

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

NAYARA NERY DE OLIVEIRA CUNHA

**ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE E METALOPROTEINASE 8 DA MATRIZ EM
RESPOSTA A DIFERENTES MATERIAIS CAPEADORES PARA PULPOTOMIAS EM
RATOS WISTAR**

Alfenas/MG

2015

NAYARA NERY DE OLIVEIRA CUNHA

**ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE E METALOPROTEINASE 8 DA MATRIZ EM
RESPOSTA A DIFERENTES MATERIAIS CAPEADORES PARA PULPOTOMIAS EM
RATOS WISTAR**

Dissertação apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG. Área de concentração: odontologia.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Ana Beatriz da Silveira Moretti

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão

Alfenas/MG

2015

NAYARA NERY DE OLIVEIRA CUNHA

**ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE E METALOPROTEINASE 8 DA MATRIZ EM
RESPOSTA A DIFERENTES MATERIAIS CAPEADORES PARA PULPOTOMIAS EM
RATOS WISTAR**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG. Área de concentração: odontologia.

Aprovada em:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Prof.

Instituição:

Assinatura:

Ao meu marido, **Gustavo de Oliveira Cunha**, por fazer minha vida mais feliz e completa, por me apoiar, incentivar e acreditar na minha capacidade. Sabia que sem o seu amor nada valeria a pena. Obrigada por estar ao meu lado sempre.

Aos meu pais, **Maria de Fátima Nery Dias e Ronaldo de Oliveira Dias**, por estarem sempre presentes, me incentivando e apoiando nas minhas decisões, além de serem meus exemplos de humildade e honestidade. Agradeço a vocês pelo amor incondicional, por sempre me ensinarem a caminhar segundo os princípios de Deus e pelo sacrificio em prol dos meus sonhos.

Ao meu querido irmão, **Diogo Nery de Oliveira Dias**, que esteve presente em toda minha caminhada e vibrando com cada conquista. Agradeço pela compreensão e amizade. Estarei sempre torcendo pelos seus projetos e anseios. Acredito que tudo que sonhares você conquistará.

Aos meus sogros, **Santa de Oliveira Cunha e Cairo Luiz da Cunha**, e meus cunhados **Adrielly Borges Ferreira, Henrique de Oliveira Cunha, Daniela de Oliveira Cunha Schimitt e Guilherme Valias Schimitt**, vocês se tornarão minha família e poder contar com o apoio e carinho de vocês foi sempre essencial.

Aos meus sobrinhos, **Guilherme e Bianca**, sem vocês a vida não teria a mesma alegria. Vocês são anjinhos que Deus presenteou nossa família para sabermos como é sentir o amor mais puro e verdadeiro.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida, família e presença sempre. Obrigada por guiar, me proteger e iluminar meu caminho, pela esperança que animou meus passos, pelos exemplos que recebi, pelo amor que encontrei nas pessoas e pelo conforto encontrado nos momentos difíceis. Obrigada por esta conquista.

À **Maria**, por me ensinar a caminhar e confiar em todos os momentos. Obrigada por passar na frente em todas as minhas decisões e por cuidar de tudo que não está ao meu alcance. Sei que está sempre ao meu lado me acariciando e protegendo, sou grata por tudo.

A minha querida orientadora **Prof^a. Dr^a. Ana Beatriz da Silveira Moretti**, por transmitir seus conhecimentos e experiências profissionais e de vida. Obrigada pelo carinho de uma verdadeira mãe, por sempre confiar que a vontade de Deus é superior, por sempre acreditar que eu seria capaz desde a graduação sempre caminhando e me incentivando para que chegasse até aqui, por sempre me levantar e estimular mesmo quando aparentava desânimo.

Você é um exemplo de ser humano íntegro profissionalmente e pessoalmente, me inspiro muito em sua dedicação plena e amor com que realiza seu trabalho de ensinar. Expresso meu profundo agradecimento que sempre serão pequenos diante de tamanho ensinamento por você ofertado.

Agradeço pelas palavras, tempo e atenção dedicados a mim e pela orientação na minha formação profissional. Tenho muito orgulho de ser sua aluna. Agradeço a Deus por ter colocado você em meu caminho!

A minha co-orientadora **Prof^a. Dr^a. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão**, 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 diretamente durante os experimentos. Obrigada por me incentivar e me ajudar a crescer sempre. Obrigada por seus conselhos, ensinamentos e orientações que me estimulou a sempre pesquisar e mergulhar no

desconhecido para chegar até aqui. Sua inteligência e profissionalismo são exemplos que levarei por toda minha caminhada. Palavras sempre serão pequenas para agradecer tamanha disponibilidade e empenho. Agradeço a Deus por ter colocado você em minha caminhada, sua orientação e colaboração foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

A querida **Profª. Drª. Vivien Thiemy Sakai**, por incentivar sempre o aprimoramento do aprendizado, pela coordenação do curso de mestrado em Ciências Odontológicas, pelo profissionalismo, competência e dedicação que são admiráveis em sua personalidade. Serei sempre grata pelos ensinamentos e pela contribuição na minha formação profissional. Obrigada pela convivência sempre agradável e atenciosa e por compartilhar suas experiências profissionais e intelectuais. Agradeço a Deus pela oportunidade de trabalhar com você!

A querida amiga **Marina Azevedo Junqueira**, companheira da graduação e do mestrado, palavras sempre serão poucas para agradecer tamanha amizade e dedicação. Obrigada pelo companheirismo, pelos momentos felizes e tristes, pelas conquistas, pela enorme contribuição, por saber que sempre poderei contar com você. Agradeço muito a Deus por ter colocado você em minha vida e que ele te proteja e abençoe seus caminhos. Amizades assim são para poucos. Obrigada por me ajudar sempre e por enriquecer minha vida. Conte sempre comigo!

Ao **Prof. Dr. Rafael Tobias Moretti** e a **Laís da Silveira Terra Santos**, pela paciência e disposição em me ajudar diariamente nos procedimentos do biotério.

Aos demais professores da Odontopediatria **Prof. Dr. Edmêr Silvestre Pereira Junior**, **Profª. Drª. Ana Paula Fernandes**, pela transmissão de conhecimento e disponibilidade para os ensinamentos durante o curso de pós-graduação.

A querida **Lidiane Lucas Costa e Silva**, pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos clínicos, além de acompanhar ativamente a realização dos mesmos, sempre tentando nos estimular e engrandecer.

A **Profª. Drª Gisele Faria e a seus orientados** pela disponibilidade em nos acolher de forma tão receptiva, além de nos explicar e demonstrar a metodologia para a realização dos procedimentos no biotério.

Ao **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann**, pela oportunidade de realizar um projeto de iniciação científica que me despertou o interesse pela pós-graduação. Pelo incentivo com que me ajudou a crescer nesses anos de convivência e pela disponibilidade constante em ajudar e transmitir seu conhecimento.

Ao **Prof. Dr. Denismar Alves Nogueira**, pelo empenho e dedicação para realização das análises estatísticas dessa pesquisa. Obrigada pela disponibilidade e atenção.

A **Profª Drª Marina Lara de Carli**, pelo incentivo, amizade e conselhos. Obrigada por transmitir um pouco da sua experiência e conhecimento. Sua competência e seriedade são um exemplo para mim. Que Deus abençoe seus caminhos.

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 **colegas de mestrado**, por dividirem comigo esta etapa. A convivência com vocês me engrandeceu e tornou o aprendizado mais sutil e prazeroso.

Aos alunos **Jéssica, Flávio e Isabela**, pela dedicação e colaboração com a pesquisa de mestrado. Torcerei sempre pelo sucesso de vocês. Pela determinação e responsabilidade que vocês demonstraram neste período com que convivemos o futuro de vocês será repleto de conquistas.

À **banca examinadora**, pelo aceite do convite, presença e contribuição para correção e finalização desta tese.

Aos **Funcionários da Odontopediatria e da Faculdade de Odontologia**, pela convivência agradável e dedicação.

Ao **Laboratório de Bioquímica da UNIFAL-MG e seus funcionários**, pelo auxílio e acolhimento, por ceder seus equipamentos e dependências para a realização deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de bioquímica, **Gabriel Moraes e George Veloso**, que participaram ativamente de todas as etapas deste trabalho, em especial da fase laboratorial. Obrigada pela paciência, amizade, parceria e por compartilharem o conhecimento de vocês com uma pessoa leiga no assunto de forma tão clara e concisa. Sem a ajuda de vocês, a disponibilidade e suas valiosas opiniões, todo o meu trabalho seria mais difícil. Obrigada por tornarem o ambiente de trabalho sempre muito agradável.

Aos **Funcionários da biblioteca**, pelo auxílio e atenção.

Aos **Funcionários do Biotério Central da UNIFAL-MG**, por estarem sempre dispostos a ajudar e solucionar os problemas.

Aos **Funcionários da pós-graduação da UNIFAL-MG**, 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.

Aos **pacientes** que nos proporcionaram realizar nosso trabalho sem os quais nada teria se concretizado. Em especial às **crianças**, que são o motivo para a minha motivação e dedicação no campo da Odontopediatria.

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

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Alfenas, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, na pessoa do senhor diretor, ***Prof. Dr. Edmêr Silvestre Pereira Junior,***

À comissão de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia de Alfenas, Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, representada pelo Presidente ***Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann.***

“Muda-se o ser, muda-se a confiança;
Todo o mundo é composto de mudança,
Tomando sempre novas qualidades.
Continuamente vemos novidades,
Diferentes em tudo da esperança;
Do mal ficam as mágoas na lembrança,
E do bem.....as saudades”.
(Luís de Camões)

RESUMO

As reações iniciais dos materiais capeadores sobre o tecido pulpar não estão bem elucidadas. A metaloproteinase da matriz (MMP) atua no remodelamento da matriz extracelular e a mieloperoxidase (MPO) está associada com infiltração neutrofílica nos tecidos. O objetivo deste estudo foi avaliar polpas de molares de ratos após pulpotomia com agregado trióxido mineral (MTA), Biodentine™ (BDT) e Hidróxido de cálcio (HC) associado à solução salina estéril, nos períodos de 24, 72 horas, 7 e 15 dias correlacionando a atividade da MPO com neutrófilos ativos e atividade de MMP8 (EC3.4.24.34) com remodelação tecidual. Foram utilizados 36 ratos Wistar, distribuídos aleatoriamente nos grupos controle, MTA, BDT e HC e subdivididos conforme o tempo de 24, 72 horas, 7 e 15 dias após pulpotomia e um foi utilizado para o controle.. A atividade da MMP8 foi avaliada utilizando a técnica de fluorescência e a atividade de MPO foi determinada utilizando o ensaio de MPO. Houve diminuição gradativa da atividade de MPO e MMP8 para o MTA ao longo dos períodos experimentais ($p < 0.05$), ao contrário do BDT e HC que apresentaram aumento da atividade aos 7 e 15 dias ($p < 0.05$). O MTA demonstrou decréscimo de valores de MPO e MMP8 indicando atividade potencialmente curativa no tecido pulpar. Já BDT e HC apresentaram aumento do potencial irritante dificultando o processo cicatricial.

Palavras-chave: Pulpotomia. Mieloperoxidase. Metaloproteinase 8 da Matriz.

ABSTRACT

The initial reactions of capping materials on pulp tissue are not well understood. The matrix metalloproteinases-8 (MMP8) acts on remodeling the extracellular matrix and myeloperoxidase (MPO) is associated to neutrophil infiltration in the tissues. This study aimed to evaluate the pulp tissue of rats' molars after pulpotomies with mineral trioxide aggregate (MTA), BiodentineTM (BDT) and calcium hydroxide (CH) associated with sterile saline solution, at 24 and 72 hours, 7 and 15 days through correlating MPO activity with active neutrophils and MMP8 (EC3.4.24.34) activity with tissue remodeling. Thirty six Wistar rats were randomly distributed into groups: control, MTA, BDT and CH and subdivided according to the study period of 24 and 72 hours, 7 and 15 days after pulpotomy and one was used for the control. MMP8 activity was evaluated through fluorescence technique and MPO activity was determined using the MPO assay. A gradual decrease of MPO and MMP8 activity occurred in group MTA over the experimental periods ($p < .05$). Unlikely, groups BDT and CH exhibited an increase in the activity at 7 and 15 days ($p < .05$). MTA demonstrated a decrease in MPO and MMP8 values indicating a potentially curative activity in pulp tissue. Conversely, BDT and CH showed the increasing of the irritating potential which makes difficult the healing process.

Key words: Pulpotomy. Myeloperoxidase. Matrix Metalloproteinase 8.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações dos pontos da curva padrão de BSA.....	53
Tabela 2 - Especificações dos pontos da curva padrão para MPO.....	55
Tabela 3 - Análise estatística da relação entre os tratamentos no decorrer dos tempos experimentais para os valores de atividade de MPO/proteína.....	56
Tabela 4 - Análise estatística da relação entre os tratamentos no decorrer dos tempos experimentais para os valores de atividade de MMP8/proteína.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da estrutura básica de MMP.....	33
Figura 2 -	Ativação do precursor MMP é iniciada pela abertura do sítio de cisteína.....	34
Figura 3 -	Modelo da cinética enzimática da MPO.....	40
Figura 4 -	Mesa operatória e imobilização e manutenção da boca aberta do animal após anestesia geral.....	45
Figura 5 -	Aspecto inicial do primeiro molar inferior e abertura coronária em alta rotação com a broca diamantada 1011.....	45
Figura 6 -	Exposição pulpar após o uso de broca de aço em baixa rotação e aspecto da abertura coronária após a remoção do tecido pulpar coronário e controle da hemorragia.....	46
Figura 7 -	Capeamento com MTA cinza.....	46
Figura 8 -	Capeamento com BDT.....	46
Figura 9 -	Capeamento com HC associado a solução salina estéril.....	47
Figura 10 -	Aspecto do tecido pulpar após coleta para análise.....	47
Figura 11 -	Curva padrão de BSA.....	52
Figura 12 -	Curva padrão para MPO.....	54
Figura 13 -	Representação gráfica da análise estatística da relação entre os tratamentos no decorrer dos tempos experimentais para os valores de atividade de $\sqrt{\text{MPO/proteína}}$	56
Figura 14 -	Representação gráfica do valor da atividade enzimática de MPO por proteína nos grupos de tratamentos.....	57
Figura 15 -	Representação gráfica das funções de regressão linear ajustadas da variável tempo para cada tratamento para valor da atividade enzimática de MPO por proteína.....	58
Figura 16 -	Cinética enzimática temporal da atividade de MMP8 em polpa dentária de ratos nos grupos de 24 e 72 horas, 7 e 15 dias para o grupo MTA e BDT.....	60
Figura 17 -	Cinética enzimática temporal da atividade de MMP8 em polpa dentária de ratos nos grupos de 24 e 72 horas, 7 e 15 dias tratados com HC.....	61
Figura 18 -	Representação gráfica da análise estatística da relação entre os	

	tratamentos no decorrer dos tempos experimentais para os valores de atividade de MMP8/proteína.....	62
Figura 19 -	Representação gráfica do valor da atividade enzimática de MMP8 por proteína nos grupos de tratamentos.....	63
Figura 20 -	Representação gráfica das funções de regressão linear ajustadas a cada tratamento ao longo do tempo de estudo para valor da atividade enzimática de MMP8 por proteína.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
µl	Microlitros
µM	Micromolar
BDT	Biodentine
BSA	Albumina bovina
cel	Célula
CO ₂	Dióxido de carbomo
d	Dias
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNP	2,4-Dinitrofenol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramas
GMTA	Agregado de trióxido mineral cinza
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HC	Hidróxido de cálcio
HCl	Ácido clorídrico
HOCl	Ácido hipocloroso
kg	Kilograma
Ltda.	Limitada
M	Molar
mAU	Mili absorvância
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar

mm	milímetro
MMP8	Metaloproteinases 8 da Matriz
MMPs	Metaloproteinases da Matriz
MPO	Mieloperoxidase
MTA	Agregado de trióxido mineral
n°	Número
nm	Nanometro
PBS	Soro bovino fetal
ph	Potencial hidrogeniônico
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SOD	Superóxido dismutase
TIMPs	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
TMB	3',5, 5'-Tetrametilbenzidina
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
WMTA	Agregado de trióxido mineral branco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	PROPOSIÇÃO.....	23
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1	POLPA DENTÁRIA.....	24
3.2	PULPOTOMIA.....	25
3.3	MATERIAIS CAPEADORES.....	26
3.3.1	Agregado de trióxido mineral (MTA).....	27
3.3.2	Biodentine (BDT).....	28
3.3.3	Hidróxido de Cálcio(HC).....	30
3.4	METALPROTEINASE DA MATRIZ (MMP).....	31
3.5	MILOPEROXIDASE(MPO).....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1	COMITÊ DE ÉTICA.....	42
4.2	SELEÇÃO DA AMOSTRA E DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS.	42
4.3	PROCEDIMENTO OPERATÓRIO.....	43
4.4	EUTANÁSIA.....	48
4.5	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANALISES BIOQUÍMICAS DE MPO E MMP8.....	48
4.6	MILOPEROXIDASE (MPO).....	48
4.6.1	Curva Padrão.....	49
4.7	METALOPROTEINASE 8 DA MATRIZ (MMP8).....	50
4.8	ENSAIO DE INIBIÇÃO DA METALOPROTEINASE 8 DA MATRIZ (MMP8).....	50
4.9	ANÁLISES DAS PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE BRADFORD.....	51
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51

5	RESULTADOS.....	52
5.1	BRADFORD.....	52
5.2	MPO.....	54
5.3	MMP8.....	59
5.4	ENSAIO DE INIBIÇÃO DAS MMP8.....	64
5.5	CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS DE MPO E MMP8.....	64
6	DISCUSSÃO.....	65
7	CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS.....	81
	ANEXO.....	96

1 INTRODUÇÃO

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo, de origem mesenquimal, constituída de células, substância fundamental, fibras, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Como ocupa a posição central do dente é praticamente toda envolta pela dentina (HANNAS et al., 2007). A polpa dental humana parece ter uma resposta defensiva ampla por células inflamatórias envolvendo células imunológicas assim como em outros tecidos (IZUMI et al., 1995). Dessa forma, a presença de determinados tipos celulares e suas principais funções tem um papel importante para que o processo inflamatório pulpar exerça sua função sem lesar ao extremo o tecido.

Em condições de normalidade, a polpa apresenta uma elevada capacidade de defesa e reparo e, frente a uma agressão, como o estabelecimento e progressão da cárie na superfície dentinária, o mecanismo de defesa pode ser evidenciado através de três formas que podem ocorrer isoladas ou em conjunto: (1) a formação de esclerose dentinária; (2) formação de dentina reacional ou reparadora; (3) indução de um processo inflamatório que pode levar tanto ao reparo quanto à necrose da polpa dentária (TZIAFAS; SMITH; LESOT, 2000).

A resposta protetora dos tecidos, de uma maneira geral, é caracterizada pelo processo inflamatório que tem como objetivo livrar o organismo da causa inicial e das consequências de uma lesão celular. Essa resposta ocorre em tecidos conjuntivos vascularizados, envolvendo mediadores químicos, células imunológicas e inflamatórias como neutrófilos, macrófagos, linfócitos, basófilos, eosinófilos, mastócitos e plasmócitos (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A inflamação pulpar geralmente começa com a invasão de neutrófilos na polpa adjacente à infecção ou na dentina termicamente ou quimicamente afetada, o processo de necrose gradual é iniciado pela formação de microabscessos. Estes microabscessos e o tecido necrosado são invadidos por bactérias que desencadeiam ainda mais a decomposição do tecido. Com base nesta observação histológica, é concebível que as enzimas dos neutrófilos envolvidos com a lise dos tecidos moles podem ser úteis como marcadores moleculares de inflamação pulpar (HANNAS et al., 2007; ZEHNDER; WEGEHAUPT; ATTIN, 2011). Entretanto, como qualquer outro processo inflamatório, a pulpíte está associada à degradação tecidual. A degradação dos componentes da matriz extracelular pode ser feita

através de enzimas, conhecidas como Metaloproteínases da Matriz (MMPs) (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

A destruição da proteína da matriz extracelular ocorre na inflamação pulpar e o *turn-over*, ou seja, a renovação da matriz requer a atividade de diferentes endopeptidases atuando em uma variedade de proteínas distintas. As MMPs são assim denominadas em função da dependência de íons metálicos para a sua atividade catalítica, são formadas por uma família de endopeptidases zinco-cálcio dependentes, responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular como as colagenases e as gelatinases. Elas estão envolvidas no processo de remodelação normal como o desenvolvimento embrionário, involução pós-parto do útero, remodelação óssea, cicatrização de feridas, e diversos processos de doenças como a destruição da articulação em artrite reumatoide e osteoartrite, invasão tumoral e periodontite (STOCKER et al., 1995; HANNAS et al., 2007; ACCORSI-MENDONÇA et al, 2008; ACCORSI-MENDONÇA et al, 2013). A polpa dental produz MMPs que medeiam a degradação das membranas basais e da matriz extracelular na cicatrização de processos de degeneração (FERRACANE; COOPER; SMITH, 2010).

As MMPs são subdivididas de acordo com seu substrato, sendo as Metaloproteínases 8 da Matriz (MMP8) (EC3.4.24.34) conhecidas como colagenase tipo II, por degradar colágeno. Acredita-se que a MMP8 pode estar confinada originalmente nos neutrófilos, mas recentemente estudos têm indicado que ela pode ser expressa em outros tipos celulares, como condrócitos articulares, fibroblastos sinoviais, células endoteliais, odontoblastos e células pulpares dentais (PALOSAARI, 2000; WAHLGREEN et al., 2002; MATSUI et al., 2011).

Mieloperoxidase (MPO) é encontrada em grânulos primários de neutrófilos. Foi estabelecido que o nível de atividade de MPO é diretamente correlacionada com o número de leucócitos polimorfonucleares (PMN) nos tecidos e, portanto, a atividade de MPO é utilizada em estudos para avaliar o grau de reação inflamatória. Dado que os níveis elevados de MPO representam a extensão do número de PMN nos tecidos, a determinação da MPO pode ser uma valiosa ferramenta para avaliar o grau de inflamação pulpar (MARCACCINI et al., 2010; ACCORSI-MENDONÇA et al, 2013).

A pulpotomia é uma técnica que consiste na remoção do tecido pulpar coronário inflamado com manutenção da integridade da polpa radicular. O tecido

pulpar remanescente deve ser protegido com um material capeador que preserve sua vitalidade, estimulando o processo de reparo e a formação de tecido mineralizado sobre o mesmo, mantendo o tecido pulpar radicular com estrutura e funções normais (BJØRNDAL; MJÖR, 2001; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013). A interação entre os materiais dentários em contato com o tecido pulpar é influenciada por muitos fatores incluindo a composição do material, a concentração dos componentes e produtos de degradação, e a capacidade do tecido para responder a estes agentes (FERRACANE; COOPER; SMITH, 2010). O controle da infecção e biocompatibilidade dos materiais de capeamento pulpar são fatores importantes no resultado do tratamento (BJØRNDAL; MJÖR, 2001; TRAN et al., 2012).

Visando ampliar o conhecimento sobre o mecanismo de ação, vantagens, desvantagens e indicação dos materiais capeadores pulpares, estudos clínicos e laboratoriais para o desenvolvimento e testes destes agentes têm sido constantes na literatura (DOMINGUEZ et al., 2003; MORETTI et al., 2008; SAKAI et al., 2009; BLANCHARD; BOYNTON, 2010; SEALE; COLL, 2010; GODHI, SOOD, SHARMA, 2011; CARDOSO-SILVA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013). Alguns exemplos de materiais são o agregado de trióxido mineral (MTA) (ARENS; TORABINEJAD, 1996; BODEM et al., 2004; CAMILLERI et al., 2004; BARBOSA SILVA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008; MORETTI et al., 2008; SAKAI et al., 2009), biodentine (BDT) (DARVELL; WU, 2011; LAURENT; CAMPS; ABOUT, 2012; KOUBI et al., 2013; VILLAT et al., 2013) e o hidróxido de cálcio (HC) associado a solução salina estéril (CAVALCANTI; RODE; MARQUES, 2005; MORETTI et al., 2008; VILLAT et al., 2010; MOHAMMADI; DUMMER, 2011), porém, os inúmeros materiais disponíveis no mercado e utilizados em pulpotomias de dentes decíduos não preenchem todos os requisitos, o que gera dúvidas quanto à escolha do agente capeador ideal.

Usar proteínas marcadoras de neutrófilos para avaliar a saúde pulpar parece ser uma abordagem promissora, porque a quantidade destas células é positivamente correlacionada com o estado de inflamação pulpar tal como avaliado histologicamente, além de distinguir as formas ativas das inativas (ACCORSI-MENDONÇA et al, 2013).

Algumas reações em longo prazo do tecido pulpar frente a materiais capeadores utilizados em odontologia têm sido avaliadas. No entanto, as reações iniciais dos materiais capeadores sobre o tecido pulpar ainda não estão elucidadas

(SHAHI et. al., 2010). Para melhorar o resultado clínico, o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na cicatrização pulpar deve ser melhor compreendido, e novos biomateriais devem ser desenvolvidos com base nestes resultados (ZANINI et al., 2012). Acredita-se que as falhas de pulpotomias com utilização de alguns materiais podem estar associadas a reações inflamatórias agudas subclínicas. Por fatores éticos, estudos em dentes decíduos humanos não possibilitam avaliar as reações iniciais que ocorrem quando da colocação de um material capeador sobre o remanescente pulpar radicular, já que os mesmos não podem e não devem ser extraídos logo após o tratamento de pulpotomia. Portanto, justifica-se o modelo em animais para avaliação das respostas celulares iniciais.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi de avaliar polpas de molares de ratos após pulpotomia com Agregado de trióxido mineral, Biodentine e Hidróxido de cálcio associado à solução salina estéril, nos períodos de 24 e 72 horas, 7 e 15 dias quanto a atividade colagenolítica de metaloproteinase de matrix 8 e atividade da mieloperoxidase para identificar a presença de células neutrofílicas ativas na polpa.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 POLPA DENTÁRIA

A polpa dentária é um tecido conjuntivo frouxo, de origem mesenquimal que contém células especializadas, dispostas periféricamente e em contato direto com a matriz dentinária, motivo pelo qual dentina e polpa devem ser consideradas uma entidade funcional (HYMAN; COHEN, 1984; HANNAS et al., 2007). Sua região central é rica em vasos sanguíneos, fibras nervosas de função sensorial (fibras mielínicas) e mecânica (fibras amielínicas), entremeados por tecido conjuntivo rico em fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas (AUGSBURGER; PETERS, 1981). A polpa contém também uma matriz extracelular contendo colágeno, incluindo os tipos I, III, V, e VI, fibronectina, e muitos glicosaminoglicanos encontrados como proteoglicanos (FERRACANE; COOPER; SMITH, 2010).

O tecido pulpar apresenta várias funções como nutrição das células, formação da dentina pela ação dos odontoblastos, registrar sensações dolorosas e ainda, é responsável pelo processo de defesa com a presença de células que impedem ou retardam a destruição pulpar. A formação da dentina começa no momento em que as células mesenquimais periféricas se diferenciam em odontoblastos iniciando a deposição de matriz de colágeno em uma sequência de deposição/mineralização que termina com a formação do elemento dentário. Mesmo após estes eventos iniciais, a polpa continua a produção fisiológica de dentina durante o crescimento dentário. Os odontoblastos mantêm o processo continuamente dentro do novo tecido criando canais que são responsáveis pela nutrição dentinária enquanto a polpa estiver biologicamente ativa. O transporte de fluídos e nutrientes mantém a vitalidade pulpar e fornece a resistência necessária para neutralizar a tensão mastigatória na dentina. A polpa também é responsável pela resposta a diferentes estímulos, a ação defensiva inclui vasodilatação e permeabilidade dos vasos sanguíneos, culminando com a presença de células inflamatórias. Quando o estímulo não excede a capacidade reparativa, modificações no complexo dentinopulpar podem ocorrer, incluindo o reparo (MODENA et al., 2009).

É amplamente aceito que o complexo dentinopulpar responde ao estímulo cariogênico, exibindo uma variedade de reações interrelacionadas de defesas

(KAMAL et al., 1997). Após a ocorrência das lesões, as células tronco-mesenquimais da polpa têm a capacidade intrínseca de reparação se diferenciando em odontoblastos e produzindo diferentes proteínas da matriz de dentina durante a cicatrização de feridas, sendo assim, nem todas as reações inflamatórias resultam em danos permanentes (MODENA et al., 2009).

É provável que cada passo nesse processo de reparação seja fortemente controlado pelo equilíbrio entre moléculas bioativas liberadas pela dentina e polpa, de forma que, quando o equilíbrio é rompido, o processo de reparo não se viabiliza (MAGLOIRE et al., 2001). Dessa forma, a presença de determinados tipos celulares e suas principais funções tem um papel importante para que o processo inflamatório pulpar exerça sua função sem lesar irreversivelmente o tecido. Por ser assim, o conhecimento da ação das MMPs e MPO na polpa é importante para a compreensão dos eventos moleculares na inflamação pulpar.

3.2 PULPOTOMIA

A preservação dos dentes decíduos antes do irrompimento dos dentes permanentes é essencial, pois ajudam a preservar a forma da arcada dentária e as funções do sistema estomatognático, mantêm o espaço entre os dentes, previnem a instalação de hábitos deletérios e proporciona o crescimento facial normal (CAICEDO et al., 2006; FUKS, 2008; BLANCHARD; BOYNTON, 2010; SEALE; COLL, 2010; GODHI, SOOD, SHARMA, 2011; HUTH et al., 2012). Sendo assim, é de grande importância a realização de um tratamento mais conservador, a fim de manter a integridade do órgão pulpar (HUNTER, 2003).

Pulpotomia é o procedimento clínico aceito para o tratamento de dentes com inflamação da polpa coronária causada pela cárie ou trauma sem envolvimento da polpa radicular sem sinais ou sintomas de degeneração (AGAMY et al., 2004; HUTH et al., 2005; MAROTO et al., 2005; SAKAI et al., 2009; LIN et al., 2014). A pulpotomia e o capeamento pulpar são técnicas que tem por finalidade preservar a vitalidade do tecido pulpar, evitando assim procedimentos endodônticos mais invasivos (BARBOSA SILVA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008). O procedimento se baseia na lógica de que o tecido pulpar radicular é saudável ou é capaz de curar após amputação cirúrgica do tecido pulpar coronário inflamado (FUKS, 2008; SONMEZ; SARI; CETINBAS, 2008). A cura do tecido pulpar envolve o recrutamento de células

tronco-mesenquimais para o local ferido e sua conseqüente proliferação e diferenciação em células odontoblásticas (TRAN et al., 2012). Estas células segregam uma matriz de dentina terciária, resultando na formação de uma ponte de dentina reparativa (BJØRNDAL; MJÖR, 2001).

Basicamente esta técnica consiste em remover cirurgicamente a porção da polpa coronária vital, porém inflamada, preservando a vitalidade da polpa radicular. O objetivo é remover a contaminação bacteriana deixando o dente tratado assintomático até sua exfoliação (AGAMY et al., 2004; HUTH et al., 2005; MAROTO et al., 2005; SONMEZ; SARI; CETINBAS, 2008; SAKAI et al., 2009; BLANCHARD; BOYNTON, 2010; SEALE; COLL, 2010; HAVALÉ et al., 2013; RUBY et al., 2013).

A pulpotomia é uma técnica estudada há muitos anos, contudo continua causando muitas controvérsias e discussões, visto que muitos dos agentes capeadores pulpare não preenchem os requisitos de um material ideal para procedimentos conservadores da vitalidade pulpar (CAICEDO et al., 2006; FUKS, 2008; MORETTI et al., 2008; SAKAI et al., 2009; BLANCHARD; BOYNTON, 2010; ASGARY, 2011; LOURENÇO NETO et al., 2013).

3.3 MATERIAIS CAPEADORES

Protocolos de pulpotomia variam de acordo com os materiais de preenchimento pulpar e com os objetivos do tratamento, da seguinte forma: desvitalização, mumificação, cauterização (formocresol, laser), preservação ou desvitalização mínima (sulfato férrico, glutaraldeído) e regeneração ou indução do reparo (HC, MTA) (SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006, LIN et al., 2014; STRINGHINI JUNIOR; VITCEL; OLIVEIRA, 2015).

O material capeador ideal para a polpa radicular deve ser bactericida, (FUKS, 2002) ser inofensivo à polpa e estruturas circundantes (SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006), promover a cicatrização do tecido pulpar culminando com a formação de barreira de tecido mineralizado, possuir propriedades bacteriostáticas, vedar as margens cavitárias, ser adesivo às estruturas dentárias, apresentar boa resistência mecânica para suportar a mastigação, ser bom isolante térmico e elétrico, ser insolúvel no meio bucal, apresentar biocompatibilidade e não ser tóxico ao tecido pulpar (BJØRNDAL; MJÖR, 2001; SHAYEGAN; PETEIN; ABBEELE, 2008; PARIROKH; TORABINEJAD, 2010;

MALEKAFZALI; SHEKARCHI; ASGARY, 2011; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013).

Através de estudos clínicos e laboratoriais vários materiais capeadores pulpares são pesquisados para pulpotomia com o objetivo de identificar o mecanismo de ação, indicação para uso clínico, vantagens e desvantagens, contudo, os materiais disponíveis no mercado e utilizados em pulpotomias de dentes decíduos não apresentaram evidências suficientes que suportem a superioridade e determine o mais apropriado, gerando dúvidas quanto à escolha do agente capeador ideal (FUKS, 2002; AGAMY et al., 2004; HUTH et al., 2005; FUKS, 2008; MORETTI et al., 2007; MORETTI et al. 2008, CONTI et al., 2009; SAKAI et al., 2009; BLANCHARD; BOYNTON, 2010; TATE, 2011; HUTH et al., 2012; LOURENÇO NETO et al., 2013; LIN et al., 2014).

3.3.1 Agregado de Trióxido Mineral (MTA)

O MTA foi introduzido, em 1993, na Universidade de Loma Linda (LEE; MONSEF; TORABINEJAD, 1993; SHAHI et al., 2010) como material para a reparação de perfurações radiculares laterais. Foi patenteado em 1995 por Torabinejad e White. Em 1998 foi aprovado pela *US Food and Drug administration* como um material terapêutico para endodontia em humanos (CARDOSO-SILVA et al., 2011). O MTA é utilizado como material de obturação retrógrada e também provou obter sucesso em procedimentos de terapia pulpar vital em animais (HOLLAND et al., 2001; MENEZES et al., 2004) e humanos (MORETTI et al., 2007; MORETTI et al, 2008; SAKAI et al., 2009). Nair et al. (2009); Paranjpe, Zhang, Johnson (2010); Paranjpe et al. (2011) concluíram que o MTA pode ser considerado como o novo padrão ouro no tratamento do capeamento pulpar.

O MTA é uma mistura de silicato dicálcico, silicato tricálcico, aluminato tricálcico, aluminato de ferrite tetracálcico, e óxido de bismuto (TORABINEJAD et al., 1995; CARDOSO-SILVA et al., 2011). Ele contém outros elementos, tais como dióxido de silício, óxido de cálcio, óxido de magnésio, óxido de alumínio, sulfato de potássio, monóxido de ferro, e sulfato de sódio (SARKAR et al., 2005). Quando misturado com água, ele forma cristais de óxido de cálcio em uma estrutura amorfa que consiste de 33% de cálcio, 49% de fosfato, 2% de carbono, 3% de cloreto e 6% de sílica (TORABINEJAD et al., 1995; DOMINGUEZ et al., 2003; CAMILLERI et al.,

2004). O MTA é considerado um material bioativo, pois libera íons de cálcio durante e após a aplicação. Os íons de cálcio reagem com o fósforo e produzem cristais de hidroxiapatita na superfície do MTA e na interface MTA dentina. A bioatividade do MTA é considerada como sendo responsável pela sua biocompatibilidade, atividade dentinogênica e habilidade de vedação (SARKAR et al., 2005; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013).

Existem dois tipos de MTA, o agregado de trióxido mineral branco (WMTA) e o agregado de trióxido mineral cinza (GMTA). As medidas das composições químicas revelou que o Al_2O_3 , MgO, e especialmente de FeO se encontram em maior quantidade no GMTA (ASGARY et al., 2005). Em cultura de células, cementoblastos e queratinócitos cresceram melhor na superfície de WMTA em comparação com GMTA (OVIIR et al., 2006). No entanto, os estudos mostraram que os osteoblastos primários inicialmente se ligaram ao GMTA e aumentaram em número, mas eles não sobreviveram na superfície WMTA até o final do 13º dia (PÉREZ et al., 2003). Vosoughhosseini et al. (2008) mostraram que os dois tipos de MTA produziram resposta celular inflamatória similar em períodos de curto e longo prazo.

O MTA apresenta capacidade seladora, promove a cura do tecido pulpar, é biocompatível (TORABINEJAD; PARIROKH, 2010; NOSRAT; SEIFI; ASGARY, 2011; YANG; KO; KIM, 2012; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013), impede a infiltração bacteriana e estimula a liberação de citocinas de células ósseas, promovendo a formação de tecido duro (VILLAT et al., 2013). Apresenta propriedades biológicas semelhantes ao HC, porém induzindo menor grau de inflamação e melhor reparo (ZARRABI et al., 2010). No entanto, por razões econômicas e comerciais, seu uso é limitado em países em desenvolvimento, além do potencial de descoloração do elemento dental (BER; HATTON; STEWART, 2007; ZARRABI, 2010; LEIENDECKER et al., 2012; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013; LIN et al., 2014).

3.3.2 Biodentine (BDT)

O BDT, utilizado recentemente na Europa e Estados Unidos, foi inicialmente desenvolvido como material restaurador, porém tem sido indicado pelo fabricante

como um substituto dentinário, inclusive em pulpotomias (DARVELL; WU, 2011; LAURENT; CAMPS; ABOUT, 2012; VILLAT et al., 2013; KOUBI et al., 2013).

O BDT é um novo cimento restaurador à base de silicato de tricálcio, óxido de zircônio, carbonato de cálcio e HC. O líquido é na maior parte composto por água na adição de cloreto de cálcio (acelerador de presa) e polímeros hidrossolúveis (agentes plastificantes). Para a manipulação, uma dose única do líquido é gotejada em uma cápsula descartável que contém o pó, em seguida a cápsula é levada ao amalgamador por 30 segundos. O cimento, o qual atua como um substituto dentinário, pode ser aplicado diretamente na cavidade a ser restaurada com uma espátula sem qualquer tratamento de condicionamento (CAMILLERI, 2013).

Na composição do BDT, o HC possui efeito de um material de preenchimento do cimento, uma vez colocado sobre a polpa ele inicia a formação de dentina secundária mantendo a vitalidade da polpa radicular, enquanto que o silicato de cálcio atua como uma estrutura rígida substituindo a dentina (LAURENT; CAMPS; ABOUT, 2012; CAMILLERI, 2013).

Apresenta altas propriedades mecânicas para restauração e indução de mineralização precoce na polpa dentária (LAURENT; CAMPS; ABOUT, 2012; KOUBI et al., 2013; VILLAT et al., 2013). Leiendecker et al. (2012) mostraram que o contato prolongado com a dentina mineralizada resultou em efeitos adversos sobre a integridade da matriz de colágeno alterando a conformação das fibras de colágeno dentinárias através da hidrólise e liberação de HC, que em contato prolongado com a dentina altera sua força e resistência a fratura. Entretanto, o colágeno extraído é limitado à superfície de contato, sendo assim, precauções devem ser tomadas quando este material é aplicado em paredes dentinárias finas. Wang et al. (2012) relataram que os materiais bioativos à base de silicato de cálcio em contato com o esmalte induzem a remineralização na sua superfície através da maior deposição de cristais de hidroxiapatita formando uma camada que protege o esmalte ativamente.

Laurent et al. (2008) demonstraram a biocompatibilidade do BDT com células pulpares e habilidade de induzir a diferenciação de odontoblastos e mineralização em cultura de células pulpares. Por conter silicato de tricálcio, estabeleceu-se que o BDT é bioativo, ou seja, possui a propriedade de formar tecidos normais na sua superfície através de uma série de reações bioquímicas e biofísicas que ocorrem na interface material tecido. Entretanto, esta bioatividade não foi claramente demonstrada.

O BDT apresenta um curto tempo de secagem, boa propriedade mecânica e uma capacidade de vedação eficaz, o que permite a sua utilização como um material de capeamento pulpar direto e restaurador (VILLAT et al., 2010; KOUBI et al., 2013).

Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a formação de ponte de dentina é mais homogênea e a formação de dentina radicular ocorre mais cedo com silicato tricálcico do que com materiais à base de HC (PARIROKH; TORABINEJAD, 2010; LEYE BENOIST et al., 2012; TRAN et al., 2012; VILLAT et al., 2013). Entretanto seus efeitos biológicos sobre as células pulpares não estão bem esclarecidos.

3.3.3 Hidróxido de cálcio (HC)

O HC é descrito como o material de escolha para capeamento pulpar direto e pulpotomia parcial ou coronária em dentes permanentes (MOHAMMADI; DUMMER, 2011), no entanto, há grande divergência quanto ao sucesso clínico e radiográfico (MORETTI et al., 2007; MORETTI et al., 2008; TRAIRATVORAKUL; KOOTHIRATRAKARN, 2012) e histológico (MORETTI et al., 2008; MARQUES, 2013) em dentes decíduos.

Este material apresenta-se como um sal cristalino, branco e suavemente solúvel. O HC é um material alcalino com propriedades bactericidas e com a capacidade de induzir a formação de tecido duro nos dentes (NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013). Os íons cálcio do HC reagem com o dióxido de carbono presente nos tecidos, fazendo com que ocorram granulações de calcita. Tal processo conduz a um acúmulo de fibronectina que possibilita a adesão e diferenciação celular, resultando na formação de tecido mineralizado (DEMARCO et al., 2001; CAVALCANTI; RODE; MARQUES, 2005). O HC possui propriedade desinfetante, bactericida e bacteriostática, pois altera o metabolismo enzimático das bactérias devido à liberação de íons hidroxila que tornam o meio alcalino. Estas propriedades são muito importantes, pois, a reparação tecidual e a deposição de tecido mineralizado somente ocorrem na ausência de processo infeccioso (WATERHOUSE; NUNN; WHITHWORTH, 2000).

Contudo, o HC possui várias desvantagens, incluindo a baixa adesão à dentina, pobre capacidade de vedação, formação de ponte dentinária irregular e a presença de túneis que podem agir como caminhos possíveis para a proliferação

bacteriana levando a inflamação da polpa e/ou necrose (VILLAT et al., 2010; MOHAMMADI; DUMMER, 2011; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013). Cengiz et al. (2005) relataram que o uso de HC pode resultar em necrose devido ao pH alcalino, inflamação aguda ou crônica e calcificação distrófica em tecido pulpar exposto.

Diversos estudos são realizados visando explicar as falhas mais comuns que ocorrem no uso do HC, principalmente nas pulpotomias de dentes decíduos, além do uso em dentes permanentes (WITHERSPOON, 2008; TABARSI et al., 2010; MASS; ZILBERMAN, 2011). A falha mais comum observada quando se utiliza o HC é a reabsorção interna, sendo a explicação mais aceita para esta falha, a relação com a inflamação pulpar e a formação de uma zona limitada de necrose por coagulação (MORETTI et al., 2008; CARDOSO-SILVA et al., 2011; LIU; ZHOU; QIN, 2011; TATE, 2011; HUTH et al., 2012; TRAIRATVORAKUL; KOOTHIRATRAKARN, 2012; LOURENÇO NETO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013).

3.4 METALOPROTEINASE DA MATRIZ (MMP)

Segundo Laurent; Camps; About (2012), as interações entre materiais de capeamento pulpar e o tecido pulpar ferido, o estabelecimento e desenvolvimento da cicatrização das feridas e processos regenerativos permanecem obscuros.

A resposta protetora dos tecidos, de uma maneira geral, é caracterizada pelo processo inflamatório que tem como objetivo livrar o organismo da causa inicial e das consequências de uma lesão celular. Essa resposta ocorre em tecidos conjuntivos vascularizados, envolvendo mediadores químicos e células imunológicas e inflamatórias como neutrófilos, macrófagos, linfócitos, basófilos, eosinófilos, mastócitos e plasmócitos (COTRAN et al., 2000). Os neutrófilos migram para o tecido através dos vasos sanguíneos, atuando como fagócitos capazes de ingerir microrganismos e partículas (MATSUI et al., 2011).

A proteólise da matriz extracelular parece ser um evento chave para a iniciação e progressão do processo inflamatório. As proteases, enzimas que quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas, podem ser classificadas em proteases de serina, proteases de cisteína, proteases de aspartato, e metaloproteases com base no seu resíduo ou cofator essencial na catálise. Metzincinas é uma família universalmente expressa de endopeptidases zinco

dependente, cujos membros incluem metaloproteases tais como as MMPs (STERCHI, 2008). As MMPs foram descobertas em 1962 por Gross e Lapiere, que estudaram a degradação do colágeno em tripla hélice durante a metamorfose da cauda do girino (KRIZKOVA et al., 2011).

MMPs formam uma família estruturalmente semelhante, mas geneticamente distintas de endopeptidases zinco-cálcio dependentes expressas em baixos níveis no tecido normal, mas regulado positivamente durante a inflamação (STERNLICHT; WERB, 2001; WAHLGREN et al. 2002). Em pH fisiológico, têm capacidade de degradar as proteínas da matriz extracelular (PALOSAARI et al., 2003; HANNAS et al., 2007). A particular dependência destes metais é justificável, já que o zinco e o cálcio são responsáveis pela atividade e estabilidade destas enzimas.

As MMPs são sintetizadas e secretadas como pró-enzimas transmembrana inativas denominada zimogênios, que são processadas para uma forma ativa pela remoção de um peptídeo amino-terminal (SURI et al., 2008). As MMPs diferem na geografia do sítio ativo, ou seja, na especificidade do substrato e no controle transcripcional (HANNAS et al, 2007; VINCENTI; BRINCKERHOFF, 2007; KRIZKOVA et al., 2011). Todas as MMPs derivam de um protótipo de cinco domínios, formados pela adição ou exclusão do domínio regulatório: pré-domínio e pró-domínio (mantém a enzima como um zimogênio inativo, até que seja removido por proteólise), domínio catalítico (contém o sítio ativo para ligação do zinco e o maquinário catalítico), uma região de charneira rica em prolina (hinge), domínio hemopoxim-like (medeia a interação entre enzimas e inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs) e a associação aos receptores celulares determinando a especificidade do substrato) e o domínio rico em cisteína (FIGURA 1) (HANNAS et al., 2007).

Suas características comuns incluem: a exigência de que o zinco se ligue ao seu sítio catalítico, além de possuir um domínio pro-peptídico localizado na extremidade N-terminal do domínio catalítico, mantendo a enzima como zimogênio inativo até que seja removido na proteólise e ocorra a ativação que pode ser obtida através da autocatálise ou mesmo pela ação de enzimas proteolíticas como plasmina ou outra MMP, além do domínio C-terminal e a da região de charneira (HANNAS et al, 2007; VINCENTI; BRINCKERHOFF, 2007; KRIZKOVA et al., 2011).

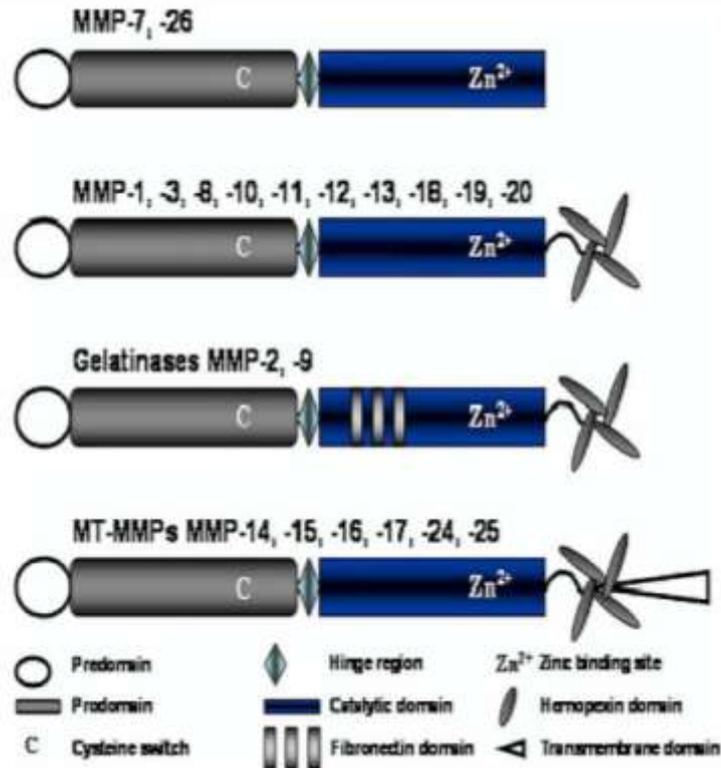


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura básica de MMP. Todas as MMPs são compostas por um pré-domínio, um pró-domínio contendo cisteína, uma região de charneira (hinge) e um domínio catalítico com sítio de ligação ao zinco. Todos, exceto matrilisinas (MMP-7, -26) contêm o domínio transmembrana e as gelatinases MMP-2 e -9, contêm o domínio da fibronectina com forte afinidade para a gelatina.

Fonte: VU, WERB (2000), NAGASE; VISSÉ; MURPHY (2006); HANNAS et al. (2007).

Na forma ativada, a atividade das MMPs é regulada através de quatro mecanismos: controle transcricional positivo e negativo de genes MMP, pela ativação do estado latente, por diferenças na especificidade de substrato e pela modulação pelos TIMPs (HANNAS et al., 2007).

A transcrição de muitos genes de MMP é regulada por fatores de crescimento endógenos e citocinas. Estimulação ou repressão de fatores de crescimento e genes de MMP em resposta a citocinas resultam em uma variação de 50 vezes nos níveis de RNA mensageiro e proteínas (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

A manutenção do estado de latência do precursor de MMP parece ser mantida, em parte, por uma ligação que une o resíduo de cisteína não emparelhado do pró-domínio ao domínio catalítico que contém zinco. O rompimento da ligação entre a cisteína e o zinco é o pré-requisito para a ativação e pode ser alcançado por diversas maneiras: 1) pela interação ou modificação do resíduo de cisteína por íons metálicos, reagentes tióis e oxidantes; 2) pela mudança conformacional no esqueleto

do polipeptídeo induzida por agentes caotrópicos (iodeto de potássio, tiocianato de sódio) e detergentes e 3) por excisão através de enzimas proteolíticas (tripsina, plasmina) (FIGURA 2) (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

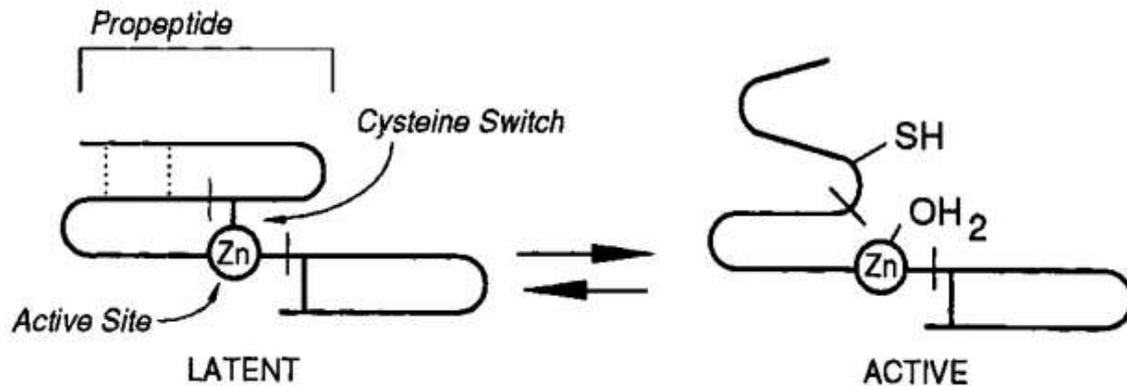


Figura 2 - Ativação do precursor MMP é iniciada pela abertura do sítio de cisteína.
Fonte: BIRKEDAL-HANSEN (1993).

TIMPs são os maiores reguladores endógenos da atividade de MMPs e, até o momento, foram descritos quatro diferentes TIMPs (TIMP1 a 4) em vertebrados e sua expressão é regulada no decorrer do desenvolvimento e remodelação tecidual. São proteínas de baixo peso molecular que, ao formar complexos com as MMPs, podem bloquear ativação de pró MMP latentes ou podem influenciar sua capacidade para a hidrólise de um determinado substrato (VISSE; NAGASE, 2003; SORSA; TJÄDERHANE; SALO, 2004; HANNAS et al., 2007). O equilíbrio entre a produção de MMPs e de inibidores TIMPs é importante para manter a homeostase da matriz extracelular. O desequilíbrio destes fatores, onde a atividade da MMPs nos tecidos sobrepõe a das TIMPs, relaciona-se a processos patológicos da matriz extracelular (HANNAS et al., 2007).

Vários estudos mostraram que os mediadores inflamatórios têm um papel importante na estimulação da produção de MMPs por diferentes linhagens de células, tais como fibroblastos, neutrófilos e macrófagos (STERNLICHT; WERB, 2001; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008; ZEHNDER; WEGEHAUPT; ATTIN, 2011). Produtos bacterianos podem também estimular a produção de MMPs, induzindo a inflamação pulpar e a destruição tecidual (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2013). Acredita-se que as MMPs desempenham um papel central na composição da matriz extracelular. As MMPs são enzimas capazes de degradar a matriz extracelular e quase todos componentes da membrana basal durante a remodelação

do tecido normal e doenças do tecido-destrutivo, incluindo tumores odontogênicos e cistos (WAHLGREN et al. 2001; HANNAS et al, 2007; MATSUI et al., 2011). Segundo Vu, Werb (2000) as MMPs não apenas participam do processo de remodelação da matriz extracelular como também influenciam em algumas funções celulares, já que degradam células da matriz extracelular e permitem a migração celular, alteram o microambiente da matriz extracelular resultando na alteração do comportamento celular e modulam a atividade de moléculas bioativas através da clivagem direta, liberando substâncias armazenadas ou através da modulação dos seus inibidores.

Grande parte da literatura inicial sugere que cada MMP tem o seu próprio substrato particular. Este conceito levou à utilização de diferentes nomenclaturas para as MMPs, de tal modo que as colagenases quebram colágenos fibrilares intactos, gelatinases degradam colágeno desnaturado (gelatina), e a metaloelastase degrada elastina. Atualmente, porém, reconhece-se que as MMPs usualmente degradam múltiplos substratos (HANNAS et al, 2007).

Colagenases são os únicos membros da família das MMPs de matriz que degradam colágenos intersticiais tipos I, II e III, V, IX e XI em sítios específicos, produzindo os fragmentos $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$ (BIRKEDAL-HANSEN, 1993; HANNAS et al., 2007). Estruturalmente as colagenases apresentam um pré-domínio, domínio rico em cisteína (pró-domínio) e um domínio catalítico (contém o zinco no sítio ativo). As colagenases (MMP1, 8, 13 e 18) são sintetizadas no tecido pulpar por tecido conjuntivo, fibroblastos, queratinócitos, osteoblastos, macrófagos (VISSE; NAGASE, 2003) e odontoblastos (PALOSAARI et al., 2003).

A MMP8, colagenases tipo II ou colagenase neutrofílica tem a capacidade de clivar tipos de colágeno intersticiais I, II e III e são capazes de digerir outras moléculas da matriz extracelular. A MMP8 é especialmente sintetizada por PMN (neutrófilos), sendo armazenada em grânulos intracelulares da medula óssea e liberada em resposta a estímulos extracelulares (HANNAS et al., 2007). MMP8 é expressa por odontoblastos e tecido da polpa de dentes humanos totalmente desenvolvidos, o substrato preferencial da MMP8 é o colágeno do tipo I, que é o principal tipo de colágeno intersticial na matriz orgânica pulpar (TJÄDERHANE et al., 2001).

O ensaio de fluorescência baseado no peptídeo é aquele em que o substrato exibe uma resposta fluorogênica à hidrólise que pode ser acompanhada

continuamente para permitir que as taxas iniciais sejam facilmente quantificadas. O peptídeo correspondente a MMP8, 2,4-Dinitrofenol-Prolina-Leucina-Alanina-Tirosina-Triptofano-Alanina-Arginina, contém um grupo fluorescente no mesmo lado da ligação peptídica e um grupo de extinção (*quenching group*). O resíduo de triptofano (Trp) é um doador conveniente de fluorescência que é facilmente incorporado em qualquer posição do peptídeo. O bom candidato para *quenching group* (grupo de decréscimo de fluorescência) é o 2,4-Dinitrofenol (DNP) que, não só tem uma banda de absorção que se sobrepõe à emissão do Trp, mas também serve como grupo de bloqueio N-terminal (NETZEL-ARNETT et al., 1991).

Os fluoróforos formam um grupo químico que fluoresce quando exposto a luz de um determinado comprimento de onda. Cada fluoróforo tem um espectro de emissão e de excitação característico. A detecção de fluorescência pode sofrer modificações na sua intensidade com as mudanças de temperatura, pH, possibilidade de interação com solvente, viscosidade, polarização, pressão e suas interações com os solutos (LAKOWICZ et al., 2006).

3.5 MIELOPEROXIDASE

Os PMN, principalmente os neutrófilos, que são as células fagocíticas altamente móveis e mais abundantes na circulação, são também as primeiras células a serem ativadas na defesa pelo sistema imunológico inato contra infecções (DALE; BOXER; LILES, 2008; KANTARI; PEDERZOLI-RIBEIL; WITKO-SARSAT, 2008). Estas células são tradicionalmente vistas como células de curta duração, totalmente diferenciadas, cuja principal função é encontrar rapidamente, ingerir e destruir uma grande variedade de agentes patogênicos invasores, incluindo bactérias, fungos e protozoários (NATHAN, 2006; DALE; BOXER; LILES, 2008). Porém, esta resposta neutrofílica aguda é muitas vezes acompanhada por danos ao tecido do hospedeiro (VAN DER VEEN; DE WINTHER; HEERINGA, 2009).

Para realizar suas funções, neutrófilos fagocitam patógenos e com o compartimento fagolisossomal formado pela fusão do fagossomo com os grânulos intracelulares, liberam vários componentes bactericidas como as enzimas hidrolíticas, proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (ERO), produzidas por um complexo enzimático de membrana denominado NADPH oxidase (BABIOR, 1984; FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). Neutrófilos contêm pelo menos três tipos

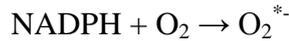
diferentes de grânulos destacando-se o grânulo primário, também conhecido como grânulo azurófilo (BORREGAARD; SØRENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2007). Estes grânulos são peroxidases positivas porque possuem alta concentração de MPO, além de conter várias enzimas proteolíticas, incluindo defensinas, hidrolases lisossomais, e proteinases de serinas neutral, como as elastases, proteinases 3 e catepsinas G (VAN DER VEEN; DE WINTHER; HEERINGA, 2009). Durante a atividade microbicida, ocorre um processo dinâmico que requer energia. As alterações metabólicas associadas com a ação microbicida dos neutrófilos são referidas genericamente como “burst” oxidativo (BABIOR, 1984).

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química capaz de existir de forma independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. Eles participam da atividade bactericida, de processos de sinalização celular e estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas, em condições fisiológicas. Por serem muito reativos atacam biomoléculas, como lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA). Dentre os radicais livres, podemos destacar dois grupos: as ERO e as espécies reativas de nitrogênio (ERN). As ERO mais importantes são o ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e o oxigênio singlete. O óxido nítrico e o peroxinitrito constituem as principais ERN (CADENAS; DAVIES, 2000).

O ânion superóxido é muito reativo sendo removido rapidamente pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), formando H_2O_2 . O H_2O_2 forma o radical hidroxila e não existe nenhuma enzima que o remova. Por isso, as enzimas que decompõem o H_2O_2 , como a catalase e a glutathione peroxidase, são tão de extrema importância para os seres vivos (CADENAS e DAVIES, 2000).

Uma série de eventos metabólicos ocorre quando os fagócitos (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) são ativados, iniciando-se um processo de respiração não mitocondrial que resulta na produção inicial de radical ânion superóxido que leva à produção de outras ERO suficiente para ultrapassar a capacidade antioxidante local, favorecendo o burst oxidativo (CADENAS; DAVIES, 2000).

Durante o burst oxidativo dos neutrófilos os vários componentes do complexo NADPH oxidase são recrutados para superfície da membrana fagolisossomal interna, bem como a membrana plasmática. Com a ativação do complexo NADPH ocorre a formação do radical ânion superóxido que é o primeiro passo para a ação microbicida de neutrófilos ativados:



Após, por dismutação espontânea ou por ação catalítica via SOD radical ânion superóxido, o H_2O_2 é gerado:

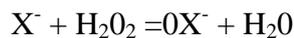


Sendo assim, o substrato necessário para a geração de oxidantes derivados de MPO é formado, suficiente para ultrapassar a capacidade antioxidante local (BABIOR; LAMBETH; NAUSEEF, 2002; BABIOR, 2004; DAVIES, 2011).

Através deste substrato a MPO catalisa a reação peroxidativa descrita abaixo, em que AH representa um substrato oxidável e A a forma oxidada.



Além disso, a MPO pode catalisar a oxidação halogenetos, como o ânion cloreto ao potente germicida, HOCl, brometo (Br^-), iodeto (I^-), e o íon tiocianato (SCN^-) (BOZEMAN; LEARN; THOMAS, 1990; WINTERBOURN; VISSERS; KETTLE, 2000), como descrito a seguir, em que X representa I^- , Br^- , ou Cl^-



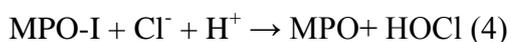
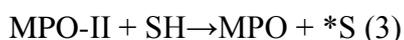
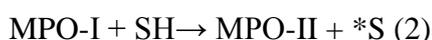
O H_2O_2 é bactericida somente em altas concentrações e essas reações são vitais para a sobrevivência humana colaborando na destruição de patógenos fagocitados, porém, quando o H_2O_2 é produzido em excesso relaciona-se com o aparecimento de processos degenerativos das inflamações crônicas e as diversas patologias como a aterosclerose, envelhecimento, infarto, diabetes, etc. (CADENAS; DAVIES, 2000; MOCATTA et. al., 2007; DOMAGALA-KULAWIK, 2008).

A MPO é uma enzima pró-inflamatória armazenada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e com peso molecular de 150 kDa representando cerca de 5% de sua massa seca (MULLANE; KRAEMER; SMITH, 1985; METZLER et al., 2011; PULLI et al., 2013). O conteúdo de MPO nos grânulos de neutrófilos humanos maduros é heterogêneo em densidade e morfologia. Os monócitos humanos também contêm grânulos de MPO, embora eles sejam em menor número do que em neutrófilos (KLEBANOFF, 2005). Sendo assim, a enzima MPO pode ser utilizada como um método de quantificação de infiltração neutrofílica nos tecidos (VAN DER VEEN; DE WINTHER; HEERINGA, 2009).

Segundo Klebanoff (1968,1970), MPO em conjunto com o seu substrato de H_2O_2 , provou ser um poderoso sistema antimicrobiano, e como tal, a MPO é uma componente chave da atividade microbicida oxigênio-dependente dos fagócitos, e em particular, os neutrófilos. Por um longo período, MPO tem sido considerada uma

enzima bactericida cuja principal função é gerar espécies de oxigênio reativo que contribui para a destruição e fagocitose de patógenos. Embora a geração de oxidantes pela MPO é benéfica em termos da resposta imunitária aos agentes patogênicos invasores, existem evidências consideráveis de que a estimulação inapropriada da formação de oxidantes por esta enzima (lugar errado, hora errada, níveis excessivos) podem resultar em danos nos tecidos do hospedeiro (VAN DER VEEN; DE WINTHER; HEERINGA, 2009; DAVIES, 2011). A MPO liberada no meio extracelular, de neutrófilos mortos ou altamente estimulados em condições patológicas de inflamação aguda e crônica, é capaz de exercer uma atividade oxidante prejudicial sobre as células e os tecidos vizinhos. (FRANCK et al., 2009). A avaliação da atividade da MPO é crucial para entender seus efeitos na inflamação (PULLI et al., 2013).

Seu mecanismo de ação envolve a reação de sua forma férrica com H_2O_2 , levando a formação da MPO-I através da transferência de dois elétrons (ABU-SOUD; HAZEM, 2000). A MPO I pode oxidar cloreto formando, como já vimos, o HOCl sendo a única peroxidase conhecida, com essa propriedade (DYPBUKT et al., 2005). Esse ácido, por sua vez, também oxida outras biomoléculas, como taurina formando cloraminas. A MPO também pode oxidar vários substratos orgânicos através de transferências sucessivas de um elétron envolvendo os intermediários MPO I e MPO II, comportamento cinético clássico das peroxidases (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998). O mecanismo das reações catalisadas pela MPO no neutrófilo está esquematizado na Figura 3. A MPO nativa no tecido é oxidada ao intermediário conhecido como composto I (MPO-I). Este intermediário é um poderoso agente oxidante e encontra-se dois níveis de oxidação acima da forma nativa (MPO). Ele pode oxidar o ânion cloreto e retornar à forma nativa (reações 1 e 4), conhecido como mecanismo clorinante; ou oxidar inúmeras substâncias através da transferência de um elétron por intermédio da formação do composto II (MPO-II) (reações 2 e 3), mecanismo peroxidativo (DAVIES, 2011).



Onde SH é um substrato peroxidado pela MPO

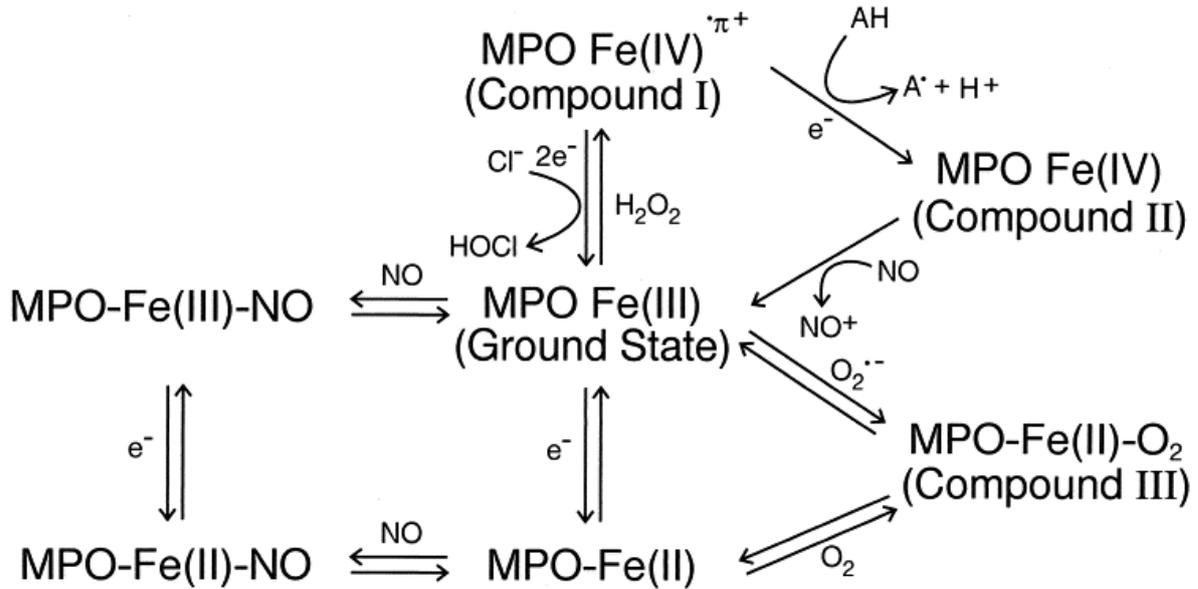


Figura 3 - Modelo da cinética enzimática da MPO.
 Fonte: PODREZ, ABU-SOUD, HAZEN (2000).

No ciclo de peroxidase, radicais são gerados a partir de substratos (orgânicos e inorgânicos) via oxidação de um elétron pelos compostos I e II. Ensaios de peroxidase tem sido utilizados para monitorar o influxo neutrófilos nos locais de infecção e inflamação (BOZEMAN; LEARN; THOMAS, 1990; ACCORSI-MENDONÇA et al, 2013). O ensaio espectrofotométrico da oxidação do 3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), possui vantagens por ser considerado o menos tóxico e seguro dentre os substratos da peroxidase, ser sensível à peroxidase liberadas no meio ou quando estão imobilizadas em substratos (MENEGAZZI et al, 1992) e o ensaio requer apenas uma única medição em 3 minutos (BOZEMAN; LEARN; THOMAS, 1990).

Existem duas vias que a MPO pode catalizar a oxidação do TMB, a primeira onde uma oxidação direta, resulta na formação de TMB_{ox} que é o produto oxidado do TMB (ANDREWS; KRINSKY, 1982).



A segunda através de uma via indireta que leva a geração do HOCl com a produção subsequente espontânea de TMB_{ox}:



Os três produtos de oxidação do TMB são bastante estáveis em pH ácido. Dentre eles estão o radical cátion livre (produto de oxidação de um elétron) que está em equilíbrio com o complexo de transferência de carga e o derivado diimina do

TMB (dois elétrons como produto de oxidação). O complexo de transferência de carga é responsável pela cor azul no decorrer da oxidação do TMB, enquanto que a oxidação final produz a cor amarela como produto da oxidação dos dois elétrons (TATZBER et al., 2003).

Andrews; Krinsky (1982) concluíram que o TMB é um substrato adequado para avaliação da atividade de MPO, podendo ser oxidado enzimaticamente pela MPO, bem como quimicamente pelo HOCl produzido pela oxidação catalisada pela MPO do Cl⁻, porém o ensaio não pode ser usado para distinguir as duas condições de oxidação. A oxidação do TMB mostra-se linearmente dependente da concentração de MPO e em pH ácido a taxa observada de reação é um reflexo preciso da oxidação do TMB, visto que em pH neutro ou alcalino, a velocidade de reação observada deve ser ajustada para a decomposição espontânea do produto de oxidação do TMB.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética envolvendo Pesquisa em animais da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG, protocolo 569/2014 (ANEXO A).

4.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA E DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS

Foram utilizados 37 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), machos, com peso entre 270 e 350 gramas, com aproximadamente 9 semanas de vida obtidos do Biotério da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Os animais foram mantidos em gaiolas identificadas em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e consumo de ração sólida e água *ad libitum* durante todo período experimental. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos, de acordo com os materiais a serem testados. Cada grupo, por sua vez, foi dividido em 4 subgrupos, de acordo com o tempo experimental de 24 e 72 horas, 7 e 15 dias após pulpotomia. Foram utilizados 2 dentes de cada animal (primeiros molares inferiores direito e esquerdo) totalizando 74 dentes, assim distribuídos:

Grupo controle (n=1 rato/ 2 dentes) – Foi realizada a abertura coronária e imediatamente procedeu-se a coleta do tecido pulpar.

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

IA (n = 3 ratos/6 dentes) - tempo experimental 24 horas

IB (n = 3 ratos/6 dentes) - tempo experimental 72 horas

IC (n = 3 ratos/6 dentes) - tempo experimental 7 dias

ID (n = 3 ratos/6 dentes) - tempo experimental 15 dias

Grupo II (n = 12 ratos/24 dentes) - pulpotomia com cimento BDT

IIA (n = 3 ratos/6 dentes) - tempo experimental 24 horas

IIB (n = 3 ratos/6 dentes) - tempo experimental 72 horas

IIC (n = 3 ratos/6 dentes) - tempo experimental 7 dias

IID (n = 3 ratos/6 dentes) - tempo experimental 15 dias

Grupo III (n = 12 ratos/24 dentes) - pulpotomia com HC associado à solução salina estéril

IIIA (n = 3 ratos/6 dentes) - tempo experimental 24 horas

IIIB (n = 3 ratos/6 dentes) - tempo experimental 72 horas

IIIC (n = 3 ratos/6 dentes) - tempo experimental 7 dias

IIID (n = 3 ratos/6 dentes) - tempo experimental 15 dias

4.3 PROCEDIMENTO OPERATÓRIO

Os animais foram tratados pelo mesmo operador e foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínia, SP, Brasil) na concentração de 6mg/kg e quetamina (Rhoibarme Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, SP, Brasil) na concentração de 70mg/kg e contidos em uma mesa operatória (FIGURA 4), que permitiu sua imobilização após anestesia geral e manutenção da boca aberta.

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

O preparo cavitário dos dentes (primeiros molares direito e esquerdo) foi realizado inicialmente com ponta esférica diamantada nº 1011 (FG KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP, Brasil), de granulação fina (diâmetro 0,10 décimos de milímetro), em alta rotação. Iniciou-se a abertura de uma cavidade no centro da face oclusal (classe I), removendo a ponte de esmalte central, cuja profundidade correspondeu à parte ativa da ponta, sob irrigação/aspiração com soro fisiológico para remoção das raspas de dentina (FIGURA 5). A exposição pulpar, bem como a ampliação e a regularização da cavidade foi obtida usando uma broca de aço esférica nº1 (Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) a 1500 rpm, usando o motor de implante Dforce 1000 (Dentflex Industria e Comércio Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) sob irrigação com soro fisiológico (FIGURA 6). O tecido pulpar coronário exposto foi amputado até o nível da entrada dos canais

radiculares com o auxílio de uma cureta nº 5 (SS White, Objetos Dentários Ltda., Juiz de Fora, MG, Brasil) com diâmetro semelhante ao das pontas. O excesso de soro fisiológico foi removido com auxílio de aplicadores descartáveis tipo Microbrush (KG Sorensen Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP, Brasil) estéreis. Para o controle da hemorragia pulpar realizou-se irrigações sucessivas com soro fisiológico e compressões com bolinha de algodão estéreis.

Para o grupo do MTA cinza (Angelus, Londrina, PR, Brasil), o material foi misturado de acordo com a recomendação do fabricante, obtendo uma mistura lisa a qual foi aplicada no coto pulpar após o controle da hemorragia. A cavidade foi então selada com cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer®, 3M ESPE Produtos Dentários, Sumaré, SP, Brasil) (FIGURA 7).

Para o grupo BDT (Septodont, St-Maur-des-Fossés, Cedex, França) o material foi misturado de acordo com a recomendação do fabricante, obtendo uma mistura lisa que foi aplicada no coto pulpar após o controle da hemorragia. A cavidade foi então selada com cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer®, 3M ESPE Produtos Dentários, Sumaré, SP, Brasil) (FIGURA 8).

Para o grupo HC associado a solução salina estéril (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) o material foi misturado de acordo com a recomendação do fabricante, obtendo uma mistura lisa que foi aplicada no coto pulpar após o controle da hemorragia. Em seguida, a cavidade foi forrada com HC fotopolimerizável (Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil) e selada com cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitremer®, 3M ESPE Produtos Dentários, Sumaré, SP, Brasil) (FIGURA 9).

Nos tempos pré-determinados (24 e 72 horas, 7 e 15 dias), os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6mg/kg) e quetamina (70mg/kg) e a polpa dental foi extirpada dos molares inferiores direito e esquerdo com o auxílio de uma lima tipo k #15, 20 e 25 (Dentsply Indústria e Comércio Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) delimitada com um cursor de borracha a 3,5mm de extensão e uma colher de dentina nº 5 (SS White, Objetos Dentários Ltda., Juiz de Fora, MG, Brasil) (FIGURA 10). As amostras de tecido pulpar coletado foram armazenadas em tubo falcon de 15mL juntamente com 1mL do tampão Tris 50mM.

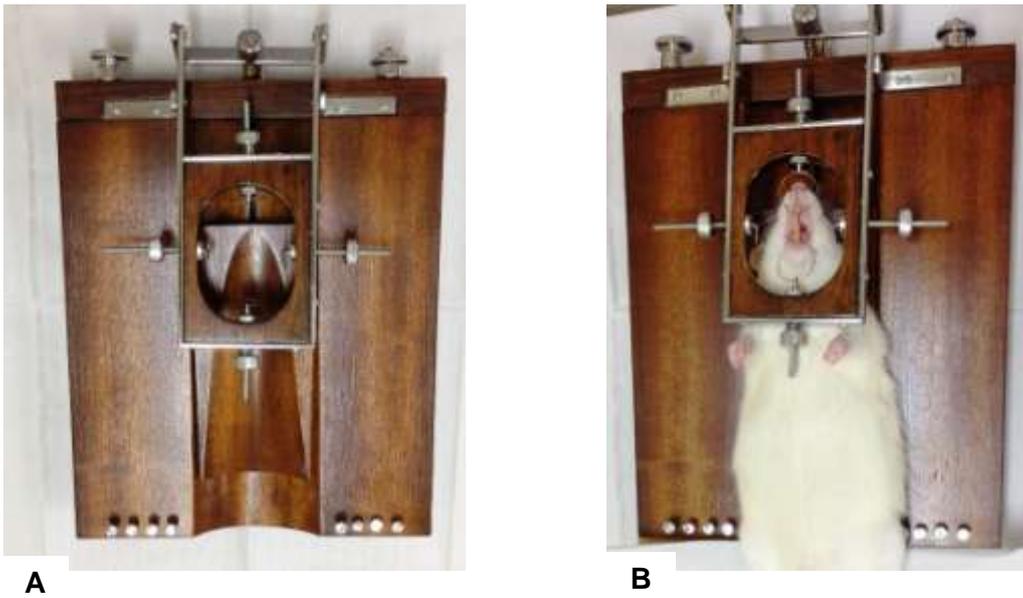


Figura 4 - A: Mesa operatória; B: Imobilização e manutenção da boca aberta do animal após anestesia geral.
Fonte: Do autor.

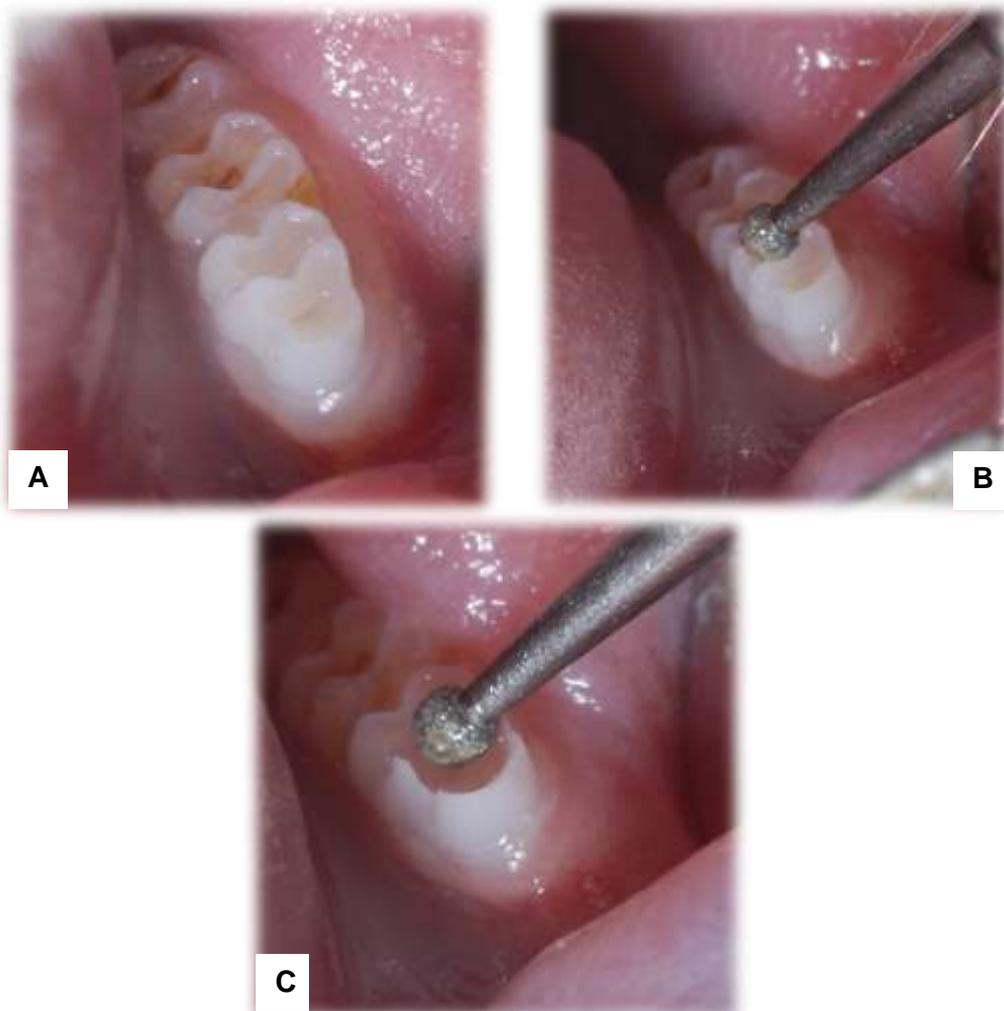


Figura 5 - A: Aspecto inicial do primeiro molar inferior; B e C: Abertura coronária em alta rotação com a broca diamantada 1011.
Fonte: Do autor.

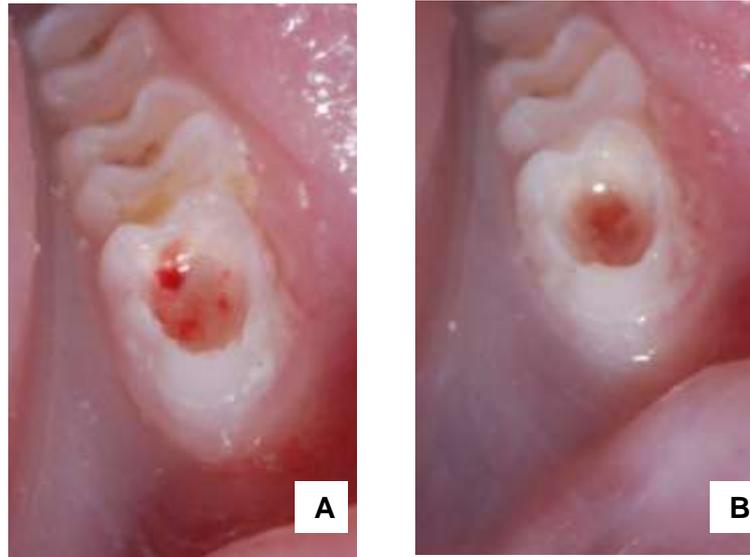


Figura 6 – A: Exposição pulpar após o uso de broca de aço em baixa rotação; B: Aspecto da abertura coronária após a remoção do tecido pulpar coronário e controle da hemorragia.

Fonte: Do autor.

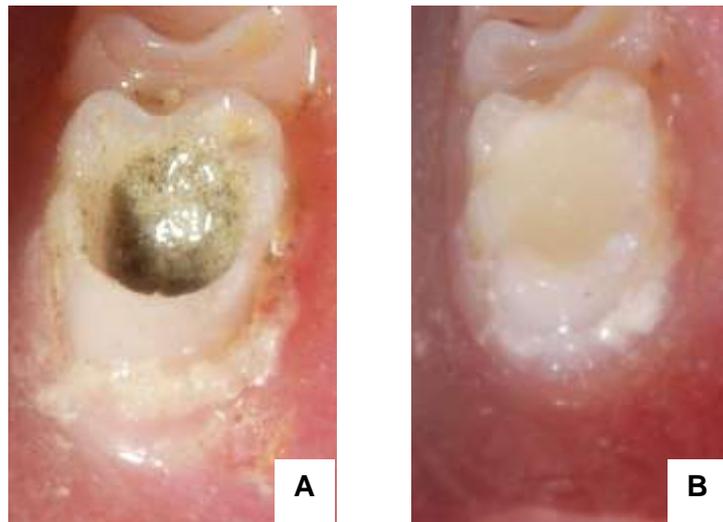


Figura 7 - A: Capeamento com MTA cinza; B: Restauração com Vitremer.

Fonte: Do autor.



Figura 8 - A: Capeamento com BBDT; B: Restauração com Vitremer.

Fonte: Do autor.

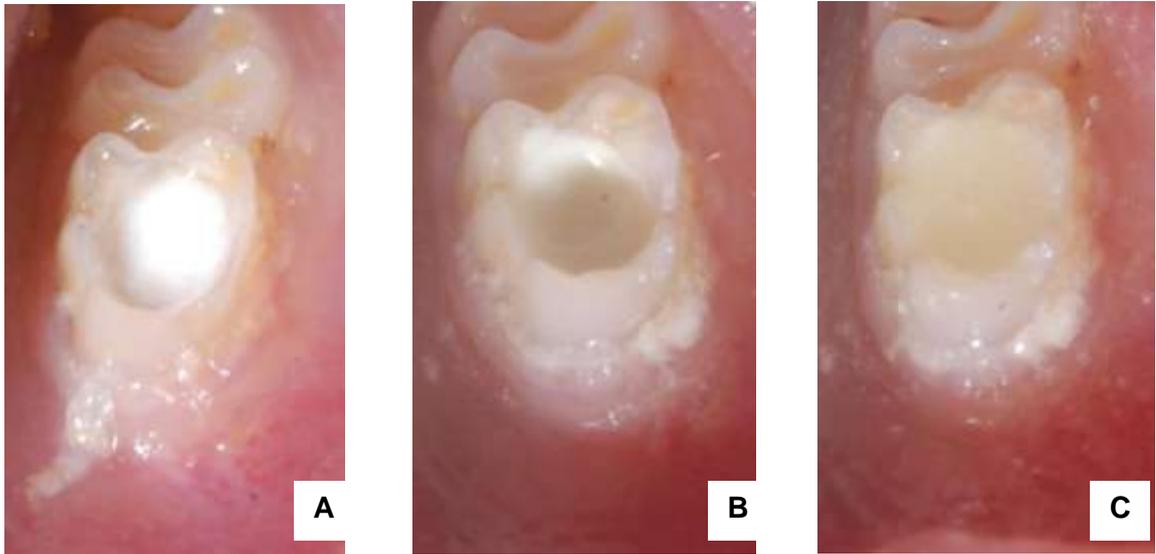


Figura 9 – A: Capeamento com HC associado a solução salina estéril, B: Base com HC fotopolimerizável, C: Restauração com Vitremer.

Fonte: Do autor.

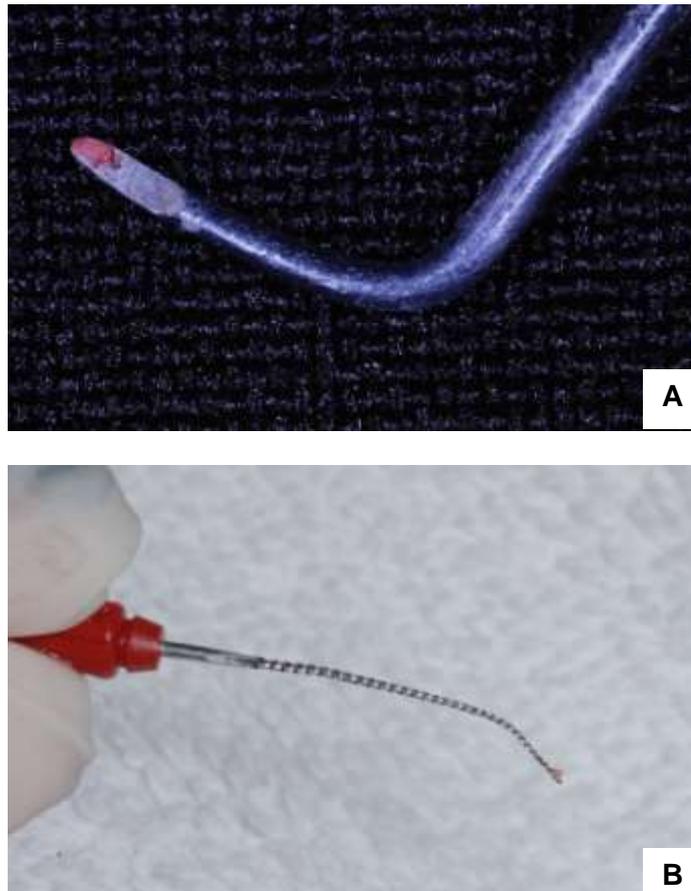


Figura 10 – A e B: Aspecto do tecido pulpar após coleta para análise.

Fonte: Do autor.

4.4 EUTANÁSIA

Sob anestesia com xilazina (Sespo Indústria e Comércio Ltda, Paulínia, SP, Brasil) na concentração de 6mg/kg e quetamina (Rhobibarme Indústria Farmacêutica Ltda, Hortolândia, SP, Brasil) na concentração de 70mg/kg via intra muscular, os ratos foram eutanasiados 24 e 72 horas, 7 e 15 dias pós-operatórios por inalação excessiva de CO₂.

4.5 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS DE MPO E MMP8

As amostras utilizadas nos ensaios para MMP8 e MPO foram conservadas em tampão Tris 50mM, onde primeiramente pesou-se 3,02 gramas de Tris (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 5,85 gramas de cloreto de sódio (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e 0,555 gramas de cloreto de cálcio (Aproquímica – Comércios de produtos químicos, Santa Maria, RS, Brasil), em balança analítica (Kern, Barlingen-Frommern). Os reagentes devidamente pesados foram colocados em um béquer juntamente com 250ml de água Mili-Q (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), após a diluição foi acertado o pH a 7,5 utilizando o phmetro (Digimed, Campo Grande, MS, Brasil) e acertado o volume a 500mL. A polpa retirada foi colocada em tubo falcon de 15mL juntamente com 1mL do tampão Tris 50mM.

4.6 MIELOPEROXIDASE (MPO)

Para o ensaio de avaliação da atividade da MPO foram utilizados os parâmetros descritos previamente por Pulli et al. (2013), feito pela reação de peroxidases do tecido com H₂O₂, usando TMB como o substrato cromogênico. O tecido coletado foi homogeneizado utilizando o aparelho de ultrassom Ultra 80 (Ultra Stirrer). Em um tubo tipo eppendorf acrescentou-se 350µl de solução de TMB (2,9 mM em DMSO a 14,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)), combinou-se com 250 µl de H₂O₂ a 0,75 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 50 µl tampão de fosfato de sódio (150 mM a pH 5,4) e 200µl da amostra. Incubou-se em banho maria a 37°C durante 10 minutos e parada pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2 M (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A solução foi dispensada em uma cubeta de quartzo e foi

medida a absorvância a 450 nm em espectrofotômetro Biochrom Libra S21/S22 (Biochrom, Cambridge, England) para estimar a atividade de MPO. Para a avaliação da inibição o mesmo teste foi realizado substituindo os 50 µl de tampão por 50µl de azida sódica 2M onde constatou-se uma redução de 43.9% da atividade de MPO igualando-se a padrões descritos anteriormente na literatura (ABDEL-NAIM; MOHAMADIN, 2004). Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.6.1 Curva Padrão

A curva padrão do ensaio para mieloperoxidase foi feita com neutrófilos já previamente separados. Para a separação de neutrófilos, o sangue humano de um voluntário foi coletado com Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) /heparina e centrifugado em temperatura ambiente a 2.000 g por 10 minutos. O precipitado foi coletado e transferido para um tubo de 15 mL. O volume foi completado com tampão de lise de hemácias (EDTA dissódico, cloreto de amônio, bicarbonato de sódio e água miliQ agitando-se por 10 minutos, seguido de uma centrifugação a 1.000g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, houve a formação de um “pellet”. O sobrenadante foi removido e inicialmente foi inserido 3mL de Soro Bovino Fetal (PBS) tamponado pH 7,3, misturando-o ao pellet. Em seguida, todo o tubo de 15 mL (tipo Falcon, EUA) foi completado com PBS e centrifugado em 1.000g por 10 min a 4°C. Nesse momento, o aspecto final do “pellet” é claro, limpo. Após a remoção do sobrenadante, ressuspendemos com 3 mL de PBS. Em um outro tubo de 15mL, colocamos 3 mL de Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e lentamente mais 3 mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), pela parede do tubo. O Histopaque é um reagente desenvolvido para a separação de células, constituindo-se em uma solução de polissacarose e diatrizoato de sódio. Para o Histopaque 1077 a densidade é ajustada em 1,077 g.mL⁻¹, recuperando células mononucleares viáveis a partir de pequenos volumes de sangue. O Histopaque 1119 a densidade é ajustada em 1,119 g.mL⁻¹, sendo específico para polimorfonucleares.

A seguir, nesse novo tubo, foi inserido lentamente os 3mL com o “pellet” limpo diluído em PBS e centrifugado a 700g por 30 minutos em temperatura ambiente. O resultado foi a formação de duas camadas, sendo a superior formada por células mononucleares e a inferior formada por células polimorfonucleares. As camadas, contendo células diferentes, foram cuidadosamente removidas e colocadas em

tubos separados e identificados. Para o tubo de polimorfonucleares, foi acrescentado 1 mL de PBS para o procedimento de contagem de células em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram ajustadas para a obtenção de uma curva padrão com um número de células conhecidas.

4.7 METALOPROTEINASE 8 DA MATRIZ (MMP8)

Para a análise de MMP8 o tecido coletado e armazenado foi homogeneizado utilizando o aparelho de ultrassom Ultra 80 (Ultra Stirrer). Em seguida coletou-se 360µl do homogenato, 360µl da solução tampão Tris-HCl (ph 7,5) a 4°C com 50mM de sulfato de zinco (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e 0,05% de polietilenoglicol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) acrescentando na cubeta de quartzo. Após levou-se o mesmo ao fluorímetro (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) e acrescentou-se 80 µl do *MMP8 Substrate* 200µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

As configurações utilizadas no fluorímetro (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) para a análise foram de 280nm de excitação e 360nm de emissão. A cinética enzimática foi avaliada nos seguintes tempos 0, 15, 30, 60, 75, 90 120, 135, 150 e 180 minutos. A determinação da MMP8 foi realizada em quintuplicata e a média destes valores foi utilizada para todos os cálculos subsequentes.

O espectro óptico deste substrato apresenta bandas aproximadamente de 275 e 375 nm, que corresponde às bandas de absorção de Trp e do grupo DNP. Estes peptídeos têm emissão de fluorescência e máxima excitação em função Trp perto de 360 e 280 nm, respectivamente (NETZEL-ARNETT et al., 1991).

4.8 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA METALOPROTEINASE 8 DA MATRIZ (MMP8)

Para confirmar que os valores de fluorescência obtidos são de metaloproteinases foi elaborado um ensaio com inibidor específico de MMPs. Para tal, selecionamos doxíciclina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) como inibidor; por ser potente inibidor de colagenase e ser um quelante de zinco. Utilizamos 3 amostras de tecido coletado e armazenado, sendo um controle e dois tratados. O tecido foi homogeneizado utilizando o aparelho de ultrassom Ultra 80 (Ultra Stirrer). Em seguida coletou-se 360µl do homogenato, 160µl da solução tampão Tris-HCl (ph 7,5) a 4°C com 50mM de sulfato de Zinco (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e 0,05%

de polietilenoglicol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e 200 µl da solução de doxiciclina 0,5mM acrescentando na cubeta de quartzo. Após levou-se o mesmo ao fluorímetro (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia) com as mesmas configurações do ensaio de MMP8 e acrescentou-se 80 µl do *MMP8 Substrate* 200µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

4.9 ANÁLISES DAS PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE BRADFORD

Para o ensaio de proteínas totais pelo método de Bradford utilizou-se uma placa de 96 poços onde foram colocadas 90µl do reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e 10µl de amostra. A curva de calibração foi feita utilizando diferentes concentrações de BSA (Albumina Bovina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A leitura foi feita em espectrofotômetro com leitor de placas Anthos Zenyth 200rt (Biochrom, Cambridge, England) a partir da absorbância lida, a 595 nm, segundo a técnica de Bradford (BRADFORD, 1976). Toda a análise foi feita em triplicata.

Esta análise foi feita para que as análises de MPO e MMP8 fossem corrigidas pela quantidade de proteínas em tecido pulpar e correlacionadas com a curva padrão.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi realizado em esquema fatorial em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 2 fatores sendo tempo (24 e 72 horas, 7 e 15 dias) e tratamento (MTA, BDT, HC associado a solução salina estéril) com 3 repetições. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro Wilk para avaliar a distribuição normal. As médias foram analisadas estatisticamente utilizando-se o teste de Tukey. Os dados da MPO e MMP8 foram correlacionados através do Teste de Pearson. Todos os testes foram avaliados utilizando 5% de significância ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

Foram realizadas todas as pulpotomias nos grupos experimentais de 24 e 72 horas, 7 e 15 dias. Após os períodos experimentais o tecido pulpar foi coletado e os animais foram eutanasiados por inalação excessiva de CO₂. Houve perda de um animal durante o experimento para o grupo HC 24 horas, que foi substituído por um novo animal para realização dos testes.

5.1 BRADFORD

O volume de cada amostra foi baseado na quantificação proteica total lida em espectrofotômetro com leitor de placas Anthos Zenyth 200rt (Biochrom, Cambridge, England) segundo a técnica de Bradford (BRADFORD, 1976). Para tal análise foi feita uma curva padrão de BSA ("Bovine Serum Albumin", USB, EUA) e as amostras foram correlacionadas com a curva padrão. A Figura 11 demonstra a curva padrão de BSA utilizada em nosso estudo.

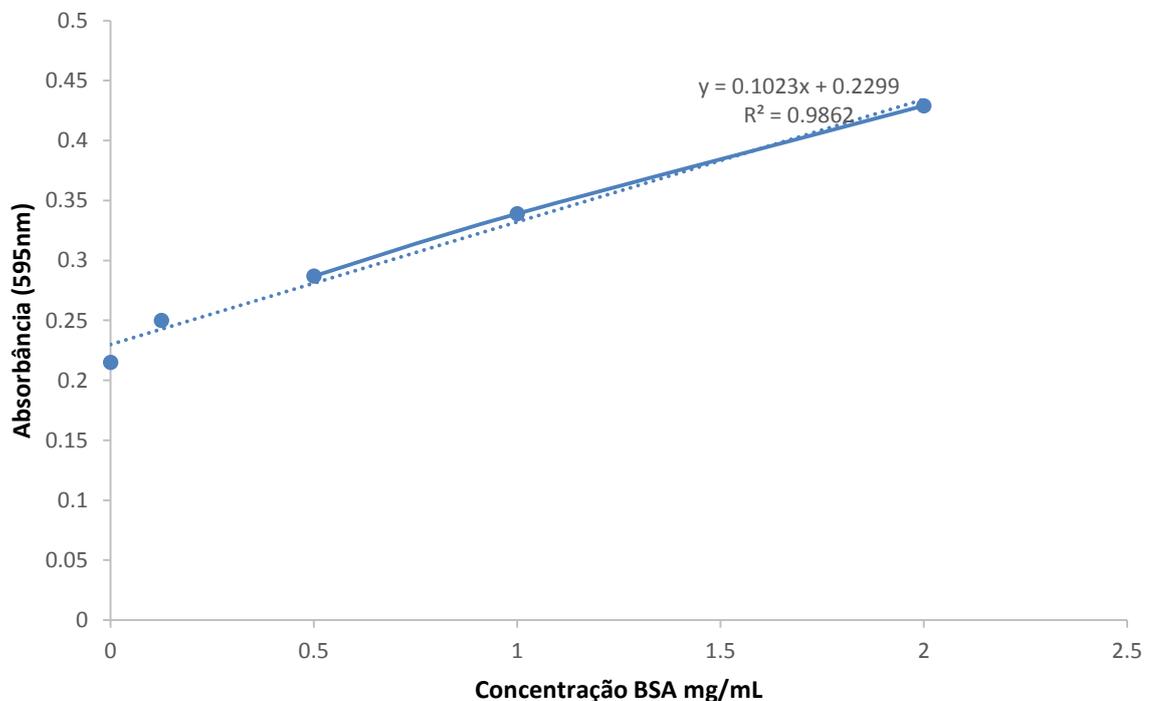


Figura 11- Curva padrão de BSA
Fonte: Do autor.

As especificações dos pontos utilizados na curva estão na Tabela 1 com a Absorbância 595nm e a concentração de BSA (mg/mL) encontrada. Sendo assim, as análises de MPO e MMP8 foram corrigidas pela quantidade de proteínas em tecido pulpar e correlacionadas com a curva padrão.

Tabela 1 - Especificações dos pontos da curva padrão de BSA

Absorbância 595nm	Concentração BSA (mg/mL)
0.215	0
0.25	0.125
0.287	0.5
0.339	1
0.429	2

Fonte: Do autor.

5.2 MPO

A curva padrão para o ensaio MPO, utilizando-se somente neutrófilos humanos já previamente separados, está representada na Figura 12 e as especificações dos pontos utilizados na curva estão na Tabela 2 com a densidade ótica (Absorbância-450nm) e a concentração (cel/ μ L) encontrada.

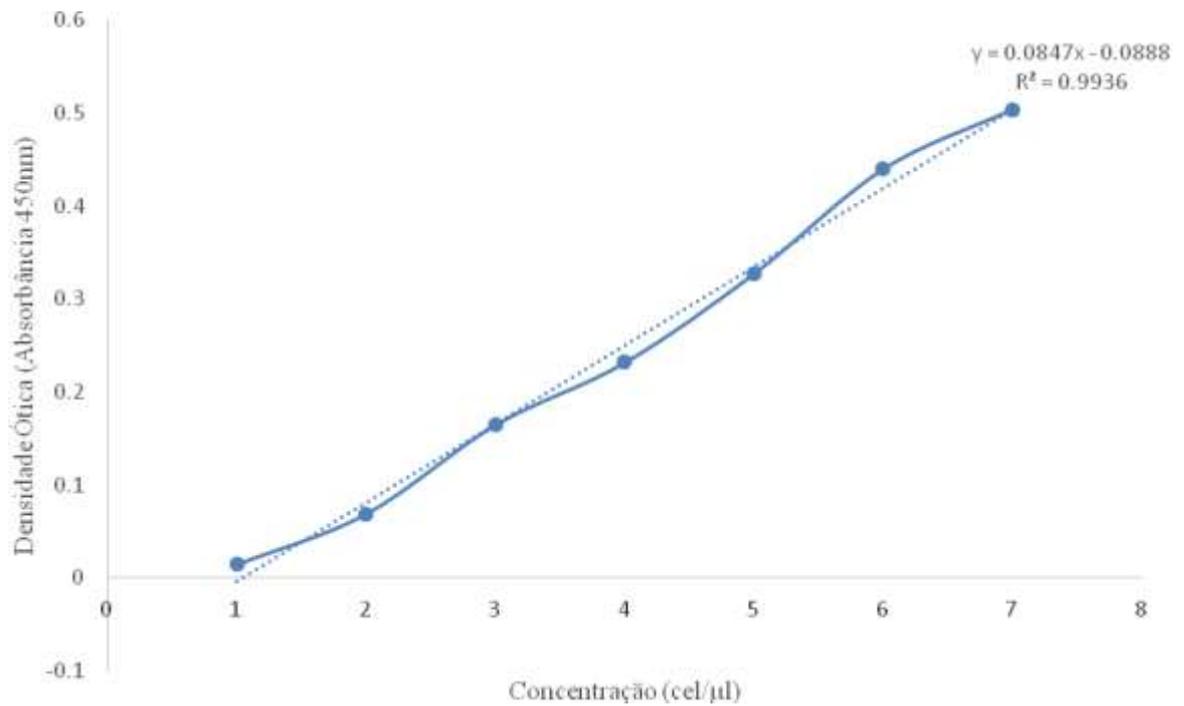


Figura 12 - Curva padrão para MPO
Fonte: Do autor.

Tabela 2 - Especificações dos pontos da curva padrão para MPO

Densidade Ótica (Absorbância 450nm)	Concentração (cel/ μ l)
0.014667	$1,6 \times 10^4$
0.069	8×10^4
0.164667	4×10^5
0.231667	8×10^5
0.327333	$1,6 \times 10^6$
0.44	$2,4 \times 10^6$
0.504	$3,2 \times 10^6$

Fonte: Do autor.

Os resultados da análise da atividade enzimática de MPO para as amostras de tecido pulpar estão especificados na Tabela 3. A análise estatística da variável tratamento dentro de cada tempo revelou que houve diferença estatisticamente significativa para atividade enzimática de MPO no período de 24 horas, 7 e 15 dias. As 24 horas o resultado se mostrou altamente significativo indicando que o BDT apresentou menor valor de atividade enzimática de MPO, caracterizando assim menor presença de neutrófilos (0). Aos 7 dias o grupo HC apresentou maior valor de atividade enzimática de MPO indicando maior presença de neutrófilos (0.0191) e aos 15 dias o grupo MTA apresentou menor valor de atividade enzimática de MPO se igualando estatisticamente ao HC (0.0422) (FIGURA 13) .

Tabela 3 - Análise estatística da relação entre os tratamentos no decorrer dos tempos experimentais para os valores de atividade de $\sqrt{\text{MPO/proteína}}$

Tempos	24 horas	72 horas	7 dias	15 dias
MTA	2.090258 ^A	1.2315013	1.094218 ^B	0.7045305 ^B
BDT	0.4378722 ^C	0.8007022	1.297734 ^{AB}	1.278517 ^A
HC	1.453837 ^B	0.823331	1.735043 ^A	0.9546397 ^{AB}
p	0*	0.0974	0.0191*	0.0422*

*Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$)

Grupos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (sentido vertical da linha).

Fonte: Do autor.

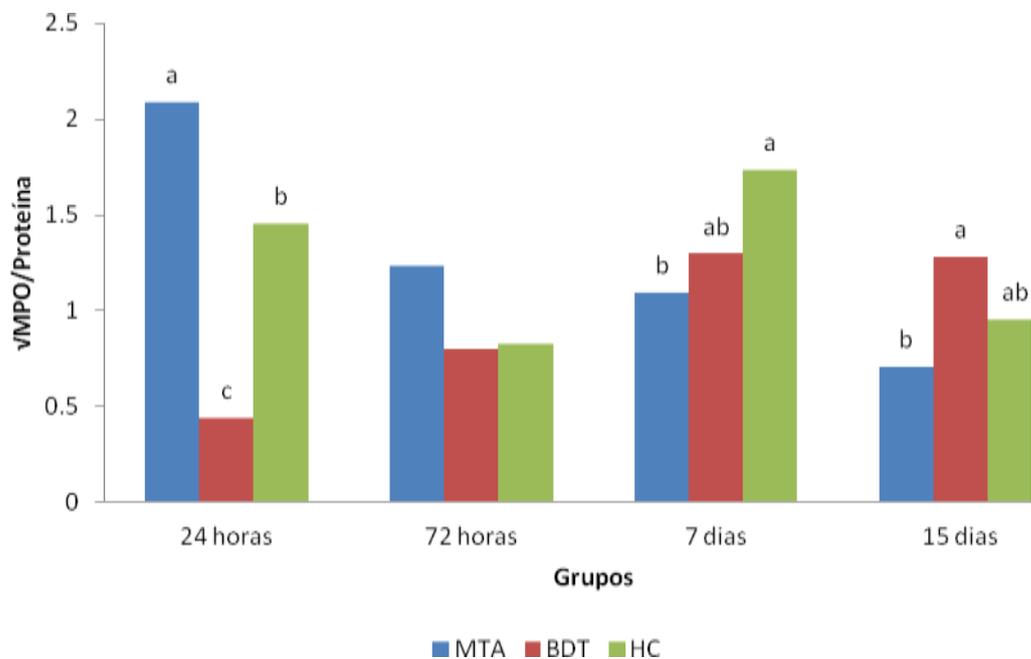


Figura 13 - Representação gráfica da análise estatística da relação entre os tratamentos no decorrer dos tempos experimentais para os valores de atividade de MPO ($\sqrt{\text{MPO/proteína}}$).

Fonte: Do autor.

Na Figura 14 podemos observar que o BDT apresentou aumento do valor de MPO/proteína ao longo dos períodos experimentais, sugerindo que o material induz um aumento do infiltrado inflamatório neutrofílico tardio, dificultando o processo de reparo. Diferindo do HC que oscilou durante os períodos experimentais porém, apresentando menores valores de MPO/proteína aos 15 dias. Para o MTA o processo de diminuição do infiltrado neutrofílico se justifica pela passagem da inflamação aguda e instalação do processo cicatricial do tecido pulpar.

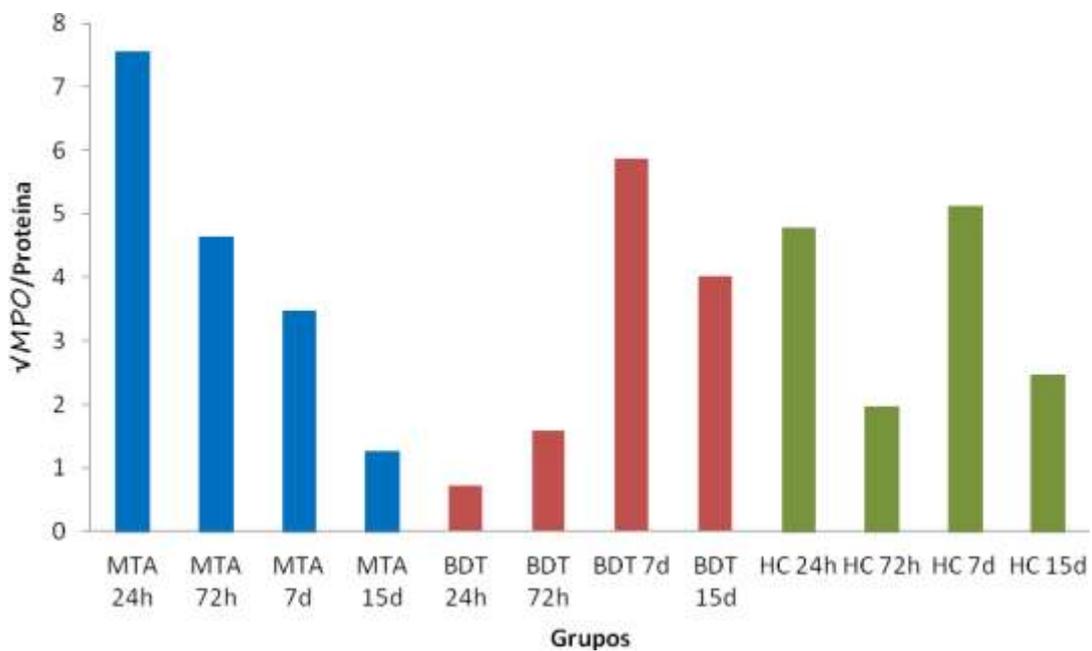


Figura 14 - Representação gráfica do valor da atividade enzimática de MPO por proteína nos grupos de tratamentos.

Fonte: Do autor.

Os resultados estatísticos da variável tempo dentro de cada tratamento revelou que houve diferenças estatisticamente significativas durante a evolução dos períodos experimentais (FIGURA 15). Para todos os tratamentos o ajuste de modelos polinômiais de regressão escolhido foi o quadrático, sendo que para o MTA houve 86,95% de confiança (0), BDT 99,99% de confiança (0,0011) e HC 24,60% de confiança (0,0007).

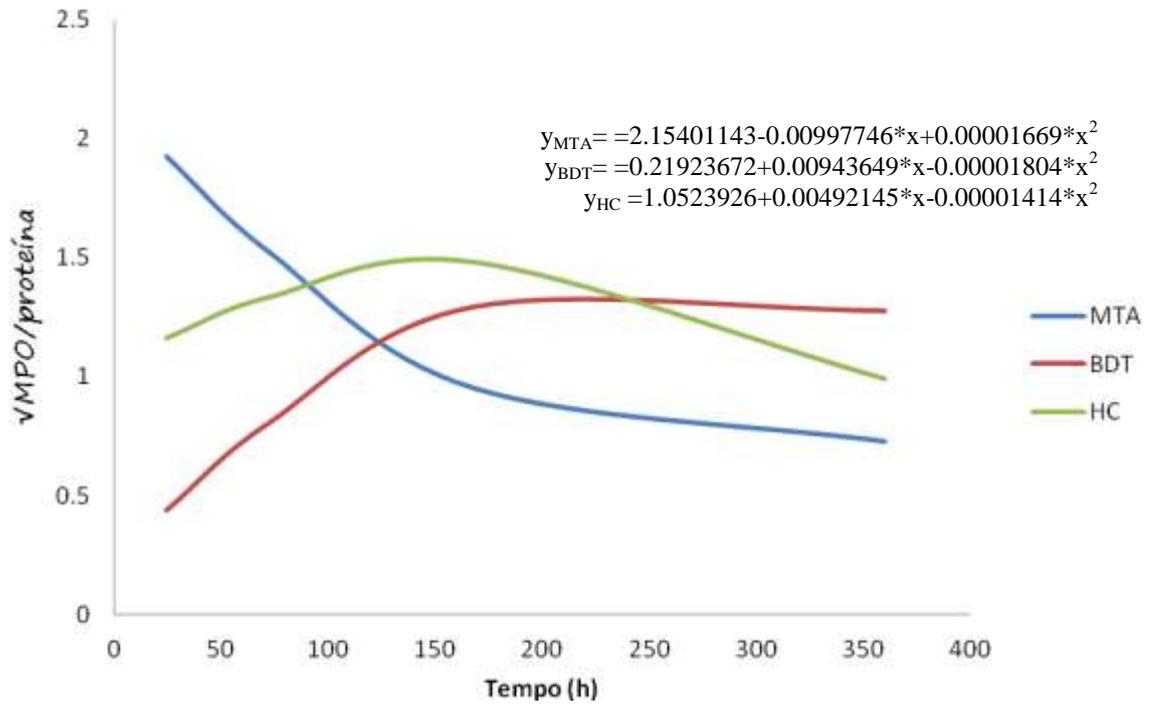


Figura 15 - Representação gráfica das funções de regressão linear ajustadas da variável tempo para cada tratamento da atividade de MPO ($\sqrt{MPO/proteína}$).

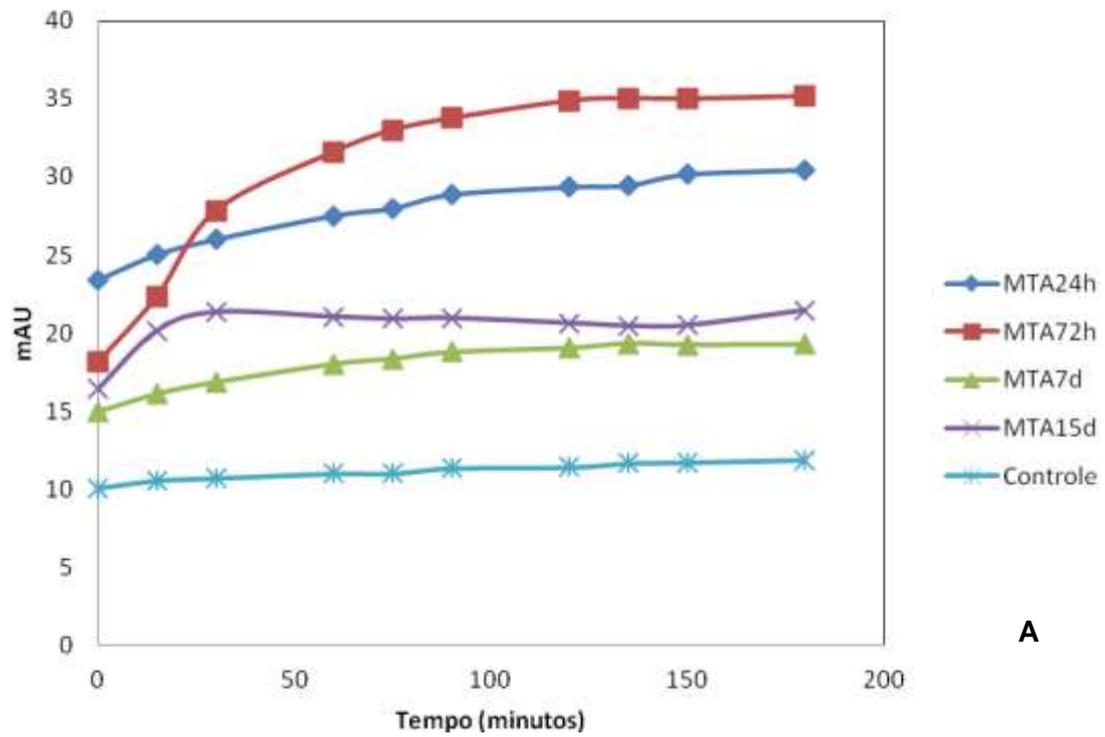
Fonte: Do autor.

5.3 MMP8

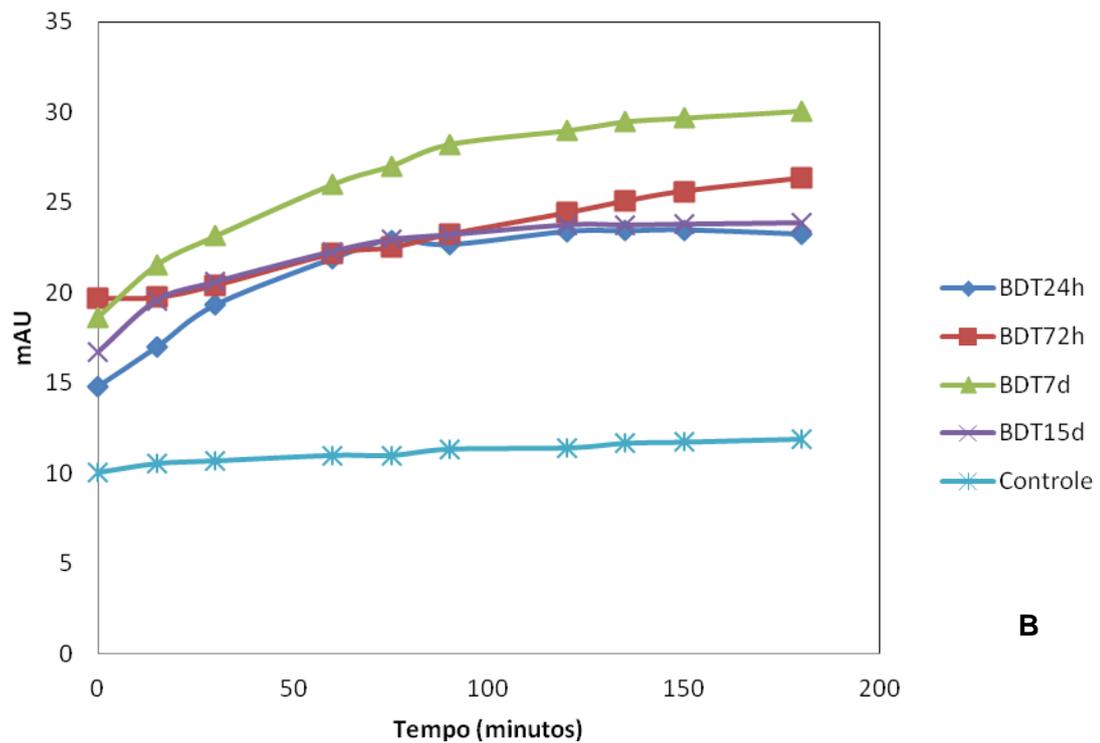
Para padronizar a metodologia usada neste trabalho, foram utilizados os parâmetros cinéticos descritos previamente para o teste de atividade de MMP8 (NETZEL-ARNET et al., 1991). O material coletado (FIGURA 10 A-B) foi inicialmente homogeneizado em 3 ml de tampão de amostra. Nestas condições, foi detectada uma atividade enzimática muito baixa, insuficiente para comparação entre as diferentes amostras. Assim, optou-se por nova diluição da amostra, na qual o volume total foi reduzido para 1ml. A detecção da atividade enzimática foi, então, realizada nas condições padrões, permitindo uma avaliação inter-amostras.

Para avaliar o efeito dos três materiais utilizados em pulpotomia, foi analisada a atividade da enzima MMP8 nas amostras coletadas, como parâmetro marcador de indução de remodelação tissular. As enzimas são catalisadores proteicos que regulam a velocidade de uma determinada reação bioquímica, sem serem consumidas no processo. São capazes de alcançar este efeito através de ligação temporária a um determinado substrato e converte-lo em um produto.

Nota-se que há atividade basal de MMP8 na polpa dentária, indicativo bioquímico de que ocorre remodelação deste tecido com atividade de collagenase. Todos os materiais testados induziram atividade de MMP8 sensivelmente maior que a detectada no grupo controle. Entretanto, o perfil temporal da atividade da enzima foi semelhante em todos os experimentos, o que sugere especificidade da enzima pelo substrato (FIGURA 16 e 17).



A



B

Figura 16 - Cinética enzimática temporal da atividade de MMP8 em polpa dentária de ratos nos grupos de 24 e 72 horas, 7 e 15 dias A: Cinética enzimática temporal da atividade de MMP8 em polpa dentária de ratos tratados com MTA; B: Cinética enzimática temporal da atividade de MMP8 em polpa dentária de ratos tratados com BDT. Nota: Relação entre mili absorbância (mAU) e tempo (minutos).

Fonte: Do autor.

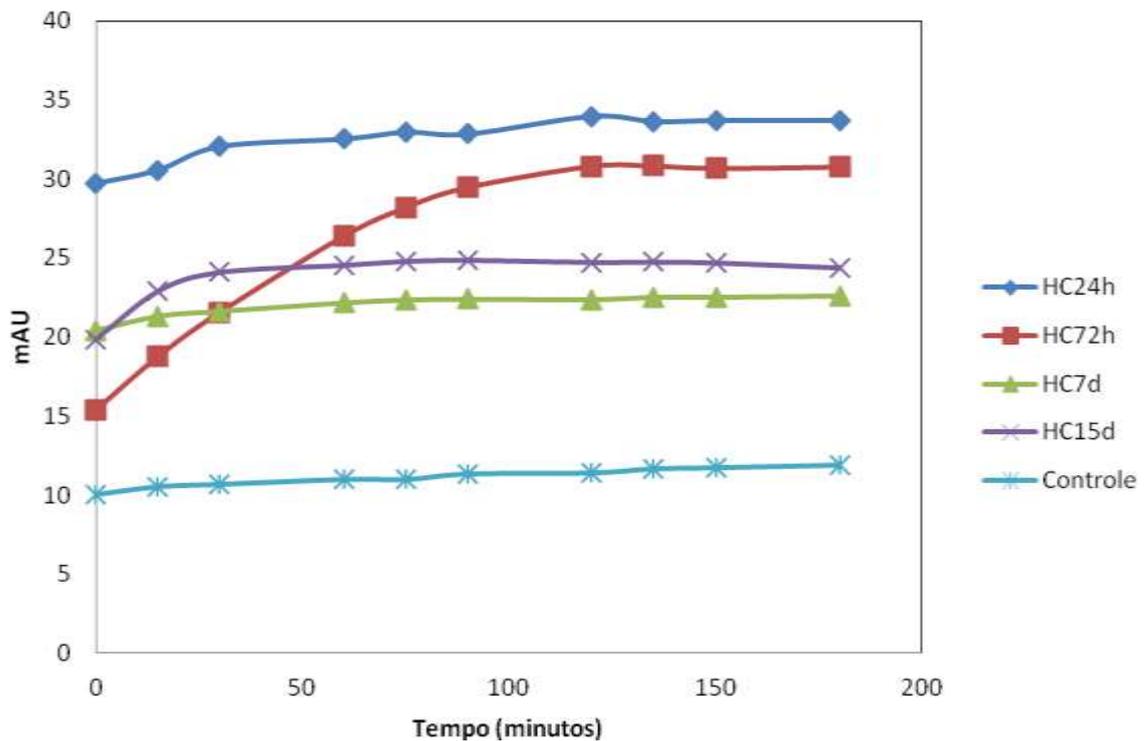


Figura 17 - Cinética enzimática temporal da atividade de MMP8 em polpa dentária de ratos nos grupos de 24 e 72 horas, 7 e 15 dias tratados com HC. Nota: Relação entre mili absorbância (mAU) e tempo (minutos).

Fonte: Do autor.

Os resultados da análise de valores da atividade enzimática de MMP8 para as amostras de tecido pulpar estão especificados na Tabela 4. A análise estatística da variável tratamento dentro de cada tempo revelou que houve diferença estatisticamente significativa para atividade enzimática de MMP8 no período de 24 horas, 72 horas, 7 e 15 dias. Às 24 horas o resultado se mostrou altamente significativo indicando que o BDT apresentou menor atividade enzimática de MMP8, caracterizando assim menor remodelação deste tecido com atividade de collagenase (0). As 72 horas, com significância semelhante a anterior (0) o BDT se igualou ao HC com menores valores de atividade enzimática de MMP8 indicando menor remodelação tissular. Aos 7 dias o grupo BDT apresentou maiores valores de atividade enzimática de MMP8 (0.0004) e aos 15 dias o grupo MTA apresentou menores valores de atividade enzimática de MMP8 se igualando estatisticamente ao HC (0.017)(FIGURA 18).

Tabela 4 - Análise estatística da relação entre os tratamentos no decorrer dos tempos experimentais para os valores de atividade de MMP8/proteína

Tempos	24 horas	72 horas	7 dias	15 dias
MTA	64.42807 ^A	46.48762 ^A	31.52658 ^B	9.595209 ^B
BDT	4.270442 ^C	12.95584 ^B	56.8695 ^A	26.69392 ^A
HC	48.93747 ^B	13.3137 ^B	32.35462 ^B	22.06575 ^{AB}
p	0*	0*	0.0004*	0.017*

*Diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$)

Grupos com letras iguais não diferem estatisticamente entre si (sentido vertical da linha).

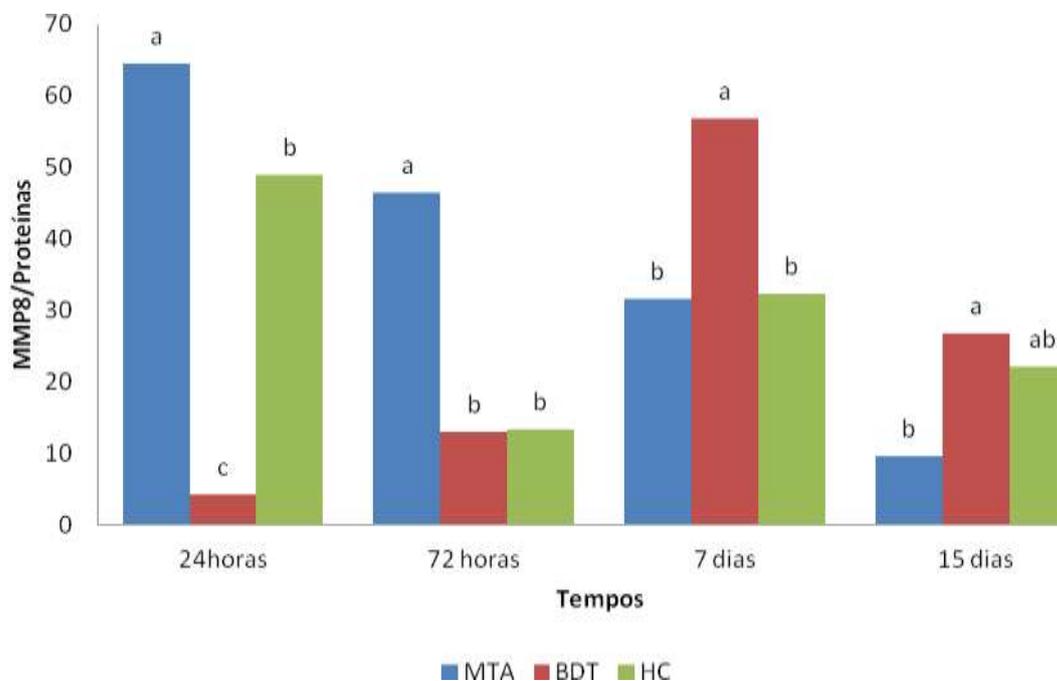


Figura 18 - Representação gráfica da análise estatística da relação entre os tratamentos no decorrer dos tempos experimentais para os valores de atividade de MMP8 (MMP8/proteína).

Fonte: Do autor.

Na Figura 19 podemos observar que o BDT apresentou aumento do valor de MMP8/proteína ao longo dos períodos experimentais, sugerindo que o material induz um aumento da remodelação tissular tardia, dificultando o processo de reparo. Diferindo do HC que oscilou durante os períodos experimentais porém, apresentando menores valores de MMP8/proteína aos 15 dias. Para o MTA o processo de diminuição da remodelação tissular pela MMP8 ocorre ao longo dos períodos experimentais indicando cicatrização do tecido pulpar.

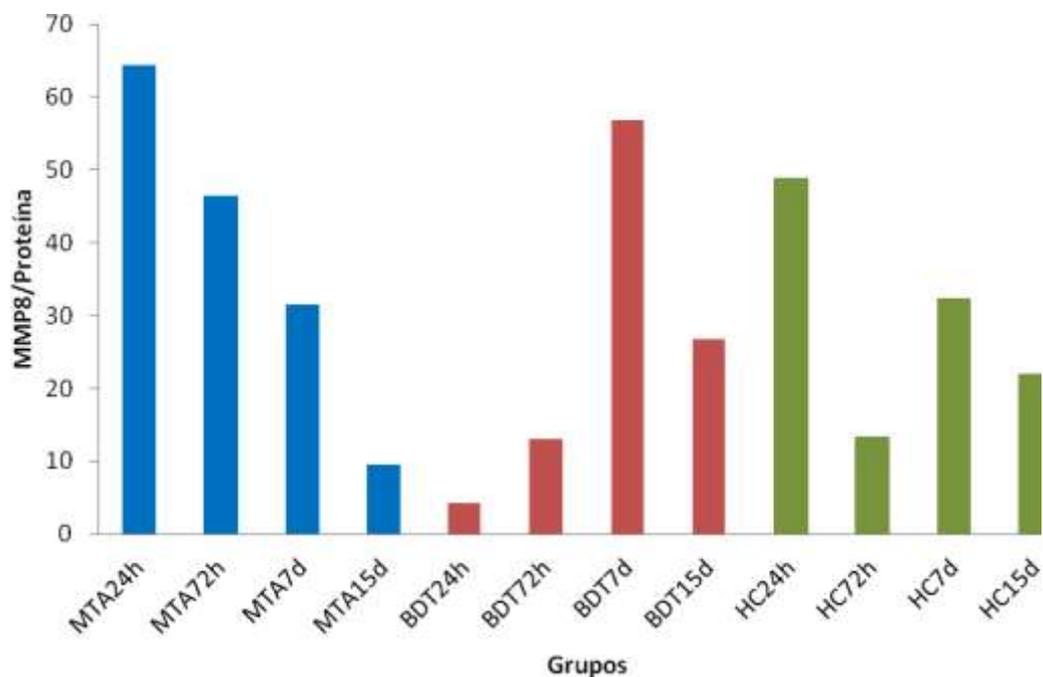


Figura 19 - Representação gráfica do valor da atividade enzimática de MMP8 por proteína nos grupos de tratamentos.

Fonte: Do autor.

Os resultados estatísticos da variável tempo dentro de cada tratamento revelou que houve diferenças estatisticamente significativas durante a evolução dos períodos experimentais (FIGURA 20). Para todos os tratamentos o ajuste de modelos polinomiais de regressão escolhido foi o quadrático, sendo que para o MTA houve 98,85% de confiança (0), BDT 89,82% de confiança (0) e HC 23,02% de confiança (0).

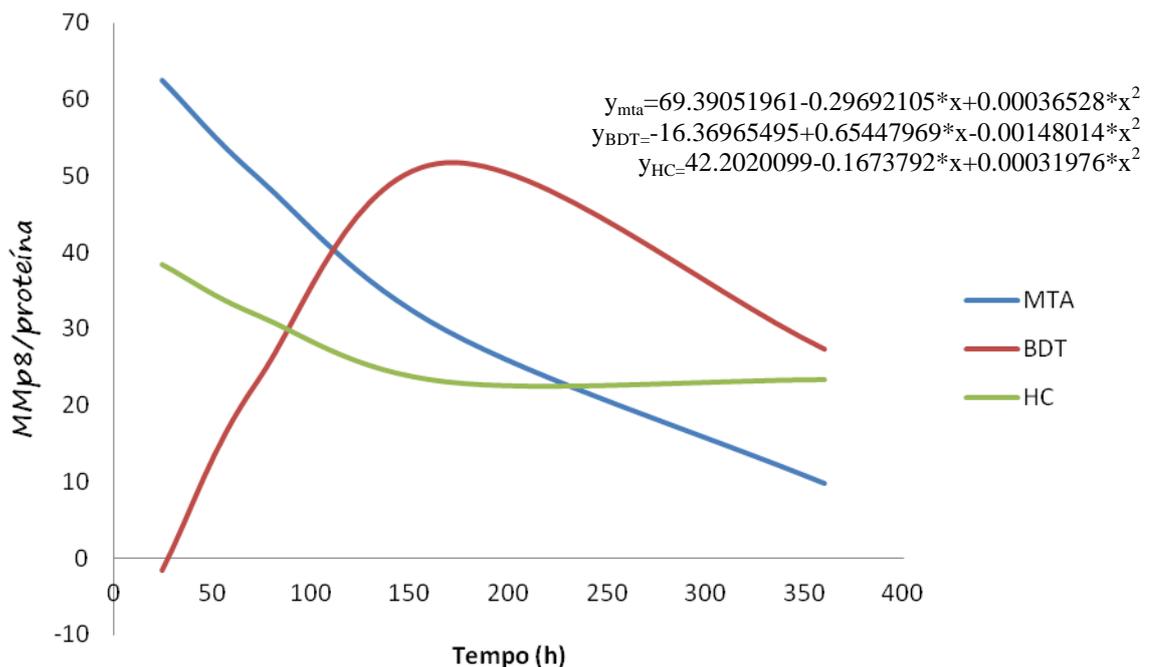


Figura 20 - Representação gráfica das funções de regressão linear ajustadas a cada tratamento ao longo do tempo de estudo para valor da atividade enzimática de MMP8 (MMP8/proteína).

Fonte: Do autor.

5.4 ENSAIO DE INIBIÇÃO DAS MMP8

O ensaio de inibição de doxiciclina apresentou uma redução de aproximadamente 90,31% da atividade de MMP8/proteínas.

5.5 CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS DE MPO E MMP8

Não houve uma correlação estatisticamente significativa entre os dados de MPO e MMP8 ($r = -0.1664$; $p = 0.332$).

6 DISCUSSÃO

Durante a progressão da cárie dentária, as moléculas envolvidas no processo, incluindo as bactérias, seus componentes e produtos de degradação da matriz dentinária interagem biologicamente com a polpa dentária. Interações moleculares e celulares são elevadas com o tecido pulpar instalando-se uma resposta imune e inflamatória e nos casos onde a infecção não é removida, o resultado pode ser a morte do tecido pulpar (COOPER et al., 2010).

Linfócitos T e B, células do plasma, neutrófilos, macrófagos se infiltram na polpa durante a progressão da cárie dentária. Estas células imunes são atraídas para o tecido pulpar como forma de defesa, porém, ironicamente também podem causar dano significativo enquanto atravessam o tecido para o local da infecção, em função da liberação de enzimas proteolíticas que danificam a matriz extracelular (COOPER et al., 2010; ACCORSI-MENDONÇA et al, 2013). Além disso, para destruir as bactérias invasoras estas células liberam quantidades significativas de ERO e enzimas de degradação incluindo as MMPs, resultando em maior lesão tecidual. A ERO produzido, incluindo ânions superóxido, H_2O_2 e radicais hidroxila, causam mais danos celulares devido aos seus efeitos deletérios no DNA, proteínas e lípideos. A exposição das células a essas moléculas pode resultar na indução de apoptose ou necrose (COOPER et al., 2010).

Um procedimento realizado em dentes decíduos com lesões de cárie profundas adjacentes à polpa, porém sem sintomatologia dolorosa espontânea e contínua denomina-se pulpotomia. O procedimento ajuda a manter a integridade de dentes decíduos que têm inflamação limitada a polpa coronária (ALAÇAM et al., 2009). Neste procedimento, a polpa coronária inflamada é removida mantendo vitalidade da polpa radicular. Sobre este remanescente pulpar radicular, diferentes materiais capeadores podem ser utilizados. A interação entre materiais capeadores em contato com o tecido pulpar é influenciada por muitos fatores, incluindo a composição do material, a concentração química, produtos de degradação e a capacidade do tecido para responder a estes agentes. O conhecimento da maneira com que estes materiais dentários interagem com o tecido pulpar é fundamental para a compreensão de como esse tecido pode ser ferido e posteriormente reparado ou regenerado durante procedimentos restauradores dentários (MURRAY; GARCÍA

GODOY; GARCÍA GODOY, 2007; YASUDA et al., 2008; FERRACANE; COOPER; SMITH, 2010).

Algumas reações em longo prazo do tecido pulpar frente a materiais capeadores utilizados em odontologia têm sido avaliadas (ALAÇAM et al., 2009; CARDOSO-SILVA et al., 2011; TRAN et al., 2012). No entanto, as reações iniciais dos materiais ainda não estão elucidadas (SHAHI et. al., 2010; DARVELL; WU, 2011). Acredita-se que as falhas de pulpotomias com utilização de alguns materiais podem estar associadas a reações inflamatórias agudas subclínicas e logo nos períodos iniciais pós pulpotomia. Por fatores éticos, estudos *in vivo* não possibilitam avaliar as reações iniciais que ocorrem quando da colocação de um material capeador sobre o remanescente pulpar radicular, já que dentes decíduos humanos não podem e não devem ser extraídos logo após o tratamento de pulpotomia. Portanto, justifica-se o modelo em animais para avaliação das respostas celulares (CENGIZ et al., 2005; SCARPARO et al., 2011; TRAN et al. 2012; KRAMER et al., 2014).

A flora bacteriana bucal dos ratos é semelhante a de humanos diferente de outras espécies utilizadas em pesquisa (VAN DIJKEN; SUNNEGÅRDH-GRÖNBERG, 2004). Quando o tecido pulpar vital é exposto, a reação inflamatória resultante é semelhante à reação em seres humanos; no entanto, a resposta biológica é mais rápida em ratos (KRAMER et al., 2014). Sendo assim, ao determinar as propriedades inflamatórias e de cura após a lesão mecânica de pulpotomia em um modelo de ratos, esta fornece resultados representantes em pacientes humanos (DAMMASCHKE et al., 2010).

Os períodos experimentais foram selecionados abrangendo a resposta aguda e crônica, pois em modelos animais, após a exposição pulpar a resposta inflamatória se estabelece e, se não tratado, a necrose pulpar ocorre gradualmente se estendendo da parte coronária do tecido pulpar até o ápice. Estudos demonstram que a inflamação periapical pode ser encontrada já no terceiro dia, sendo que necrose pulpar, reabsorção do osso alveolar e formação de lesões periapicais ocorrem entre 7 a 14 dias após a exposição pulpar. Abscessos ao redor do ápice radicular e reabsorção radicular foram formados aos 21 dias indicando que a inflamação periapical inicia-se antes da necrose pulpar. Sendo assim, citocinas e quimiocinas recrutam células em direção ao tecido pulpar promovendo o reparo ou o

dano tecidual (YAMASAKI et al., 1994; BARBOSA SILVA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008).

As pulpotomias foram realizadas nos molares inferiores de ratos conforme descrições prévias na literatura (CENGIZ et al., 2005; BARBOSA SILVA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008; TRAN et al. 2012). Para o controle da hemorragia pulpar realizou-se irrigações sucessivas de soro fisiológico estéril e secagem cuidadosa com bolinhas de algodão estéreis para evitar a formação de coágulo entre o remanescente pulpar e o material capeador utilizado, visto que a qualidade da hemostasia é fundamental para o resultado da técnica (ALAÇAM et al., 2009; ODABAŞ et al., 2011). Após este passo, um material capeador foi colocado sobre o remanescente pulpar radicular.

Um dos materiais capeadores selecionado para o presente estudo foi o MTA, pois o mesmo apresenta resultados clínicos, radiográficos e histológicos satisfatórios sendo considerado o padrão ouro para a técnica apresentando altos índices de sucesso (SRINIVASAN; PATCHETT; WATERHOUSE, 2006; MORETTI et al., 2008; PARIROKH; TORABINEJAD, 2010; CARDOSO-SILVA et al., 2011; DARVELL; WU, 2011; LIU; ZHOU; QIN, 2011; TRAIRATVORAKUL; KOOTHIRATRAKARN, 2012; HUTH et al., 2012; LOURENÇO NETO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2013). No entanto, o MTA apresenta desvantagens como conter metais pesados, alteração de cor do elemento dentário, além do seu alto custo dificultando sua utilização (SCHEMBRI; PELOW; CAMILLERI, 2010; DARVELL; WU, 2011; LEIENDECKER et al., 2012; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013; OPAČIĆ-GALIĆ et al., 2013; PÉRARD et al., 2013; WALKER et al., 2013; DE ROSSI et al., 2014; CAMILLERI, 2015; LI et al., 2015).

Escolhemos o BDT por ser um novo cimento restaurador com propriedades mecânicas e de manuseamento superiores quando comparado ao MTA (TRAN et al., 2012; CAMILLERI, 2013; KOUBI et al., 2013; NOWICKA et al., 2013; PÉRARD et al., 2013; VILLAT et al., 2013; DE ROSSI et al., 2014). Além disso, estudos recentes têm demonstrado atividade bioindutora em cultura de fibroblastos do tecido pulpar humano e compatibilidade para células pulpares, estimulando a diferenciação induzida de células cultivadas da polpa em odontoblastos e formação de focos mineralizados, semelhante ao MTA e HC (LAURENT et al., 2008; LAURENT; CAMPS; ABOUT, 2012; ZANINI et al., 2012; PÉRARD et al., 2013). Apesar do BDT já ser utilizado como material restaurador (KOUBI et al., 2013) e seja

um biomaterial indicado para o contato direto com o tecido pulpar, seu efeito biológico direto como agente de capeamento não está bem elucidado (DE ROSSI et al., 2014).

Selecionou-se o HC, por ser um material amplamente empregado em odontologia, principalmente em dentes permanentes, apresentando propriedades antibacterianas e ser considerado biocompatível (MORETTI et al., 2008; ALAÇAM et al., 2009; FERRACANE; COOPER; SMITH, 2010). Apesar de apresentar resultados clínicos, radiográficos e histológicos satisfatórios (MARKOVIC; ZIVOJINOVIC; VUCETIC, 2005; PERCINOTO; DE CASTRO; PINTO, 2006; ODABAŞ et al., 2011), o pH alcalino do HC induz necrose do tecido pulpar em torno do local lesionado levando a reabsorção radicular interna, além de formação de ponte de dentina irregular (MORETTI et al., 2008; COOPER et al., 2010; SIMON et al., 2011; TRAN et al., 2012). Sendo assim as razões para as falhas observadas com a utilização deste material permanecem injustificadas e a qualidade do tratamento controversa.

Neste estudo, os materiais capeadores foram recobertos cuidadosamente com cimento de ionômero de vidro modificado por resina (Vitrem®[®], 3M ESPE Produtos Dentários, Sumaré, SP, Brasil), por ser um material que impossibilita a microinfiltração e por apresentar boas propriedades restauradoras (MORETTI et al., 2008; SAKAI et al., 2009).

Realizadas as pulpotomias, o remanescente pulpar coberto com os diferentes materiais foi coletado nos diferentes períodos de avaliação como consta na metodologia. Como a quantidade de tecido pulpar era muito pequena, a padronização por pesagem da amostra seria inviável. Portanto, foi realizada a calibração dos testes utilizando neutrófilos humanos para verificação se o tecido pulpar coletado após pulpotomia possuía valor de absorbância (densidade ótica-450nm) que coubesse na curva de calibração, fazendo com que a concentração (cel/ μ L) de neutrófilos fosse identificada na amostra.

Em situações clínicas de exposição pulpar causada por trauma ou cárie, o tecido pulpar pode ser infectado com bactéria no momento do tratamento, o que pode acarretar em uma resposta inflamatória degenerativa comprometendo a reparação (NOWICKA et al., 2013). Em nosso estudo realizamos a pulpotomia sob condições experimentais controladas como tecido pulpar saudável, esterilização dos equipamentos, hemostasia sob irrigação suave, na qual o tecido pulpar não apresentava contaminado por bactérias. Sendo assim, na ausência de bactérias, a

técnica para a MPO não necessitou da utilização do Br^- , no tampão com o fosfato de sódio. O Br^- aumenta a capacidade da peroxidase de eosinófilos (EPO) em oxidar mais rapidamente o TMB, porém em nosso estudo não ocorre à presença de eosinófilos que são proeminentes em tecidos da pele e das mucosas e se acumulam em sítios de reações alérgicas e na periferia das lesões inflamatórias bacterianas. Não sendo necessária a distinção entre MPO e EPO que poderia ignorar diferenças importantes na natureza dos processos inflamatórios (BOZEMAN; LEARN; THOMAS, 1990), os resultados obtidos são atribuídos exclusivamente a diferenças entre os materiais para capeamento pulpar.

Durante a reação inflamatória, neutrófilos migram para o tecido através dos vasos sanguíneos, sendo capazes de ingerir microrganismos e partículas. Quando estimulados, os neutrófilos são a maior fonte de oxidantes reativos gerando radicais superóxido, H_2O_2 e liberando a MPO (WINTERBOURN; KETTLE, 2000; MATSUI et al., 2011). A MPO está envolvida na destruição bacteriana intracelular pela produção de moléculas potentes oxidativas, a partir da utilização do H_2O_2 oxidando inúmeros substratos gerando outras moléculas altamente reativas, como os ácidos principalmente o HOCl e radicais livres reativos (HEINECKE, 1999; DYPBUKT et al., 2005; FRANCK et al., 2009). A MPO é um indicador de PMN, que tem sido utilizada como um marcador inflamatório de condições agudas e crônicas (REYES-CARMONA et al., 2011).

As MMPs são pouco expressas na ausência de inflamação, ferida, ou outro processo patológico. A presença de produtos bacterianos e mediadores inflamatórios estimulam fibroblastos, neutrófilos e macrófagos a produzirem MMP induzindo a inflamação da polpa e destruição dos tecidos (CHANG; YANG; HSIEH, 2001; ACCORSI-MENDONÇA et al, 2008; ZEHNDER; WEGEHAUPT; ATTIN, 2011; EVROSIMOVSKA et al., 2012; ACCORSI-MENDONÇA et al, 2013).

A degradação do colágeno da matriz orgânica do tecido pulpar ocorre durante a inflamação aguda e crônica, sendo um processo enzimático no qual as collagenases (MMP1, 8, 13) são envolvidas neste processo destrutivo. A MMP8 em lesões inflamatórias pulpares se origina principalmente de PMN (neutrófilos) que participam da destruição de tecidos da polpa (HANNAS et al., 2007; ZEHNDER; WEGEHAUPT; ATTIN, 2011) também pode ser expressa por odontoblastos e tecido da polpa de dentes humanos totalmente desenvolvidos (TJÄDERHANE et al., 2001; ZEHNDER; WEGEHAUPT; ATTIN, 2011).

Em nosso estudo para a avaliação da atividade de MMP8 foram utilizados substratos marcados com fluoróforo, o qual é benéfico para monitorar as atividades de MMP em tempo real sem pausa da reação. A sequência de peptídeos do substrato imita o local de clivagem que está presente no substrato natural das MMPs (KUPAI et al., 2010; KRIZKOVA et al., 2011), ou seja, nas fibras de colágeno. Nos ensaios de fluorescência os níveis de MMP8 não são medidos diretamente como no ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), mas sim através do turn-over do substrato, resultando na liberação de um fluoróforo, sendo que este tipo de ensaio tem uma sensibilidade maior que o ELISA convencional (ZEHNDER; WEGEHAUPT; ATTIN, 2011). O fluoróforo utilizado foi do tipo intrínseco, o qual faz parte de um sistema que já emite fluorescência. No presente trabalho a proteína possui o aminoácido Trp e tirosina (Tyr) contendo anéis aromáticos que já são fluorescentes. No entanto, os resíduos de Tyr não são sensíveis ao ambiente que os rodeia e, por isso, não fornecem informação acerca da estrutura das proteínas. Os resíduos de Trp podem emitir fluorescência desde os 308 até aos 352nm, dependendo das propriedades do ambiente que os rodeiam na proteína. Assim, o desvio da posição do máximo de fluorescência dependerá do quão polar e flexível é o ambiente do Trp. O aumento de fluorescência é proporcional com o grau de degradação de substrato e, assim, com a atividade de MMP (BURSTEIN; ABORNEV; RESHETNYAK, 2001; LAKOWICZ et al., 2006; KRIZKOVA et al., 2011).

A avaliação da atividade da MPO em tecido pulpar de ratos após a pulpotomia foi utilizada para correlacionar o nível de atividade da MPO com o número de PMN, caracterizando um quadro inflamatório do tecido pulpar com presença de neutrófilos (KANER et al., 2006; ACCORSI-MENDONÇA et al, 2013). A escolha da avaliação da atividade de MPO pelo teste bioquímico como calibrador para a quantificação de neutrófilos evita problemas e limitações da técnica histológica que requer a inspeção de múltiplos cortes seriados, visto que a distribuição de neutrófilos pelo tecido é heterogênea (MENDONÇA, 2009). Na técnica histológica podem-se quantificar os neutrófilos, no entanto, estes podem estar ativos ou não, ou seja, poucos neutrófilos ativos influenciam mais na resposta inflamatória que vários neutrófilos inativos. Desta forma, o teste bioquímico foi essencial para avaliar a atividade dos neutrófilos

Após a pulpotomia ocorre um processo inflamatório pulpar que induz a liberação de mediadores inflamatórios como a interleucina 8, fator de necrose tumoral α , estimulando principalmente os neutrófilos a produzir MMP8, sendo

capazes de degradar os tecidos da matriz extracelular alterando o comportamento e microambiente celular (HANNAS et al., 2007; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008; BARBOSA SILVA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008; MINAMIKAWA et al., 2009; ZEHNDER; WEGEHAUPT; ATTIN, 2011). Quanto menor a presença de MMP8 no tecido pulpar maior a possibilidade de formação de dentina reparadora, pois esta é considerada essencial para a modulação dos tecidos durante a formação da dentina normal regulando a síntese e degradação do colágeno (BERGENHOLTZ, 2000; EVROSIMOVSKA et al., 2012). Reyes-Carmona et al. (2010) descreveram que durante a inflamação aguda a matriz orgânica medeia a nucleação e regula o crescimento dos cristais minerais. O colágeno tipo I é o molde para a deposição de fosfato de cálcio, mas sozinho ele não possui a capacidade de induzir a mineralização específica da matriz. Sendo assim, fica clara a importância do conhecimento dos fatores que podem regular síntese e secreção das MMPs em tecido pulpar inflamado (CHANG; YANG; HSIEH, 2001; WAHLGREN et al. 2002; HANNAS et al., 2007; ZEHNDER; WEGEHAUPT; ATTIN, 2011). Em nosso estudo, a avaliação da atividade da MMP8 em tecido pulpar de ratos após a pulpotomia foi utilizada para correlacionar o nível de atividade da MMP8 com a remodelação tissular e atividade de colagenase, já que a presença da alta atividade de MMP8 impede a formação de cristais minerais, correlacionando o processo inflamatório com a biomineralização (REYES-CARMONA et al., 2010).

Apesar dos progressos alcançados na compreensão dos eventos biológicos e moleculares que controlam a ação do MTA (GOMES; FILHO; DE OLIVEIRA, 2008; TRAN et al., 2012; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013;), do BDT (LAURENT et al., 2008; TRAN et al., 2012; RAJASEKHARAN et al., 2014) e HC (TRAN et al., 2012; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013; OLIVEIRA et al., 2013) o mecanismo de cicatrização de feridas permanecem obscuros. Sendo assim nosso estudo correlacionou a resposta inflamatória do tecido pulpar com a capacidade de cura do mesmo, já que a reparação está intimamente relacionada com o início da inflamação (REYES-CARMONA et al., 2010).

Este estudo *in vivo* confirmou a presença de um quadro inflamatório com atividade de MPO, indicativo bioquímico de atividade de neutrófilos, e MMP8, indicativo bioquímico de remodelação deste tecido com atividade de colagenase, na polpa de molares de rato após pulpotomia para todos os materiais testados superiores ao controle. O controle foi o tecido pulpar coletado imediatamente após a

abertura coronária representando a atividade da MMP8 e MPO induzida pelo procedimento clínico no tecido pulpar, porém esta atividade elevou-se após a colocação do material sobre o tecido pulpar durante os períodos experimentais indicando a presença da reação inflamatória induzida pelo agente capeador.

A atividade de MPO para o grupo MTA apresentou-se estatisticamente significativa maior que os demais materiais no período de 24 horas. A atividade de MMP8 para o grupo MTA apresentou-se estatisticamente significativa maior que os demais materiais no período de 24 e 72 horas indicando assim que a resposta inflamatória inicial, que se dá através do contato do tecido pulpar com o MTA, é caracterizada pela atividade intensa de neutrófilos com atividade de colagenases e remodelação tissular.

Aos 15 dias a atividade de MPO e MMP8 foi a menor para o grupo MTA dentre os materiais testados demonstrando uma pequena presença de neutrófilos ativos no tecido com diminuição da remodelação tissular pela MMP8 indicando a cicatrização do tecido pulpar. Os eventos químicos relacionados ao efeito anti-inflamatório do MTA sobre o tecido pulpar não estão bem descritos e são de grande importância para a indicação e avaliação da qualidade do tratamento (MINAMIKAWA et al., 2009; REYES-CARMONA et al., 2010; DARVELL; WU, 2011).

O tecido pulpar sobre o qual o MTA é geralmente aplicado contém várias células envolvidas na resposta inflamatória inicial, dentre elas estão presentes os PMN (neutrófilos) e monócitos. Níveis de fator de necrose tumoral α foram sobre-expressos por macrófagos expostos ao MTA induzindo a inflamação pulpar, com recrutamento de linfócitos e monócitos para locais de infecção e estimulação de células endoteliais para expressarem moléculas de adesão e secretar citocinas (APAYDIN; SHABAHANG; TORABINEJAD, 2004; BARBOSA SILVA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008; MINAMIKAWA et al., 2009; CARDOSO-SILVA et al., 2011). Estas citocinas estimulam a produção de MMP8 pelos neutrófilos no grupo MTA iniciando um processo avançado de remodelação tissular como detectado em nosso estudo.

Em nosso estudo comprovamos que o MTA induz intensa atividade de neutrófilos com remodelação tissular nos períodos iniciais, semelhante aos estudos presentes na literatura nos quais, Rezende et al. (2007); Gomes; Filho; De Oliveira, (2008) demonstraram que a administração intraperitoneal de MTA em ratos, induziu a migração de neutrófilos dependente de mastócitos e macrófagos através da

liberação de mediadores inflamatórios predominantemente citocinas como MIP-2 e IL-2 β . Reyes-Carmona et al. (2010) demonstraram através da imunocoloração de MPO que neutrófilos foram as células predominantes no local do implante durante o primeiro dia, diminuindo ao 3º dia indicando o início da fase de resolução do processo inflamatório através da transição da fase pró-inflamatória aguda para anti-inflamatório e de cicatrização de feridas crônicas.

Acreditamos que o MTA apresenta atividade potencialmente curativa promovendo a cicatrização de feridas na parte coronária do dente, mantendo a integridade da polpa após a pulpotomia, resultados estes observados em nosso estudo e comprovados por Arens; Torabinejad (1996), Bodem et al. (2004), Camilleri et al. (2004), Barbosa Silva; Vieira; Sobrinho (2008), Moretti et al. (2008), Sakai et al. (2009). O efeito anti-inflamatório demonstrado em nosso estudo pela baixa atividade de MPO e MMP8 a partir de 7 dias, pode ser justificado pelo efeito anti-inflamatório associado à baixa expressão de citocinas inflamatórias pelo MTA dentre elas o CCL5 que exibe uma atividade significativa em direção a eosinófilos e monócitos, IL-6 estimula a diferenciação e recrutamento de osteoclastos, IL-1 α potente indutor de remodelação óssea, TNF α que induz a inflamação pulpar, favorecendo a cicatrização pulpar e formação de tecido duro (BARBOSA SILVA; VIEIRA; SOBRINHO, 2008; DARVELL; WU, 2011).

O pó do MTA contém partículas finas hidrofílicas como óxido de cálcio que em contato com água é convertido em HC, que por sua vez, em contato com os fluidos teciduais dissocia em íons cálcio e íons hidroxila. O cálcio reage com o dióxido de carbono presente nos tecidos produzindo granulações de calcita e fibronectina, que leva à migração celular, adesão e diferenciação com a formação de tecidos duros (GOMES; FILHO; DE OLIVEIRA, 2008; SHAHI et al., 2010).

Os altos valores de atividade de MPO e MMP8 para o grupo MTA no período de 24 horas encontrado em nosso estudo pode ser atribuído aos altos valores de pH inicial (9.32 ± 0.51) pela formação de HC durante a reação de hidratação do MTA induzindo a liberação de citocinas inflamatórias (DAMMASCHKE et al., 2010; MOHAMMADI; DUMMER, 2011; REYES-CARMONA et al., 2011; CHANG, 2012; RAJASEKHARAN et al., 2014).

Já a diminuição da atividade de MPO e MMP8 no período experimental de 15 dias para o grupo MTA, pode se justificar pelo processo de maturação formando a hidroxiapatita deficiente de cálcio na superfície do MTA. Esta é composta pelo cálcio

liberado durante a hidratação do MTA, íon fosfato e hidroxila dos fluidos corporais ao redor do MTA fazendo com que a quantidade de HC disponível diminua reduzindo os valores de pH (8.45 ± 0.26), e conseqüentemente a resposta inflamatória por ele causada (HOLLAND et al., 2001; CAMILLERI et al., 2004; BOZEMAN; LEMON; ELEAZER, 2006; GOMES; FILHO; DE OLIVEIRA, 2008; REYES-CARMONA et al., 2010; SHAHI et al., 2010; DARVELL; WU, 2011; HAN; OKIJI, 2011; REYES-CARMONA et al., 2011; CHANG, 2012; RAJASEKHARAN et al., 2014).

Nossos resultados não condizem com a justificativa de que o MTA apresenta um longo tempo de presa, liberando mais íons dificultando a cicatrização do tecido pulpar, e também com a afirmação de que a hidratação do óxido de cálcio contido no MTA resulta numa reação exotérmica, produzindo condições menos favoráveis para o reparo da polpa (CAMILLERI, 2008; HAN; OKIJI, 2011; CAMILLERI, 2013; DE ROSSI et al., 2014), já que detectamos claramente o potencial cicatrizante do material já a partir de 7 dias.

A atividade de MPO e MMP8 para o grupo BDT apresentou-se significativa menor que os demais materiais no período de 24 horas. Os valores foram mantidos baixos no período de 72 horas indicando assim que a resposta inflamatória inicial, que se dá através do contato do tecido pulpar com o BDT, é caracterizada pela baixa atividade de neutrófilos com pequena atividade de colagenases e remodelação tissular. Aos 15 dias a atividade de MPO e MMP8 foi a maior para o grupo BDT igualando-se ao HC demonstrando uma alta atividade de neutrófilos no tecido com aumento da remodelação tissular indicando aumento do processo inflamatório tardio.

O silicato tricálcico é o maior constituinte do BDT, pelo fato de ser bioativo quando hidratado, libera silicato de cálcio hidratado e HC o qual reage na presença de fluidos fisiológicos produzindo hidroxiapatita em contato com o material. O carbonato de cálcio atua como um local de nucleação que permite a formação de reação em torno dele, aumentando assim a hidratação e a produção de uma microestrutura densa. O cloreto de cálcio foi acrescentado para redução do tempo de presa do silicato tricálcico de 28 dias para 90 a 180 minutos. O acréscimo dos polímeros hidrossolúveis diminuiu a quantidade de água incorporada aumentando a força de compressão que só é obtida após 28 dias (LAURENT et al., 2008; LEIENDECKER et al., 2012; CAMILLERI; SORRENTINO; DAMIDOT, 2013; GRECH; MALLIA; CAMILLERI, 2013; PÉRARD et al., 2013; DE ROSSI et al., 2014; RAJASEKHARAN et al., 2014).

Apesar do BDT e MTA apresentarem uma bioatividade semelhante, a diferença na taxa inicial de atividade de MMP8 e MPO entre os grupos pode se justificar pela diferença nos valores do pH inicial. Os valores obtidos de pH para o BDT no período de 24 horas (8.88 ± 0.27) foi menor que o MTA (9.32 ± 0.51) provavelmente induzindo a liberação de menor quantidade de citocinas inflamatórias pelo BDT e menor atividade neutrofílica (GRECH; MALLIA; CAMILLERI, 2013; RAJASEKHARAN et al., 2014). A reação de hidratação do óxido de cálcio para o MTA obtém altas concentrações de HC causando alcalinidade e irritabilidade celular imediatamente após a colocação do material em contato com o tecido pulpar. Ao contrário do BDT no qual a reação do silicato tricálcico forma HC e silicato de cálcio hidratado que reage com o carbonato de cálcio formando sítios de nucleação que inicialmente produzem uma estrutura porosa e em duas semanas o carbonato de cálcio preenche estas porosidades fazendo com que a liberação de HC e o aumento da resistência mecânica ocorram ao longo do tempo (LAURENT et al., 2008; CAMILLERI; SORRENTINO; DAMIDOT, 2013).

No entanto, em nosso estudo verificamos um processo inflamatório tardio com atividade de neutrófilos quando utilizamos o BDT sobre o tecido pulpar de ratos, semelhante ao estudo de Tran et al. (2012) no qual, notou-se uma ligeira inflamação aos 7 dias que foi detectável também em outros períodos de tempo em amostras tratadas com BDT. Segundo Camilleri (2008), este fato pode ser explicado por conta do cimento de silicato de tricálcio liberar HC durante a cura promovendo um efeito irritante prolongado nos tecidos pulpares, como demonstrado por Han, Okiji (2011) que mediram a quantidade de íons cálcio liberadas pelo BDT e MTA imersos em água destilada e observaram que no período de 144-168 horas a liberação de íons cálcio pelo BDT é maior que o MTA (14.7 ± 2.01 mg/l e 9.7 ± 0.26 mg/l respectivamente). Segundo Grech; Mallia; Camilleri, (2013) o BDT apresenta uma baixa liberação de cálcio em solução balanceada de Hank's após 24 horas, sendo que o aumento da liberação de cálcio começa a partir dos 7 dias e apresenta seu pico aos 14 dias (1063.33 ppm⁻¹ de Cálcio) . Em nosso estudo observamos que o aumento da resposta inflamatória para o BDT se mostrou presente a partir dos 7 dias e aumentou aos 15 dias indicando que a liberação de altas concentrações de cálcio induzem um aumento nos valores de pH e conseqüente maior liberação de citocinas inflamatórias e atividade enzimática de MPO e MMP8 (TRAN et al., 2012; ZANINI et al., 2012; GRECH; MALLIA; CAMILLERI, 2013; DE ROSSI et al., 2014).

Sendo assim, o aumento da atividade de MMP8 promove uma maior degradação de colágeno tipo I culminando com uma menor formação de tecido mineralizado, já que a mesma se inicia durante a fase aguda da inflamação (REYES-CARMONA et al., 2010).

Segundo Laurent et al. (2008), o BDT não é citotóxico e genotóxico para os fibroblastos pulpares, além disto, células tratadas com o BDT e MTA após 24 horas expressaram colágeno tipo I que é o principal substrato para a MMP8. Entretanto o contato prolongado do material com a dentina pode afetar de forma adversa a sua força e resistência à fratura, já que a tenacidade é atribuída a matriz de colágeno. O material promove um efeito adverso sobre a matriz de colágeno onde o HC que apresenta baixo peso molecular penetra entre os cristais de apatita carbonatada e as fibrilas de colágeno na dentina alterando a conformação tridimensional da matriz de colágeno dentinária, representando uma limitação do material para restauração e obturações de canais radiculares com parede dentinária fina (LEIENDECKER et al., 2012).

A atividade de MPO e MMP8 para o grupo HC apresentou-se numericamente intermediária aos demais materiais em todos os períodos experimentais, exceto para MPO aos 7 dias onde ele se apresentou estatisticamente maior que os demais materiais. Aos 15 dias a atividade de MPO e MMP8 para o grupo HC foi estatisticamente semelhante ao BDT para a atividade de MMP8 demonstrando uma alta atividade de neutrófilos no tecido com aumento da remodelação tissular pela MMP8 indicando aumento do processo inflamatório dificultando a cicatrização. Porém, apesar de valores numéricos maiores que o MTA, o HC se igualou estatisticamente ao mesmo.

Existem divergências quanto à aplicação do HC em pulpotomia, pois seu uso frequentemente resulta no desenvolvimento de inflamação crônica e reabsorção pulpar interna da raiz (SONMEZ; SARI; CETINBAS, 2008; ALAÇAM et al., 2009; HUTH et al., 2012; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013; PÉRARD et al., 2013). As falhas da pulpotomia com HC estão associadas com a presença de reabsorção interna e inflamação pulpar presentes antes do tratamento, além do controle da hemorragia, que deve ser feita através de irrigação sucessivas de soro, secagem sem compressão com bolinhas estéreis de algodão, e escolha do material restaurador (BRISO et al., 2006; SONMEZ; SARI; CETINBAŞ, 2008; ZURN; SEALE, 2008; ALAÇAM et al., 2009; ODABAŞ et al., 2011; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY,

2013). Segundo Odabaş et al. (2011) com a falta de controle do sangramento pulpar, os eritrócitos são hemolizados à hemosiderina pelos macrófagos, e o excesso desses é prejudicial para a vitalidade pulpar retardando a cura do mesmo. Estes fatores indicam a alta complexidade para a realização de pulpotomia com HC. Porém, a maioria dos estudos é comparativa, com o mesmo operador realizando a técnica e mesmo assim falhas clínicas, radiográficas e histológicas são observadas, fazendo com que sua utilização para pulpotomias seja imprecisa (MORETTI et al., 2008; VILLAT et al., 2010; MOHAMMADI; DUMMER, 2011).

Estudos sugerem que a resposta clínica dos tecidos dentários frente ao MTA e HC sejam semelhantes devido ao seu mecanismo de ação de liberação de íons cálcio e hidroxila (HOLLAND et al., 1999; DOMINGUEZ et al., 2003; FERRACANE; COOPER; SMITH, 2010; REYES-CARMONA et al., 2011). Aeinehchi et al. (2003), demonstraram histologicamente que o HC após uma semana do capeamento pulpar apresentava uma inflamação aguda e crônica rica em PMNs e linfócitos, ao contrário do MTA onde estava presente uma inflamação crônica leve com a presença de alguns PMNs e linfócitos e necrose e hiperemia leve. Os nossos resultados demonstraram que o HC apresentou atividade neutrofilica estatisticamente maior que os demais materiais no período de 7 dias, ao contrário do MTA que apresentou um decréscimo da atividade de MPO e MMP8 indicando diminuição da incidência de inflamação com presença de neutrófilos e remodelação do tecido pulpar se assemelhando aos resultados descritos acima, diferenciando a resposta do tecido pulpar frente aos dois materiais. Reyes-Carmona et al. (2011) observaram que o MTA provoca uma resposta pró-inflamatória e pró-reparo em menos tempo (AEINEHCHI et al., 2003; LI et al., 2015) do que a observada em HC. O HC apresenta áreas maiores de necrose por coagulação dos tecidos em contato com o material levando a uma diminuição na viabilidade celular e em microvascularização local causando uma inflamação imediata.

O mecanismo de ação do HC no reparo da polpa também é atribuído ao seu pH alcalino (12.5-12.8), através do grupo hidroxila que incentiva reparação e calcificação ativa (MOHAMMADI; DUMMER, 2011). O pH alcalino produz uma área superficial de necrose por coagulação do tecido pulpar (CAMILLERI, 2008; MODENA et al., 2009; COOPER et al., 2010; DE ROSSI et al., 2014), fazendo com que as células em contato com o material sofram apoptose e o tecido pulpar subjacente seja responsável pela reação inflamatória benéfica que começa o

processo de reparação e formação de barreira de tecido duro, já que o HC não é considerado bioindutor (MODENA et al., 2009). Segundo Tran et al. (2012) MTA, BDT e HC induzem necrose do tecido pulpar nos primeiros momentos, sendo que esta necrose somente é visualizada em períodos maiores de tempo para o grupo HC.

Pode-se supor que por causa da sua baixa solubilidade (MOHAMMADI; DUMMER, 2011), o HC tenha um efeito irritante prolongado pelo lançamento constante de íons cálcio e hidroxila (CAMILLERI, 2008; COOPER et al., 2010; DE ROSSI et al., 2014). Em nosso estudo observamos que a atividade de MPO e MMP8 para o HC apresentou-se intermediária em todos os períodos experimentais indicando que a indução da remodelação tissular e atividade neutrofílica são constantes e por um longo período de tempo, demonstrando seu potencial irritante prolongado, dificultando o processo de cura do tecido pulpar. Segundo Modena et al. (2009) o pH alcalino neutraliza o ácido láctico produzido pelos osteoclastos e previne a destruição do tecido mineral. O HC atua como um tampão local contra os ácidos da resposta inflamatória, além de reduzir a permeabilidade dos capilares sanguíneos aumentando as concentrações de cálcio na área a ser mineralizada. Em nosso estudo observamos que a resposta inflamatória neutrofílica e remodelação tissular permaneceram altas para o HC discordando dos achados descritos acima fazendo com que a resposta ao material seja imprevisível (NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013).

De acordo com os estudos de Moretti et al. (2008); Sonmez, Sari, Cetinbas (2008); Dammaschke et al. (2010); Villat et al. (2010); Mohammadi, Dummer (2011); Huth et al. (2012); Li et al. (2015) o HC promove uma alcalinidade no tecido pulpar subjacente induzindo a necrose superficial que pode ser metabolizado e substituído por tecido de granulação e, através da proliferação de capilares e fibroblastos pode iniciar a reparação do tecido pulpar. Além disto, a saturação com íons cálcio pode estimular a diferenciação celular e a formação de tecido mineralizado. No entanto, a necrose superficial proveniente de uma reação inflamatória aguda pode ser a causa de inúmeros insucessos do HC em pulpotomias de dentes decíduos levando a reabsorção interna. Em nosso estudo observamos a presença de atividade neutrofílica intensa aos 7 dias indicando que esta necrose, que atua como corpo estranho, induz a inflamação exacerbada do tecido pulpar.

A solubilidade do HC pode causar infiltração bacteriana a partir da bifurcação ou restauração coronária levando a fracassos clínicos e radiográficos (YILDIZ; TOSUN, 2014). Os veículos misturados com o pó do HC buscam controlar a velocidade de dissociação iônica, fazendo com que a pasta seja solubilizada e reabsorvida em diferentes velocidades pelos tecidos periapicais e no canal radicular. Quanto mais baixa for a viscosidade, maior será a dissociação iônica. Os pesos moleculares elevado dos veículos utilizados minimizam a dispersão do HC mantendo a pasta em contato com o tecido por um longo período de tempo (NELSON FILHO et al., 1999; ATHANASSIADIS; ABBOTT; WALSH, 2007; MOHAMMADI; DUMMER, 2011). Em nosso estudo utilizamos o HC associado a solução salina estéril, um veículo aquoso que promove uma rápida liberação de íons (HUTH et al., 2005; MORETTI et al., 2008; HUTH et al., 2012; NOSRAT; PEIMANI; ASGARY, 2013; OLIVEIRA et al., 2013), porém a utilização de veículos com diferentes viscosidades não alterou a taxa de sucesso do material (ZURN; SEALE, 2008; YILDIZ; TOSUN, 2014).

Segundo Tran et al. (2012) após 14 dias da realização de pulpotomias em molares de ratos e após a análise imunohistoquímica, estruturas reparativas pobremente organizadas com muitas inclusões de células foram observadas no grupo do HC. Uma camada de necrose persistente foi observada em todos os grupos testados em proximidade com o local de exposição, mas era maior nos grupos tratados com HC, sendo esta causada pelo pH alcalino induzindo a inflamação pulpar que quando controlada promove a cicatrização do tecido pulpar. Em nosso estudo observamos que o resultado obtido para atividade de MMP8 e atividade de MPO em polpa dentária de ratos aos 15 dias manteve-se intermediária aos demais materiais indicando a cronificação do processo inflamatório com remodelação tissular e atividade neutrofílica. Sendo assim, acreditamos que o insucesso das pulpotomias com HC não esta relacionado com uma inflamação pulpar pré-existente e sim com o poder irritativo produzido pelo material. Portanto, concluindo que os resultados clínicos utilizando HC permanecem inconsistentes e imprevisíveis já que a resposta do tecido pulpar frente ao HC não evoluiu para a cicatrização do mesmo, demonstrando o processo de defesa do tecido pulpar frente ao material, devido ao efeito irritante prolongado.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que embora todos os materiais apresentaram atividade de MPO e MMP8 maior que o grupo controle, o MTA demonstrou um decréscimo de valores indicando uma atividade potencialmente curativa no tecido pulpar. Ao contrário do BDT e HC que apresentaram alta atividade neutrofílica e de colagenase ao longo dos períodos experimentais aumentando seu potencial irritante dificultando o processo cicatricial.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-NAIM, A. B.; MOHAMADIN, A.M. Myeloperoxidase-catalyzed oxidation of chloroacetonitrile to cyanide. **Toxicol. Lett.**, v. 146, n. 3, p. 249-257, feb. 2004.
- ABU-SOUD, H.M.; HAZEN, S.L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 8, p. 5425-5430, feb. 2000.
- ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. **J. Mol. Histol.**, v. 39, n. 2, p. 201-208, apr. 2008.
- ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Evaluation of gelatinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2, and myeloperoxidase protein in healthy and inflamed human dental pulp tissue. **J. Endod.**, v. 39, n. 7, p. 879-882, jul. 2013.
- AEINEHCHI, M. et al. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. **Int. Endod. J.**, v. 36, n. 3, p. 225-231, mar. 2003.
- AGAMY, H. A. et al. Comparison of mineral trioxide aggregate and formocresol as pulp-capping agents in pulpotomized primary teeth. **Pediatr. Dent.**, v. 26, n. 4, p. 302-309, july/aug. 2004.
- ALAÇAM, A. et al. Clinical and radiographic outcomes of calcium hydroxide and formocresol pulpotomies performed by dental students. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 108, n. 5, p. 127-133, nov. 2009.
- ANDREWS, P. C.; KRINSKY, N. I. Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate. **Anal Biochem.**, v. 127, n. 2, p. 346-350, dec.1982.
- APAYDIN, E. S.; SHABAHANG, S.; TORABINEJAD, M. Hard-tissue healing after application of fresh or set MTA as root-end-filling material. **J. Endod.**, v. 30, n. 1, p. 21-24, jan. 2004.
- ARENS, D. E.; TORABINEJAD, M. Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate: two case reports. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 82, n. 1, p. 84-88, july 1996.
- ASGARY, S. Calcium-enriched mixture pulpotomy of a human permanent molar with irreversible pulpitis and condensing apical periodontitis. **J. Conserv. Dent.**, v. 14, n. 1, p. 90-93, jan. 2011.
- ASGARY, S. et al. Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate. **J. Endod.**, v. 31, n. 2, p. 101-103, feb. 2005.

ATHANASSIADIS, B.; ABBOTT, P. V.; WALSH, L. J. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. **Aust. Dent. J.**, v. 52, n. 1, p. 64-82, mar. 2007.

AUGSBURGER, R. A.; PETERS, D. D. In vitro effects of ice, skin refrigerant, and CO₂ snow on intrapulpal temperature. **J. Endod.**, v. 7, n. 3, p. 110-116, mar. 1981.

BABIOR, B.M. The respiratory burst of phagocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 73, n. 3, p. 599-601, mar. 1984.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 42-47, feb. 2004.

BABIOR, B. M.; LAMBETH, J. D.; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 397, n. 2, p. 342-344, jan. 2002.

BARBOSA SILVA, M. J.; VIEIRA, L. Q.; SOBRINHO, A. P. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.105, n.5, p. 70-76, may. 2008.

BER, B. S.; HATTON, J. F.; STEWART, G. P. Chemical modification of proroot mta to improve handling characteristics and decrease setting time. **J. Endod.**, v. 33, n. 10, p. 1231-1234, oct. 2007.

BERGENHOLTZ, G. Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 11, n. 4, p. 467-480, 2000.

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

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J. Periodontol.**, v. 64, n. 5, p. 474-484, may, 1993.

BLANCHARD, S.; BOYNTON, J. Current pulp therapy options for primary teeth. **J. Mich. Dent. Assoc.**, v. 92, n. 1, p. 40-41, jan. 2010.

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

BORREGAARD, N.; SØRENSEN, O. E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends Immunol.**, v. 28, n. 8, p. 340-345, aug. 2007.

BOZEMAN, P. M.; LEARN, D. B.; THOMAS, E. L. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. **J. Immunol. Methods.**, v. 126, n. 1, p. 125-133, jan. 1990.

BOZEMAN, T. B.; LEMON, R. R.; ELEAZER, P. D. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. **J. Endod.**, v. 32, n. 5, p. 425-428, may 2006.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, may 1976.

BRISO, A. L. et al. Biological response of pulps submitted to different capping materials. **Braz. Oral Res.**, v. 20, n. 3, p. 219-225, jul-sep 2006.

BURSTEIN, E. A.; ABORNEV, S. M.; RESHETNYAK, Y. K. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. I. Decomposition algorithms. **Biophys. J.**, v. 81, n. 3, p. 1699-1709, sep. 2001.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, n. 4, p. 22-230, aug. 2000.

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

CAMILLERI, J. et al. Biocompatibility of two commercial forms of mineral trioxide aggregate. **Int. Endod. J.**, v. 37, n. 10, p. 699-704, oct. 2004.

CAMILLERI, J. Characterization of hydration products of mineral trioxide aggregate. **Int. Endod. J.**, v. 41, n. 5, p. 408-417, may 2008.

CAMILLERI, J. Investigation of Biodentine as dentine replacement material. **J. of Dent.**, v. 41, n. 7, p. 600-610, may 2013.

CAMILLERI, J.; SORRENTINO, F.; DAMIDOT, D. Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. **Dent. Mater.**, v. 29, n. 5, p. 580-593, may 2013.

CAMILLERI, J. Staining Potential of Neo MTA Plus, MTA Plus, and Biodentine Used for Pulpotomy Procedures. **J. Endod.**, apr. 2015.

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

CAVALCANTI, B. N.; RODE, S. M.; MARQUES M. M. Cytotoxicity of substances leached or dissolved from pulp capping materials. **Int. Endod. J.**, v.38, n.8, p. 505-509, aug. 2005.

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

CHANG, S. W. Chemical characteristics of mineral trioxide aggregate and its hydration reaction. **Restor. Dent. Endod.**, v. 37, n. 4, p. 188-193, nov. 2012.

CHANG, Y. C.; YANG, S. F.; HSIEH, Y. S. Regulation of matrix metalloproteinase-2 production by cytokines and pharmacological agents in human pulp cell cultures. **J. Endod.**, v. 27, n. 11, p. 679-682, nov. 2001.

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

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

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

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood.**, v. 112, n. 4, p. 935-945, aug. 2008.

DAMMASCHKE, T. et al. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an immunohistologic comparison with calcium hydroxide in rodents. **J. Endod.**, v. 36, n. 5, p. 814-819, may 2010.

DARVELL, B. W.; WU, R. C. "MTA"-an Hydraulic Silicate Cement: review update and setting reaction. **Dent. Mater.**, v. 27, n. 5, p. 407-422, may 2011.

DAVIES, M. J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 48, n. 1, p. 8-19, jan. 2011.

DEMARCO et al. Pulp response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. **Quintessence Int.**, v.32, n.3, p. 211-220, mar. 2001.

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

DOMAGALA-KULAWIK, J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. **J. Physiol. Pharmacol.**, v.6, p. 19-34, dec. 2008.

DOMINGUEZ, M. S. et al. Histological and scanning electron microscopy assessment of various vital pulp – therapy materials. **J. Endod.**, v. 29, n. 5, p. 324-333, may 2003.

DYPBUKT, J. M. et al. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 39, n. 11, p. 1468-1477, aug. 2005.

EUA. International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)**.1992. Disponível em:
< <http://www.enzyme-database.org/query.php?ec=EC3.4.24.34>> Acessado em: 26 out. 2014.

- EVROSIMOVSKA, B. et al. Concentration of collagenases (MMP-1, -8, -13) in patients with chronically inflamed dental pulp tissue. **Prilozi.**, v. 33, n. 2, p. 191-204, dec. 2012.
- FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 14, p.1317-1327, nov. 2003.
- FERRACANE, J. L.; COOPER, P. R.; SMITH, A. J. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? **Odontology.**, v. 98, n. 1, p. 2-14, feb. 2010.
- FRANCK, T. et al. A new easy method for specific measurement of active myeloperoxidase in human biological fluids and tissue extracts. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 723-729, dec. 2009.
- FUKS, A. B. Current concepts in vital primary pulp therapy. **Eur. J. Paediatr. Dent.**, v. 3, n. 3, p. 115-120, sep. 2002.
- FUKS, A. B. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and Treatment perspectives. **Pediatr. Dent.**, v. 30, n. 3, p. 211-219, jun. 2008.
- GODHI, B., SOOD, P. B., SHARMA, A. Effects of mineral trioxide aggregate and formocresol on vital pulp after pulpotomy of primary molars: An in vivo study. **Comtemp. Clin. Dent.**, v. 2, n. 4, p. 296-301, oct. 2011.
- GOMES, A. C.; FILHO, J. E.; DE OLIVEIRA, S. H. MTA-induced neutrophil recruitment: a mechanism dependent on IL-1beta, MIP-2, and LTB4. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 106, n. 3, p. 450-456, sep. 2008.
- GRECH, L.; MALLIA, B.; CAMILLERI, J. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. **Int. Endod. J.**, v. 46, n. 7, p. 632-641, jul. 2013.
- GRECH, L.; MALLIA, B.; CAMILLERI, J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. **Dent. Mater.**, v. 29, n. 3, p. 20-28, feb. 2013.
- HAN, L.; OKIJI, T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. **Int. Endod. J.**, v. 44, n. 12, p. 1081-1087, dec. 2011.
- HANNAS, A. R. et al. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta. Odontol.**, v. 65, n. 1, p. 1-13, feb. 2007.
- HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood.**, v. 92, n. 9, p. 3007-3017, nov. 1998.

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

HEINECKE, J. W. Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 133, n. 4, p. 321-325, apr. 1999.

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

HOLLAND, R. et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portlandcement. **Braz. Dent. J.**, v. 12, n. 2, p. 109-113, 2001.

HUNTER, M. L. Premature exfoliation of primary molars related to the use of formocresol in a multivisit pulpotomy technique: a case report. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 13, n. 5, p. 362-364, sep. 2003.

HUTH, K. C. et al. Effectiveness of 4 pulpotomy techniques--randomized controlled trial. **J. Dent. Res.**, v. 84, n. 12, p. 1144-1148, dec. 2005.

HUTH, K. C. et al. Long-term effectiveness of four pulpotomy techniques: 3-year randomised controlled trial. **Clin. Oral Investig.**, v. 16, n. 4, p. 1243-1250, aug. 2012.

HYMAN, J. J.; COHEN, M. E. The predictive value of endodontic diagnostic tests. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 58, n. 3, p. 343-346, sep. 1984.

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

KAMAL, A. M. et al. Defense responses of dentin/pulp complex to experimentally induced caries in rat molars: an immunohistochemical study on kinetics of pulpal Ia antigen-expressing cells and macrophages. **J. Endod.**, v. 23, n. 2, p. 115-120, feb. 1997.

KANER, D. et al. Gingival crevicular fluid levels of calprotectin and myeloperoxidase during therapy for generalized aggressive periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 41, n. 2, p. 132-139, apr. 2006.

KANTARI, C.; PEDERZOLI-RIBEIL, M.; WITKO-SARSAT, V. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. **Contrib. Microbiol.**, v. 15, p. 118-146, 2008.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. **J. Bacteriol.**, v. 95, n. 6, p. 2131-2138, jun. 1968.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. **Science.**, v. 169, n. 3950, p. 1095-1097, sep. 1970.

KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J. Leukoc. Biol.**, v. 77, n.5, p. 598-625, may 2005.

KOUBI, G. et al. Clinical evaluation of the performance and safety of a new dentine substitute, Biodentine, in the restoration of posterior teeth - a prospective study. **Clin. Oral Investig.**, v. 17, n. 1, p. 243-249, jan. 2013.

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

KRIZKOVA, S. et al. Assays for determination of matrix metalloproteinases and their activity. **Trends Analyt. Chem.**, v. 30, n. 11, p. 1819-1832, dec. 2011.

KUPAI, K. et al. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods.**, v. 61, n. 2, p. 205-209, mar.-apr., 2010.

LAKOWICZ, J. R. et al. Plasmon-controlled fluorescence: A new detection technology. **Proc. Soc. Photo Opt. Instrum. Eng.**, 2006.

LAURENT, P. et al. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. **Dent. Mater.**, v. 24, n. 11, p. 1486-1494, nov. 2008.

LAURENT, P.; CAMPS, J.; ABOUT, I. Biodentine(TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. **Int. Endod. J.**, v. 45, n. 5, p. 439-448, may 2012.

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

LEIENDECKER, A. P. et al. Effects of calcium silicate-based materials on collagen matrix integrity of mineralized dentin. **J. Endod.**, v. 38, n. 6, p. 829-833, jun. 2012.

LEYE BENOIST, F. et al. Evaluation of mineral trioxide aggregate (MTA) versus calcium hydroxide cement (Dycal®) in the formation of a dentine bridge: a randomised controlled trial. **Int. Dent. J.**, v. 62, n. 1, p. 33-39, feb. 2012.

LI, Z. et al. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide or Mineral Trioxide Aggregate: A Meta-analysis. **J. Endod.**, may 2015.

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

LIU, H.; ZHOU, Q.; QIN, M. Mineral trioxide aggregate versus calcium hydroxide for pulpotomy in primary molars. **Chin. J. Dent. Res.**, v. 14, n. 2, p. 121-125, 2011.

- LOURENÇO NETO, N. et al. Terapia pulpar em dentes decíduos: possibilidades terapêuticas baseadas em evidências. **Rev. Odontologia da UNESP**, v. 41, n. 2, p. 1-8, 2013.
- MAGLOIRE, H. et al. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. **Adv. Dent. Res.**, v. 15, p. 46-50, aug. 2001.
- MALEKAFZALI, B., SHEKARCHI, F., ASGARY, S. Treatment outcomes of pulpotomy in primary molars using two endodontic biomaterials. A 2-year randomised clinical trial. **Eur. J. Paediatr. Dent.**, v. 12, n. 3, p. 189-193, sep. 2011.
- MARCACCINI, A. M. et al. Myeloperoxidase activity is increased in gingival crevicular fluid and whole saliva after fixed orthodontic appliance activation. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, v. 138, n. 5, p. 613-616, nov. 2010.
- MARKOVIC, D.; ZIVOJINOVIC, V.; VUCETIC, M. Evaluation of three pulpotomy medicaments in primary teeth. **Eur. J. Paediatr. Dent.**, v. 6, n. 3, p. 133-138, sep. 2005.
- MARQUES, N. C. T. **Efeitos do laser de baixa intensidade em pulpotomias de dentes decíduos humanos**. 2013. 143 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, USP. Bauru, 2013.
- MAROTO, M. et al. Dentin bridge formation after mineral trioxide aggregate (MTA) pulpotomies in primary teeth. **Am. J. Dent.**, v. 18, n. 3, p. 151-154, jun. 2005.
- MASS, E.; ZILBERMAN, U. Long-term radiologic pulp evaluation after partial pulpotomy in young permanent molars. **Quintessence Int.**, v. 42, n. 7, p. 547-554, jul./aug. 2011.
- MATSUI, H. et al. Expression of MMP-8 and MMP-13 in the development of periradicular lesions. **Int. Endod. J.**, v. 44, n. 8, p. 738-745, aug. 2011.
- MENDONÇA, T. A. **Avaliação de metaloproteinases de matriz -2, -9 e timp-2 em polpas dentais humanas sadias e inflamadas**. 2009. 66 f. Dissertação (Doutorado em Clínica Odontológica. Área de concentração: Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP. Piracicaba, 2009.
- MENEGAZZI, R. et al. A new, one-step assay on whole cell suspensions for peroxidase secretion by human neutrophils and eosinophils. **J. Leukoc. Biol.**, v. 52, n. 6, p. 619-624, dec. 1992.
- MENEZES, R. et al. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and white Portland cements as wound dressings. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 98, n. 3, p. 376-379, sep. 2004.

METZLER, K. D. et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. **Blood.**, v. 117, n. 3, p. 953-959, jan. 2011.

MINAMIKAWA, H. et al. Effect of mineral trioxide aggregate on rat clonal dental pulp cells: expression of cyclooxygenase-2 mRNA and inflammation-related protein via nuclear factor kappa B signaling system. **J. Endod.**, v. 35, n. 6, p. 843-846, jun. 2009.

MOCATTA, T.J. et al. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 49, n. 20, p. 1993-2000, may 2007.

MODENA, K. C. et al. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 17, n. 6, p. 544-554, nov. 2009.

MOHAMMADI, Z.; DUMMER, P.M. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. **Int. Endod. J.**, v.44, n.8, p. 697-730, aug. 2011.

MORETTI, A. B. S. et al. Mineral trioxide aggregate pulpotomy of a primary second molar in a patient with agenesis of the permanent successor. **Int. Endod. J.**, v. 40, n. 9, p. 738-745, sep. 2007.

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

MULLANE, K. M; KRAEMER, R.; SMITH, B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. **J. Pharmacol. Methods.**, v. 14, n. 3, p. 157-167, nov. 1985.

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

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc. Res.**, v. 69, n. 3, p. 562-573, feb. 2006.

NAIR, P. N. et al. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with Mineral Trioxide Aggregate: a randomized controlled trial. **Int. Endod. J.**, v. 42, n. 5, p. 422-444, may 2009.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 3, p. 173-182, nov. 2006.

NELSON FILHO, P. et al. Connective tissue responses to calcium hydroxide-based root canal medicaments. **Int. Endod. J.**, v. 32, n. 4, p. 303-311, aug. 1999.

- NETZEL-ARNETT, S. et al. Continuously recording fluorescent assays optimized for five human matrix metalloproteinases. **Anal. Biochem.**, v. 195, n. 1, p. 86-92, may 1991.
- NOSRAT, A.; SEIFI, A.; ASGARY S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. **J. Endod.**, v.37, n.4, p. 562-567, apr. 2011.
- NOSRAT, A.; PEIMANI, A.; ASGARY, S. A preliminary report on histological outcome of pulpotomy with endodontic biomaterials vs calcium hydroxide. **Restor. Dent. Endod.**, v.38, n.4, p. 227-233, nov. 2013.
- NOWICKA, A. et al. Response of human dental pulp capped with biodentine and mineral trioxide aggregate. **J. Endod.**, v. 39, n. 6, p. 743-747, jun. 2013.
- ODABAŞ, M. E. et al. A new haemostatic agent's effect on the success of calcium hydroxide pulpotomy in primary molars. **Pediatr. Dent.**, v. 33, n. 7, p. 529-534, nov./dec. 2011.
- OLIVEIRA, T. M. et al. Clinical, radiographic and histologic analysis of the effects of pulp capping materials used in pulpotomies of human primary teeth. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.**, v. 14, n. 2, p. 65-71, apr. 2013.
- OPAČIĆ-GALIĆ, V. et al. New nanostructural biomaterials based on active silicate systems and hydroxyapatite: characterization and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. **Int. Endod. J.**, v. 46, n. 6, p. 506-516, jun. 2013.
- OVIIR, T. et al. Effects of gray and white mineral trioxide aggregate on the proliferation of oral keratinocytes and cementoblasts. **J. Endod.**, v. 32, n. 3, p. 210-213, mar. 2006.
- PALOSAARI, H. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. **J. Dent. Res.**, v. 79, n. 1, p. 77-84, jan. 2000.
- PALOSAARI, H. et al. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 111, n. 2, p. 117-127, apr. 2003.
- PARANJPE, A. et al. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. **J. Endod.**, v. 37, n. 12, p. 1691-1695 dec. 2011.
- PARANJPE, A.; ZHANG, H.; JOHNSON, J. D. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. **J. Endod.**, v. 36, n. 6, p. 1042-1047, jun. 2010.
- PARIROKH, M.; TORABINEJAD M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. **J. Endod.**, v.36, n.1, p. 16-27, jan. 2010.

PÉRARD, M. et al. Spheroid model study comparing the biocompatibility of Biodentine and MTA. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 24, n. 6, p. 1527-1534, jun. 2013.

PERCINOTO, C.; DE CASTRO, A. M.; PINTO, L. M. Clinical and radiographic evaluation of pulpotomies employing calcium hydroxide and trioxide mineral aggregate. **Gen. Dent.**, v. 54, n. 4, p. 258-261, jul./aug. 2006.

PÉREZ, A. L. et al. Osteoblasts and MG-63 osteosarcoma cells behave differently when in contact with ProRoot MTA and White MTA. **Int. Endod. J.**, v. 36, n. 8, p. 564-570, aug. 2003.

PODREZ, E. A.; ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 28, n. 12, p. 1717-1725, jun. 2000.

PULLI, B. et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. **PLoS One.** v. 8, n. 7, p. e67976, jul. 2013.

RAJASEKHARAN, S. et al. Biodentine™ material characteristics and clinical applications: a review of the literature. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.**, v. 15, n. 3, p. 147-158, jun. 2014.

REZENDE, T. M. et al. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. **Int. Endod. J.**, v. 40, n. 8, p. 603-611, aug. 2007.

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

REYES-CARMONA, J. F. et al. In vivo host interactions with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide: inflammatory molecular signaling assessment. **J. Endod.**, v. 37, n. 9, p. 1225-1235, sep. 2011.

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

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

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.

SCARPARO, R. K. et al. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. **J. Endod.**, v. 37, n. 8, p. 1069-1073, aug. 2011.

SCHEMBRI, M.; PELOW, G.; CAMILLERI, J. Analyses of heavy metals in mineral trioxide aggregate and Portland cement. **J. Endod.**, v. 36, n. 7, p. 1210-1215, jul. 2010.

SEALE, N. S.; COLL, J. A. Vital pulp therapy for the primary dentition. **Gen. Dent.**, v. 58, n. 3, p. 194-200, may 2010.

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

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

SIMON, S. R. et al. Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic. **Adv. Dent. Res.**, v. 23, n. 3, p. 340-345, jul. 2011.

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

SORSA, T.; TJÄDERHANE, L.; SALO, T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. **Oral Dis.**, v. 10, n. 6, p. 311-318, nov. 2004.

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

STERCHI, E. E. Special issue: Metzincin metalloproteinases. **Mol. Aspects Med.**, v. 29, n. 255-257, 2008.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 17, p. 463-516, 2001.

STÖCKER, W. et al. The metzincins--topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein. Sci.**, v. 4, n. 5, p. 382-389, may 1995.

STRINGHINI JUNIOR, E.; VITCEL, M. E.; OLIVEIRA, L. B. Evidence of pulpotomy in primary teeth comparing MTA, calcium hydroxide, ferric sulphate, and electrosurgery with formocresol. **Eur. Arch. Paediatr. Dent.**, apr. 2015.

SURI, et al. Expression of MMP-13 (collagenase-3) in long-term cultures of human dental pulp cells. **Arch. Oral Biol.**, v. 53, n. 8, p. 791-799, mar. 2008.

TABARSI, B. et al. A comparative study of dental pulp response to several pulpotomy agents. **Int. Endod. J.**, v. 43, n. 7, p. 565-571, jul. 2010.

- TATE, A. R. Formecresol performs better than calcium hydroxide as a pulpotomy technique over 2-year period. **J. Evid. Based Dent. Pract.**, v. 11, n. 1, p. 65-66, mar. 2011.
- TATZBER, F. et al. Dual method for the determination of peroxidase activity and total peroxides-iodide leads to a significant increase of peroxidase activity in human sera. **Anal. Biochem.**, v. 316, n. 2, p. 147-153, may 2003.
- TJÄDERHANE, L. et al. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). **Adv. Dent. Res.**, v. 15, n.55-58, aug. 2001.
- TORABINEJAD, M. et al. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **J. Endod.**, v. 21, n. 7, p. 349-353, jul. 1995.
- TORABINEJAD, M.; PARIROKH, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. **J.Endod.**, v.36, n.2, p. 190-202, feb. 2010.
- TRAIRATVORAKUL, C.; KOOTHIRATRAKARN, A. Calcium hydroxide partial pulpotomy is an alternative to formocresol pulpotomy based on a 3-year randomized trial. **Int. J. Paediatr. Dent.**, v. 22, n. 5, p. 382-389, sep. 2012.
- TRAN, X. V. et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. **J. Dent. Res.**, v.91, n.12, p. 1166-1171, dec. 2012.
- TZIAFAS, D.; SMITH, A. J.; LESOT, H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. **J. Dent.**, v. 28, n. 2, p. 77-92, feb. 2000.
- VAN DER VEEN, B. S.; DE WINTHER, M. P.; HEERINGA, P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 1, n. 11, p. 2899-2937, nov. 2009.
- VAN DIJKEN, J. W.; SUNNEGÅRDH-GRÖNBERG, K. A calcium aluminate cement as restorative material in Class V cavities. **Swed. Dent. J.**, v. 28, n. 3, p. 111-118, 2004.
- VILLAT, C. et al. Impedance methodology: A new way to characterize the setting reaction of dental cements. **Dent. Mater.**, v.26, n.12, p. 1127- 1132, dec. 2010.
- VILLAT, C. et al. Conservative approach of a symptomatic carious immature permanent tooth using a tricalcium silicate cement(Biodentine): a case report. **Restor. Dent. Endod.**, v. 38, n. 4, p. 258-262, nov. 2013.
- VINCENTI, M. P.; BRINCKERHOFF, C. E. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you? **J. Cell Physiol.**, v. 213, n. 2, p. 355-364, nov. 2007.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ. Res.**, v. 92, n. 8, p. 827-839, may 2003.

VOSOUGHOSSEINI, S. et al. Influence of white versus gray mineral trioxide aggregate on inflammatory cells. **J. Endod.**, v. 34, n. 6, p. 715-717, jun. 2008.

VU, T. H.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev.**, v. 14, n. 17, p. 2123-2133, sep. 2000.

WAHLGREN, J. et al. Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. **J. Pathol.**, v. 194, n. 2, p. 217-224, jun. 2001.

WAHLGREN, J. et al. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. **Int. Endod. J.**, v. 35, n. 11, p. 897-904, nov. 2002.

WALKER, L. A. et al. Current trends in pulp therapy: a survey analyzing pulpotomy techniques taught in pediatric dental residency programs. **J. Dent. Child. (Chic.)**, v. 80, n. 1, p. 31-35, jan./apr. 2013.

WANG, Y. et al. Effect of tricalcium silicate (Ca₃SiO₅) bioactive material on reducing enamel demineralization: an in vitro pH-cycling study. **J. Dent.**, v. 40, n. 12, p. 1119-1126, dec. 2012.

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

WINTERBOURN, C. C., KETTLE, A. J. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, n. 5, p. 403-409, sep. 2000.

WINTERBOURN, C. C.; VISSERS, M. C.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 7, n.1, p. 53-58, jan. 2000.

WITHERSPOON, D. E. Vital pulp therapy with new materials: new directions and treatment perspectives--permanent teeth. **Pediatr. Dent.**, v. 30, n. 3, p. 220-224, may 2008.

YAMASAKI, M. et al. Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. **J. Endod.**, v. 20, n. 1, p. 13-17, jan. 1994.

YANG, W. K.; KO, H. J.; KIM M. R. Evaluation of the rat tissue reaction to experimental new resin cement and mineral trioxide aggregate cement. **Restor. Dent. Endod.**, v.37, n.4, p. 194-200, nov. 2012.

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

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

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

ZARRABI, M. H. et al. Histologic assessment of human pulp response to capping with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. **J. Endod.**, v. 36, n. 11, p. 1778-1781, nov. 2010.

ZEHNDER, M.; WEGEHAUPT, F. J.; ATTIN, T. A first study on the usefulness of matrix metalloproteinase 9 from dentinal fluid to indicate pulp inflammation. **J. Endod.**, v. 37, n. 1, p. 17-20, jan. 2011.

ZURN, D.; SEALE, N. S. Light-cured calcium hydroxide vs formocresol in human primary molar pulpotomies: a randomized controlled trial. **Pediatr. Dent.**, v. 30, n. 1, p. 34-41, jan./feb. 2008.

ANEXO

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em animais



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



Alfenas, 09 de junho de 2014.

Profª. Ana Beatriz da Silveira Moretti

Prezada Professora;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 569/2014, intitulado “Atividade da mieloperoxidase e metaloproteinase de matrix-8 em resposta a diferentes materiais capeadores para pulpotomias em ratos Wistar” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

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