIRIK et al., 2004).

Quando em contato com o tecido o MTA promove um aumento do pH (12) e liberação de cálcio que 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). 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). Tem sido sugerido que estes cristais formados a partir de precipitação de carbonato de cálcio poderia estimular a deposição de estrutura mineralizada. Há evidências de que a MTA utilizado em pulpotomias promove a

formação deste tecido contendo fósforo e cálcio, os principais componentes da hidroxiapatita (ACCORINTE et al., 2008).

O MEPulpo-MTA é um material com indicação para pulpotomia de dentes decíduos que contém em sua formulação os componentes do MTA com acréscimo de alguns componentes no pó como óxido de zircônia que age como radiopacificador; fluoreto de cálcio como fonte de flúor; óxido de silício para controle da viscosidade e óxido de ferro como agente de pigmentação. No líquido, além de água destilada, foi inserido plastificante e cloreto de cálcio que age como acelerador de presa. Por ser um material a base de MTA, sugere-se que exista marcação positiva para Von Kossa e também estruturas birrefringentes a luz polarizada e realmente foi o que observamos neste estudo. Um maior área de marcação no grupo MEPulpo-MTA para Von Kossa aos 90 dias foi encontrada com diferença estatisticamente significativa quando comparada ao MTA. Esta marcação para Von Kossa, que se manteve nos tempos mais avançados, sugere que o MEPulpo-MTA promove a formação de carbonato de cálcio mais tardiamente do que o MTA, possivelmente devido a sua formulação.

Um dos componentes do MEPulpo-MTA é fluoreto de cálcio que age como fonte de flúor. Provavelmente, este componente foi inserido no material, pois cimentos endodônticos que possuem em sua composição compostos fluoretados revelaram uma capacidade de vedação melhor provavelmente devido a uma maior expansão após a presa (GANDOLFI et al., 2009). Além disso, os íons de flúor do cimento podem penetrar na dentina e aumentar a mineralização e também fechar túbulos dentinários (GANDOLFI et al., 2009). Gandolfi & Prat (2010) elucidaram que durante o processo de hidratação e endurecimento do MTA, alterações de redução de volume podem ocorrer, pois isso é uma consequência do consumo de água do produto durante a sua hidratação. Entretanto, é possível modificar a expansão do material na tentativa de reduzir o encolhimento usando compostos químicos específicos como o flúor.

MTA tem sido utilizado principalmente em pulpotomias e reparos de perfuração de furca, pois apresenta biocompatibilidade e induz a formação de estrutura mineralizada na região onde é inserido (BIN et al., 2012; DA FONSECA et al., 2016; LARA et al., 2015; LOURENÇO et al., 2016;). Entretanto, após sua manipulação o MTA fica com consistência arenosa o que dificulta sua inserção na cavidade. Além disso, tem sido relatado o manchamento da coroa após sua

aplicação (BORTOLUZZI et al., 2006; KOGAN et al., 2006; LEE et al., 2004; MATT, et al., 2004; TORABINEJAD et al., 1995). Dessa forma, materiais a base de MTA, como o MEPulpo-MTA, vem sendo estudados na tentativa de diminuir as características indesejáveis do MTA, porém mantendo as características ideais de biocompatibilidade e mineralização, como é o caso do MEPulpo-MTA.

MTA e o MEPulpo-MTA são materiais com indicação para pulpotomia e foram utilizados neste estudo. Foi observado que nos tempos de 7 e 15 dias, esses materiais causaram reação inflamatória mais intensa que nos demais períodos de análise, o que pode ser explicado pela inflamação causada pelos materiais implantados ou pelo trauma cirúrgico produzidos durante a colocação dos tubos (BUENO, et al., 2016; ECONOMIDES et al., 1995; GOMES, et al, 2004;). Após 7 e 15 dias há a cicatrização tecidual o que leva a diminuição do processo inflamatório, porém, caso isso não ocorra a inflamação persistente deve ser atribuída aos materiais e não mais ao ato traumático da implantação dos tubos (HAMMAD, HAMADA, AL-OMARI, 2004). Neste estudo, após 15 dias de experimento não houve diferença no número médio de células inflamatórias entre MTA e MTPulpo-MTA, indicando que as alterações teciduais causadas pelo material experimental não provocou intensa resposta inflamatória, portanto MEPulpo-MTA pode ser considerado biocompatível. A inflamação é um critério importante para avaliar a biocompatibilidade de cimentos endodônticos. Sabe-se que a medição da espessura da cápsula fibrosa é um bom marcador de inflamação (QUINALAN et al., 2002, SANDERS, ROCHEFORT 2003; KHASHABA et al., 2011). Neste estudo, houve uma relação entre a inflamação e a espessura da cápsula fibrosa, pois a diminuição progressiva do número de células inflamatórias coincidiram com a diminuição da espessura da cápsula fibrosa ao longos dos tempos analisados (KHASHABA et al., 2011).

6.2 PARTE 2- DISCUSSÃO DO MATERIAL EXPERIMENTAL A BASE DE MTA PARA OBTURAÇÃO DOS CANAIS RADICULARES DE DENTES DECÍDUOS

Com o objetivo de avaliar a biocompatibilidade e mineralização de um novo material a base de MTA (MEPulpect-MTA) para obturação de canais radiculares da dentição decídua, tubos de polietileno contendo o material foram implantados no subcutâneo de ratos. Este método foi primeiramente descrito por Torneck (1966), e de acordo com a literatura, é um bom método para avaliar a biocompatibilidade de cimentos utilizados em endodontia (KAPLAN et al., 2003). Além disso, neste estudo os espécimes foram incluídos em glicol metacrilato, pois de acordo com o estudo de Gomes-Filho et al., (2001) esta técnica oferece várias vantagens sobre inclusão em parafina, como cortes mais finos que oferecem boa definição celular o que permite uma melhor definição do processo inflamatório (BUENO et al., 2016; GOMES-FILHO et al., 2001). Neste estudo, as reações aos tubos vazios foram semelhantes aos que foram relatados anteriormente, onde nos períodos iniciais, 7 e 15 dias, foram observados infiltrado inflamatório mais intenso com cápsula fibrosa espessa (BUENO, et al., 2016; GOMES-FILHO, et al., 2009).

A progressão e o a inflamação está diretamente associada com o grau de resposta do hospedeiro a substâncias liberadas pelos materiais (FRANZ et al., 2011). Sabe-se, que um material para obturação dos canais radiculares da dentição decídua não deve ser tóxico aos tecidos periapicais e nem ao germe do dente permanente, portanto deve apresentar biocompatibilidade (LOPES, SIQUEIRA 2004; THOMAZ et al., 1994). O MEPulpect-MTA é uma material para obturação dos canais radiculares da dentição decídua a base de MTA, que além de todos os componentes do MTA, possui como componentes: resina salicilato como componente ativo; tungstato de cálcio que age como radiopacificador; óxido de silício que confere ao material viscosidade e resina diluente como plastificante. No MEPulpect-MTA foi observado aos 15, 30 e 60 dias um intenso infiltrado inflamatório, o qual foi estatisticamente diferente ao MTA.

As resinas de salicilato, componente ativo do MEPulpect-MTA, tem se mostrado clinicamente confiável, por ser anti-inflamatório e biocompatível (FARIA-JUNIOR et al., 2013; LEONARDO et al., 1997; WALTIMO et al., 2001;). Além ser um dos componentes do MEPulept-MTA, a resina salicilato também é um componente dos cimentos endodônticos Sealape® e MTA Fillapex® e esses materiais são considerados biocompatíveis de acordo com alguns estudos (GOMES-FILHO et al., 2008; 2012; MARQUES et al., 2013). Dessa forma, sugere-se que esta resina pode não ter sido a responsável pelo processo inflamatório intenso nos períodos 7, 15, 30

e 60 dias. A resina diluente utilizado no MEPulpect-MTA como plastificante, também é um material que está presente no MTA Fillapex™, o qual também tem se apresentado como um material biocompatível (GOMES-FILHO et al., 2012; MARQUES et al., 2013)

A resposta do hospedeiro a materiais em contato com o tecido é complexa, dependente de respostas imunes inatas, não específicas e ocorre no tecido circundante ao material. Células imunes produzem e liberam citocinas e fatores de crescimento, os quais exercem um papel ativo na instalação e progressão do processo inflamatório (DA FONSECA et al., 2015; FRANZ et al., 2011;). Dependendo da composição dos cimentos, todos os materiais podem induzir algumas vias de sinalização que estimulam a expressão de citocinas pro inflamatórias e prostaglandinas que estão envolvidos na iniciação do processo inflamatório (FRANZ et al., 2011).

Pode ser observado que o MEPulpect-MTA penetrou nos tecidos em todos os períodos analisados. Tal fato pode ser explicado pela interação pela natureza dos componentes e reação entre os mesmos. Fato semelhante foi relatado por Khashaba et. al., (2011) que em estudos com outros cimentos endodônticos observaram extravasamento de material e associaram este fato a exacerbada resposta inflamatória. Em nosso estudo a inflamação aos 7, 15, 30 e 60 dias pode ser explicada devido à presença de algum componente do material, bem como a interação entre eles o que provocou a resposta inflamatória exacerbada. Além disso, o fato do material apresentar alta penetrabilidade no tecido subcutâneo também pode explicar o quadro inflamatório. Dessa forma, sugere-se que este material não foi bem tolerado pelo tecido subcutâneo adjacente ao tubo implantado, o que pode ser prejudicial à rizólise do dente decíduo e ser agressivo ao germe do permanente (THOMAZ et al., 1994)

Os componentes resultantes da mistura do pó do MTA com a água destilada pode ser convertido em hidróxido de cálcio e dissociados em Ca^{2+} e OH^- . A difusão de íons hidroxila a partir do canal radicular eleva o pH promovendo alcalinização nos tecidos, o que favorece o processo de cura (TRONSTAD et al., 1981). O cálcio irá reagir com o gás carbônico de modo a formar cristais de carbonato de cálcio que servem como um núcleo para a calcificação, e favorece a mineralização (SEUX et al., 1991). Neste estudo, MTA e MEPulpect-MTA apresentaram estruturas birrefringentes à luz polarizada e marcação para Von Kossa em todos os períodos

analisados. A literatura enfatiza que marcações positivas birrefringentes à luz polarizada e a Von Kossa estão relacionadas a formação de estrutura mineralizada (SEUX, et al., 1991).

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, no modelo de ratos utilizado neste estudo, o MEPulpo-MTA produziu reações teciduais inflamatórias semelhantes ao MTA® (Angelus) incluindo a estimulação de formação de estrutura mineralizada. Sendo assim, MEPulpo-MTA é um material biocompatível com possível indicação para pulpotomia de dentes decíduos. O MEPulpect-MTA (Angelus) produziu formação de estrutura mineralizada semelhante ao MTA® (Angelus). Contudo, a resposta do MEPulpect-MTA foi exacerbada em todos os tempos com exceção de 7 dias quando comparada ao MTA® (Angelus) o que compromete sua biocompatibilidade. Sendo assim, novos estudos são necessários para melhor caracterizar a interferência de alguns componentes deste material no processo inflamatório.

REFERÊNCIAS

ACCORINTE, M. L. et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide cement as pulp-capping agents in human teeth. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 1, p. 1-6, Jan. 2008.

AGAMY, H. A. et al. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotomized primary teeth.com pulpotomia. **Pediatric Dentistry**, v. 26, n. 4, p. 302-309, Jul./Aug. 2004.

AGUILAR, P.; LINSUWANONT, P. Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 5, p. 581-587, May. 2011.

AL-HEZAIMI, K. et al. Human saliva penetration of root canals obturated with two types of mineral trioxide aggregate cements. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 6, p. 453-456, Jun. 2005.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY (AAPD). Guideline on pulp therapy for primary and young permanent teeth. Reference Manual. 2001-2002.

AMORIM, L. F. et al. Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. **Brazilian Dental Journal**, v. 17, n. 4, p. 317-322, May. 2006.

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, May. 2010.

ANTONIAZZI, B. F. et al. Antimicrobial activity of different filling pastes for deciduous tooth treatment. **Brazilian Oral Research**, v. 29, n.1, p. 1-6, Dec. 2015.

AQRABAWI, J. Sealing ability of amalgam, super EBA cement, and MTA when used as retrograde filling material. **British Dental Journal**, v. 188, n. 5, p. 266-268, Mar. 2000.

ASGARY, S.; EGHBAL, M. J.; GHODDUSI, J. Two-year results of vital pulp therapy in permanent molars with irreversible pulpitis: an ongoing multicenter randomized clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 2, p. 635-641, Jan. 2014.

BARR, E. S.; FLATIZ, C. M.; HICKS, M. J. A retrospective radiographic evaluation of primary molar pulpectomies. **Pediatric Dentistry**, v. 13, n. 1, p. 4-9, Jan/Feb. 1991.

BELLOWS, C. G.; AUBIN, J.E.; HEERSCHKE, J. N. Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. **Endocrinology**, v. 121, n. 6, p. 1985-1992, Dec. 1987.

BERGER, J. E. Pulp tissue reaction to formocresol and zinc oxide-eugenol. **Journal of Dentistry for Children**, v. 32, n. 3, p. 13-28, Feb. 1965.

BERGOLI, A. D. et al. Pulp therapy in primary teeth--profile of teaching in Brazilian dental schools. **Journal Clinic of Pediatric Dentistry**, v. 35, n. 2, p. 191-195, Dec. 2010.

BIN, C. V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 4, p. 495-500, Apr. 2012.

BOGEN, G.; KUTTLER, S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 6, p. 777-790, Jun. 2009.

BORTOLUZZI, E. A. et al. Sealing ability of MTA and radiopaque portland cement with or without calcium chloride for root-end filling. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 9, p. 897-900, Sep. 2006.

BUENO, C. R. et al. Biocompatibility and biomineralization assessment of bioceramic-, epoxy-, and calcium hydroxide-based sealers. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, Jun. 2016.

CAMILLERI J. Characterization of modified calcium-silicate cements exposed to acidic environment. **Materials**, v. 62, n. 1, p. 70-75, Sep. 2011.

CAPLAN D. J. et al. Root canal filled versus non-root canal filled teeth: a retrospective comparison of survival times. **Journal of Public Health Dentistry**, v. 65, n. 2, p. 90-96, Sep. 2005.

CASTRO, A. Current concepts in vital pulpotomies in primary teeth. **Journal Michigan Dental Association**, v. 87, n. 1, p. 26-28, Jan. 2005.

CELIK, B. et al. A randomized trial of mineral trioxide aggregate cements in primary tooth pulpotomies. **Journal of Dentistry for Children**, v. 80, n. 3, p. 126-132, Sep/Dec. 2013.

CERQUEIRA, D. F. et al. Cytotoxicity, histopathological, microbiological and clinical aspects of an endodontic iodoform-based paste used in pediatric dentistry: a review. **Journal Clinic of Pediatric Dentistry**, v. 32, n. 2, p. 105-110, Feb. 2008.

COLL J. A. et al. An evaluation of pulp therapy in primary incisors. **Pediatric Dentistry**, v. 10, n. 3, p. 178-184, Sep. 1988.

_____. Predicting pulpectomy success and its relationship to exfoliation and succedaneous dentition. **Pediatric Dentiric**, v. 18, n. 1, p. 57-63, Jan/Feb. 1996.

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

DE ROSSI, A et al. Comparison of pulpal responses to pulpotomy and pulp capping with biodentine and mineral trioxide aggregate in dogs. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 9, p. 1362-1369, Sep. 2014.

DE SOUZA, V.; HOLLAND, R. Treatment of the inflamed dental pulp. **Australian Dental Journal**, v. 19, n. 3, p. 191-196, Jun. 1974.

DESAI, S.; CHANDLER, N. Calcium hydroxide-based root canal sealers: a review. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 4, p. 475-480, Apr. 2009.

DIAS, F. P. **Estudo do hidróxido de cálcio associado ou não à clorexidina como medicação intracanal de dentes permanentes necrosados**. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Fortaleza, 2010.

DUARTE, M. A. et al. pH and calcium ion release of 2 root-end filling material. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 95, n. 3, p. 345-347, Mar. 2003.

ECONOMIDES, N. et al. Experimental study of the biocompatibility of four root canal sealers and their influence on the zinc and calcium content of several tissues. **Journal of Endodontics**, v. 21, n. 3, p. 122-127, Mar. 1995.

ESTRELA, C. et al. Mechanism of action of calcium hydroxide on tissue and bacteria. **Brazilian Dental Journal**, v. 6, n. 2, p. 85-90, Dec. 1995.

FARIA-JUNIOR, N. B. et al. Antibiofilm activity, pH and solubility of endodontic sealers. **International Endodontic Journal**, v. 46, n. 8, p. 755-762, Aug. 2013.

FAVA, L. R. G.; SAUNDERS, W. P. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. **International Endodontic Journal**, v. 32, n.4, p. 257-282, Aug. 1999.

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

FLATIZ, C.M. et al. Radiographic evaluation of pulp therapy for primary anterior teeth. **Journal Dental Children.**, v. 56, n. 3, p. 182-185, May/Jun. 1989.

FOREMAN, P. C.; BARNES, I. E. Review of calcium hydroxide. **International Endodontic Journal**, v. 23, n. 6, p. 283-297, Nov. 1990.

Fransson,H.;Wolf,E.; Petersson,K.Formation of a hard tissue barrier after experimental pulp capping or partial pulpotomy in humans: an updated systematic review. **International Endodontic Journal**, v. 49, n. 6, p. 533-542, Jun. 2016.

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. 6692-6709, Oct. 2011.

FUKS, A. B. Current concepts in vital primary pulp therapy. **European Journal of Paediatric Dentistry**, v. 3, n. 3, p. 115-120, Sep. 2002.

FUKS, A. B. et al. Pulp therapy for the primary and young permanent dentitions. **Dental Clinics of North America**, v. 44, n. 3, p. 571-596, Jul. 2000.

GANDOLFI, M. G. et al. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. **International Endodontic Journal**, v. 43, n.10, p. 917-929, Oct. 2010.

GANDOLFI, M. G. et al. New portland cement–based materials for endodontics mixed with articaine solution: a study of cellular response. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 1, p. 39-44, Jan. 2008.

_____. Setting time and expansion in different soaking media of experimental accelerated calcium-silicate cements and ProRoot MTA. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 108, n. 6, p. 39-45, Dec. 2009.

GERSTENFELD, L. C. et al. Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. **Developmental Biology**, v. 122, n. 1, p. 49-60, Jul. 1987.

GOMES-FILHO, J. E. et al. Glycol methacrylate: an alternative method for embedding subcutaneous implants. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 4, p. 266-268, Apr. 2001.

_____. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of five root canal sealers. **Brazilian Dental Journal**, v. 15, n. 1, p. 30-35, Sep. 2004.

_____. Mineral trioxide aggregate but no light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 1, p. 62-65, Jan. 2008.

_____. Reaction of rat connective tissue to a new calcium hydroxide–based sealer. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 106, n. 2, p. 71-76, Aug. 2008.

_____. A mineral trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 2, p. 256-260, Feb. 2009.

_____. Rat tissue reaction to MTA FILLAPEX®. **Dental Traumatology**, v. 28, n. 6, p. 452-456, Dec. 2012.

GRECH, L.; MALLIA, B.; CAMILLERI, J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. **ista** v. 29, n. 2, p. 20-28, Feb. 2013.

GROSSMAN, L. I. **Endodontic practice**. 10. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1982.

GUEDES PINTO, A. C.; PAIVA, J. G.; BOZZOLA, J. R. Tratamento endodôntico de dentes decíduos com necrose pulpar. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 35, n. 3, p. 240-245, May/Jun. 1981.

HAMMAD, H. M.; HAMADAH, M. A.; AL-OMARI, W. M. Histological evaluation of rat tissue response to GMTA, Retroplast, and Geristore retrograde filling materials. **Australian Endodontic Journal**, v. 37, n. 1, p. 18-25, Apr. 2011.

HAN, L.; OKIJI, T. Bioactivity evaluation of three calcium silicate-based endodontic materials. **International Endodontic Journal**, v. 46, n. 9, p. 808-814, Sep. 2013.

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

HOLAN, G.; EIDELMAN, E.; FUKS, A. B. Long-term evaluation of pulpotomy in primary molars using mineral trioxide aggregate or formocresol. **Pediatric Dentistry**, v. 27, n. 2, p. 129-136, Dec. 2005.

HOLLAND, R.; DE SOUZA, V. Conservative treatment of dental pulp. **Ars. Curandi. Odontol.**, v. 2, n. 2, p. 3-4, Jun/Jul. 1975.

_____. 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, Mar. 1999.

_____. Calcium salts deposition in rat connective tissue after implantation of calcium hydroxide-containing sealers. **Journal of Endodontics**, v. 28, n. 3, p. 173-176, Mar. 2002.

HUTH, K.C. et al. Effectiveness of 4 pulpotomy techniques-randomized controlled trial. **Journal of Dental Research.**, v. 84, n. 12, p. 1144-1148, Dec. 2005.

IWAMOTO, M. et al. Retinoic acid induces rapid mineralization and expression of mineralization-related genes in chondrocytes. **Experimental Cell Research.**, v. 207, n. 2, p. 413-420, Aug. 1993.

JEEVANI, E. et al. Evaluation of sealing ability of MM-MTA, Endosequence, and biodentine as furcation repair materials: UV spectrophotometric analysis. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 17, n. 4, p. 340-343, Jul. 2014.

JUNIOR, E.S.; VITCEL, M. E.; OLIVEIRA, L. B. Evidence of pulpotomy in primary teeth comparing MTA, calcium hydroxide, ferric sulphate, and electrosurgery with formocresol. **European Archives Pediatric Dentistry**, v. 16, n. 4, p. 303-312, Aug. 2015.

KAPLAN, A. E. et al. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 8, p. 527-532, Aug. 2003.

KHASHABA, R. M. et al. The response of subcutaneous connective tissue to newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. **International Endodontic Journal**, v. 44, n. 4, p. 342-352, Apr. 2011.

KING, S. R.; MCWHORTER, A. G.; SEALE, N. S. Concentration of formocresol used by pediatric dentists in primary tooth pulpotomy. **Pediatric Dentistry**, v. 24, n. 2, p. 157-159, Mar/Apr. 2002.

KOGAN, P.; HE, J.; GLICKMAN, G. N.; WATANABE, I. The effects of various additives on setting properties of MTA. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 6, p. 569-572, Jun. 2006.

KUBOTA, K.; GOLDEN, B. E.; PENUGONDA, B. Root canal filling materials for primary teeth: a review of the literature. **Journal of Dentistry Children**, v. 59, n. 3, p. 225-227, May/Jun. 1992.

LAO, M.; MARINO, V.; BARTOLD, P. M. Immunohistochemical study of bone sialoprotein and osteopontin in healthy and diseased root surfaces. **Journal of Periodontology**, v. 77, n. 10, p. 1665-1673, Oct. 2006.

LARA, V. P. et al. Experimental furcal perforation treated with MTA: analysis of the cytokine expression. **Brazilian Dental Journal**, v. 26, n. 4, p. 337-341, Jul/Aug. 2015.

LEE, Y. L. et al. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. **Biomaterials**, v. 25, n. 5, p. 787-793, Feb. 2004.

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

LEONARDO, M. R. et al. Calcium hydroxide root canal sealers-histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 7, p. 428-432, Jul. 1997.

LEWIS, B. Formaldehyde in dentistry: a review for the millennium. **Journal Clinic of Pediatric Dentistry**, v. 22, n. 2, p. 167-177, Jan. 1998.

LOPES, H. P.; SIQUEIRA JR, J. F. **Endodontia: Biologia e Técnica**. 2 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 484 p.

LOURENÇO NETO, N. et al. Immunolocalization of dentin matrix protein-1 in human primary teeth treated with different pulp capping materials. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 104, n. 1, p. 165-169, Jan. 2016.

LUO, Z. et al. Effect of Biodentine™ on the proliferation, migration and adhesion of human dental pulp stem cells. **Journal of Dentistry**, v. 42, n. 4, p. 490-497, Apr. 2014.

MAROTO, M. et al. Dentin bridge formation after mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomies in primary teeth. **American Journal of Dentistry**, v. 18, n. 3, p. 151-154, jun. 2005.

MARQUES, N. C. et al. Rat subcutaneous tissue response to MTA Fillapex® and Portland cement. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 1, p. 10-14, Dec. 2013.

MARTINS, C. M. et al. Hypertension Undermines Mineralization-inducing Capacity of and Tissue Response to Mineral Trioxide Aggregate Endodontic Cement. **Journal of Endodontics**, v. 42, n. 4, p. 604-609, Apr. 2016.

MASS, E.; ZILBERMAN, U. Long-term radiologic pulp evaluation after partial pulpotomy in young permanent molars. **Quintessence International**, v. 42, n. 7, p.547-554, Jul/Aug. 2011.

_____. 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, Jun. 2011.

MATT, G. D. et al. Comparative study of white and gray mineral trioxide aggregate (MTA) simulating a one- or two-step apical barrier technique. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 12, p. 876-879, Dec. 2004.

MENTE, J. et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: long-term results. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 11, p. 1746-1751, Nov. 2014.

MORI, G. G. et al. Evaluation of the diffusion capacity of calcium hydroxide pastes through the dentinal tubules. **Brazilian Oral Research**, v. 23, n. 2, p. 113-118, Apr/Jun. 2009.

_____. Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 9, p. 1485-1488, Sep. 2014.

MORTAZAVI, M.; MESBAHI, M. Comparison of zinc oxide and eugenol, and Vitapex for root canal treatment of necrotic primary teeth. **International Journal of Paediatric Dentistry**, v. 14, n. 6, p. 417-424, Nov. 2004.

NARITA, H. et al. An explanation of the mineralization mechanism in osteoblasts induced by calcium hydroxide. **Acta Biomaterials**, v. 6, n. 2, p. 586-590, Feb. 2010.

NIRANJANI, K. et al. Clinical Evaluation of Success of Primary Teeth Pulpotomy Using Mineral Trioxide Aggregate(®), Laser and Biodentine(TM)- an In Vivo Study. **Journal Clinic Diagnostic Research**, v. 9, n. 4, p. 35-37, Apr. 2015.

NOWICKA, A. et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 6, p. 743-747, Jun. 2013.

NURKO, C.; GARCIA-GODOY, F. Evaluation of a calcium hydroxide/iodoform paste (Vitapex) in root canal therapy for primary teeth. **Journal Clinic of Pediatric Dentistry**, v. 23, n. 4, p. 289-294, Dec. 1999.

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. **Nigerian Journal Clinical Practice**, v. 18, n. 2, p. 292-296, Mar/Apr. 2015.

OLDENBOURG, R. Polarized light microscopy: principles and practice. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2013, n. 11, Nov. 2013.

OWEN, T. A. et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of bone extracellular matrix. **Journal of Cellular Physiology**, v. 143, n. 3, p. 420-430, Jun. 1990.

OZALP, N. et al. Evaluation of various root canal filling materials in primary molar pulpectomies: an in vivo study. **American Journal Dentistry**, v. 18, n. 6, p. 347-350, Dec. 2005.

PAPAGIANNOULIS, L. Clinical studies on ferric sulphate as a pulpotomy medicament in primary teeth. **European Journal Paediatric Dentistry**, v. 3, n. 3, p. 126-132, Sep. 2002.

PAWAR, A. M.; KOKATE, S. R.; SHAH, R. A. Management of a large periapical lesion using Biodentine™ as retrograde restoration with eighteen months evident follow up. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 16, n. 6, p. 573-575, Nov. 2013.

PENG, L. et al. Evaluation of the formocresol versus mineral trioxide aggregate primary molar pulpotomy: a meta-analysis. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 102, n. 6, p. 40-44, Dec. 2006.

_____. Evaluation of formocresol versus ferric sulphate primary molar pulpotomy: a systematic review and meta-analysis. **International Endodontic Journal**, v. 40, n. 10, p. 751-757, Oct. 2007.

_____. Effect of tricalcium silicate on the proliferation and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. **Journal of Endodontics**, v. 37, n. 9, p. 1240- 1246, Sep. 2011.

PRAMILA, R. et al. Pulpectomies in primary mandibular molars: a comparison of outcomes using three root filling materials. **International Endodontic Journal**, v. 49, n. 5, p. 413-421, May. 2016.

PRIMOSCH, R.E. et al. A retrospective assessment of Zinc oxide eugenol pulpectomies in vital maxillary primary incisors successfully restored. **Pediatric Dentistry**, v. 27, n. 6, p. 470-477, Nov/Dec. 2005.

QUINALAN, C. A. et al. In vitro cytotoxicity of a composite resin and compomer. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 1, p. 47–55, Jan. 2002.

RAJASEKHARAN, S. et al. Biodentine material characteristics and clinical applications: a review of the literature. **European Archives Paediatric Dentistry**, v. 15, n. 3, p. 147-158, Jun. 2014.

_____. Efficacy of three different pulpotomy agents in primary molars - A randomised control trial. **International Endodontic Journal**, Feb. 2016. 11. doi: 10.1111/iej.12619. [Epub ahead of print]

REY, C. et al. Structural and chemical characteristics and maturation of the calcium phosphate crystals formed during the calcification of organic matrix synthesized by chicken osteoblasts in cell culture. **Journal Bone Mineralization Research**, v. 10, n. 10, p. 1577-1588, Oct. 1995.

RITWIK, P. A review of pulp therapy for primary and immature permanent teeth. **Journal of the California Dental Association**, v. 41, n. 8, p. 585-595, Aug. 2013.

ROSENDAHL, R.; WEINERT-GRODD, A. Root canal treatment of primary molars with infected pulps using calcium hydroxide as a root canal filling. **Journal Clinic of Pediatric Dentistry**, v. 19, n. 4, p. 255-258, Jan. 1995.

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

SANDERS, J. E.; ROCHEFORT, J. R. Fibrous encapsulation of single polymer depends on their vertical dimension in subcutaneous tissue. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 67, n. 4, p. 1181-1187, Dec. 2003.

SANTOS, A. D. et al. Physico-chemical properties of MTA and a novel experimental cement. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 7, p. 443-447, Jul. 2005.

SEUX, D. et al. Odontoblast-like cytodifferentiation of human dental pulp cells in vitro in the presence of a calcium hydroxide-containing cement. **Archives of Oral Biology**, v. 36, n. 2, p. 117-128, Sep. 1991.

SIPERT, C. R. et al. In vitro antimicrobial activity of Fill Canal, Sealapex, Mineral Trioxide Aggregate, Portland cement and EndoRez. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 8, p. 539-543, Aug. 2005.

SLUYK, S. R.; MOON, P. C.; HARTWELL, G. R. Evaluation of setting properties and retention characteristics of mineral trioxide aggregate when used as a furcation perforation repair material. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 11, p. 768-771, Nov. 1998.

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

_____. Ca(OH)₂ pulpotomy in primary teeth. Part I: internal resorption as a complication following pulpotomy. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 106, n. 2, p. 94-98, Aug. 2008.

SRINIVASAN, D.; JAYANTHI, M. Comparative evaluation of formocresol and mineral trioxide aggregate as pulpotomy agents in deciduous teeth. **Indian Journal Dental Research**, v. 22, n. 3, p. 385-390, May/Jun. 2011.

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. **European Archives Paediatric Dentistry**, v. 16, n. 4, p. 303-312, Aug. 2015.

SUBRAMANIAM, P. et al. Mineral trioxide aggregate as pulp capping agent for primary teeth pulpotomy: 2 year follow up study. **Journal Clinic of Pediatric Dentistry**, v. 33, n. 4, p. 311-314, Apr. 2009.

TAGGER, M.; TAGGER, E.; KFIR, A. Release of calcium and hydroxyl ions from set endodontic sealers containing calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 14, n. 12, p. 588-591, Dec. 1988.

THOMAZ, A. M. et al. Elimination of infection in pulpectomized deciduous teeth: a short-term study using iodoform paste. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 20, n. 5, p. 233-235, May. 1994.

THOMSON, T. S. et al. Cementoblasts maintain expression of osteocalcina in the presence of mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 6, p. 407-412, Jun. 2003.

TORABINEJAD , T. F.; WATSON, T. F.; PITT FORD, T. R. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. **Journal of Endodontics**, v. 19, n. 12, p. 591-595, Dec. 1993.

_____. Dye leakage of four root end filing materials: effects of blood contamination. **Journal of Endodontics**, v. 20, n. 4, p. 159-163, Apr. 1994.

_____. Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used rootend filling materials. **Journal of Endodontics**, v. 21, n. 6, p. 295-299, Jun. 1995.

_____. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **Journal of Endodontics**, v. 21, n. 7, p. 349-353, Jul. 1995.

_____. Tissue reaction to implanted root-end filling materials in the tibia and mandible of guinea pigs. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 7, p. 468-471, Jul. 1998.

_____. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. **Journal of Endodontics**, v. 25, n. 3, p. 197-205, Mar. 1999.

TORNECK, C. D. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants part I. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 21, n. 3, p. 379-387, Mar. 1966.

TRAIRATVORAKUL, C.; CHUNLASIKAIWAN, S. Success of pulpectomy with zinc oxide-eugenol Vs calcium hydroxide/iodoform paste in primary molars: a clinical study. **Pediatric Dentistry**, v. 30, n. 4, p. 303-308, Jul/Aug. 2008.

TRONSTAD L. et al. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. **Journal of Endodontics**, v. 7, n. 1, p. 17-21, Jan. 1981.

UENO, K. et al. Interleukin-4 enhances in vitro mineralization in human osteoblast-like cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 189, n. 3, p. 1521-1526, Dec. 1992.

VAN AMERONGEN, W. E.; MULDER, G. R.; VINGERLING, P. A. Consequences of endodontic treatment in primary teeth. Part I: A clinical and radiographic study of the influence of formocresol pulpotomy on the life-span of primary molars. **Journal Dentistry Children**, v. 53, n. 5, p. 364-370, Sep/Oct. 1986.

VIOLA, N. V. et al. Biocompatibility of an experimental MTA sealer implanted in the rat subcutaneous: quantitative and immunohistochemical evaluation. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 100, n. 7, p. 1773-1781, Oct. 2012.

WALIA, T. Pulpectomy in hyperemic pulp and accelerated root resorption in primary teeth: a review with associated case report. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v. 32, n. 3, p. 255-261, Jul/Sep. 2014.

WALTIMO, T. M. et al. Clinical performance of 3 endodontic sealers. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 92, n. 1, p. 89-92. Jul. 2001.

WITHERSPOON, D. E. Vital pulp therapy with new materials: new directions and treatment perspectives-permanent teeth. **Pediatric Dentistry**, v. 30, n. 3, p. 220-224, May/Jun. 2008.

YALTIRIK, M. H. et al. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 2, p. 95-99, Feb. 2004.

ZMENER, O.; GUGLIELMOTTI, M. B.; CABRINI, R. L. Tissue response to an experimental calcium hydroxide-based endodontic sealer: a quantitative study in subcutaneous connective tissue of the rat. **Dental Traumatology**, v. 6, n. 2, p. 66-72, Apr. 1990.

ANEXO**ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 692/2015, sob responsabilidade de Naiana Viana Viola Nicoli, referente ao projeto "Avaliação da resposta tecidual e mineralização de dois materiais experimentais a base de MTA para terapia endodôntica em dentes decíduos", está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFAL).

Alfenas, 11 de janeiro de 2016.

Prof.ª Dr.ª Estela Regina de Oliveira

Presidente CEUA/UNIFAL