

CAIO CÉSAR BORGES DE OLIVEIRA

**COMPARAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA BIOMINERALIZAÇÃO
DENTINÁRIA DE COMPÓSITOS CIMENTANTES *IN VIVO***

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2019**

Caio César Borges de Oliveira

COMPARAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA BIOMINERALIZAÇÃO DENTINÁRIA DE COMPÓSITOS CIMENTANTES *IN VIVO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de Concentração em Clínica Odontológica. Linha de pesquisa: Propriedades físicas, químicas e biológicas dos materiais odontológicos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Esperanza Cortés Segura

Belo Horizonte
2019

Ficha Catalográfica

048c Oliveira, Caio César Borges de.
2019 Comparação histomorfométrica da biomineralização
T dentinária de compósitos cimentantes in vivo / Caio César
Borges de Oliveira. -- 2019.

65 f. : il.

Orientadora: Maria Esperanza Cortés Segura.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Teste de materiais. 2. Durapatita. 3. Óxido de zinco.
4. Quitosana. 5. Doxiciclina. I. Segura, Maria Esperanza Cortés. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D047

Elaborada por: Sérgio Barbosa dos Santos - CRB: 6/3182.

Biblioteca Faculdade de Odontologia - FAO UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Análise histomorfométrica da biomineralização dentinária de um composto cimentante in vivo

CAIO CÉSAR BORGES DE OLIVEIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre, área de concentração Clínica Odontológica.

Aprovada em 31 de julho de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Maria Esperanza Cortes Segura - Orientadora
FO-UFMG

Prof(a). Karina Imaculada Rosa Teixeira
Faculdade Arnaldo

Prof(a). Rogéli Tibúrcio Ribeiro da Cunha Peixoto
FO-UFMG

Belo Horizonte, 31 de julho de 2019.

Dedico este trabalho à minha mãe Rosângela, a qual dignamente me apresentou à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência.

AGRADECIMENTO

Agradeço a minha orientadora Profa. Maria Esperanza Cortés Segura pela oportunidade de realizar este trabalho junto de alguém que transpira sabedoria. Meu respeito e admiração pela sua serenidade, capacidade de análise e pelo seu dom no ensino da ciência. Desejo poder contribuir à ciência e ao universo acadêmico com a mesma ética e entusiasmo que me transmitiu.

Registro também o meu agradecimento ao Prof. Alfonso Gala-Garcia pelos importantes direcionamentos passados em diversos momentos durante a realização deste estudo, este trabalho não seria possível sem a sua inestimável contribuição.

Em especial agradeço às doutorandas Alexa Magalhães, Giseli Carvalho e Isabela Canhas pelas preciosas contribuições durante estes dois anos. Agradeço à doutoranda Larissa Souza e ao Professor Carlos Alberto Tagliati pela sua contribuição no laboratório de pesquisas em animais, à Biomédica Mara Quintela Maia pelo auxílio excepcional na confecção das lâminas histológicas

Aos amigos Sylvia Cury, Iverson Limeira, Sâmila Barra, Diandra Arantes e Bruno Lopes obrigado pela amizade construída ao decorrer destes dois incríveis anos em sua companhia.

Finalmente agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os biomateriais desempenham um papel essencial na restauração da estrutura dentária que necessita de intervenção, no entanto, os materiais disponíveis ainda apresentam limitações no que tange à biomineralização. Compósitos que unem materiais orgânicos e inorgânicos tem como objetivo aumentar as propriedades mecânicas da matriz polimérica, unindo propriedades a fim de reduzir as desvantagens associadas a cada um dos componentes individuais, bem como melhorar a resposta biológica ao material. O presente estudo avaliou a biomineralização dentinária induzida por compósitos experimentais composto de Nano-Hidroxiapatita (HAp), Quitosana e Óxido de Zinco (ZnO), com e sem a adição de Doxiciclina, comparados ao efeito do Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)_2) e Ionômero de Vidro. A HAp e ZnO foram sintetizados e caracterizados físico-quimicamente. Para a análise *in vivo*, foram utilizados 66 primeiros molares superiores de ratos da linhagem Wistar, machos, com 6 semanas de idade, os quais foram alocados aleatoriamente em 8 diferentes grupos, divididos em 2 tempos diferentes de acordo com a eutanásia (14 e 30 dias) para teste de estímulo pulpar. Após a eutanásia, os animais tiveram a maxila processada histologicamente. As lâminas foram analisadas através de microscopia óptica para avaliar a formação de dentina e presença de inflamação. A análise histomorfométrica foi realizada com auxílio dos Softwares Image J e Adobe Photoshop CC 2018 nas lâminas dos grupos com 30 dias, para medição do diâmetro e profundidade da exposição, áreas do material, de mineralização, da dentina reacional e da área não mineralizada, foram também calculados com estes dados o percentual de mineralização e de formação de dentina reacional. Os dados foram avaliados estatisticamente através dos testes Kruskal-Wallis e Steel-Dwass. Os resultados demonstraram uma redução da inflamação estatisticamente significativa para o grupo que recebeu tratamento com o Compósito com Doxiciclina e também deposição de matriz mineralizada em diferentes graus, fechamento progressivo da câmara pulpar por deposição de dentina terciária organizada em todos os grupos analisados. Os percentuais de mineralização dos compósitos com e sem a adição de Doxiciclina foi de 64,85% e 57,34%, respectivamente, em comparação a 43,36% do Ca(OH)_2 . Foi possível concluir que os compósitos cimentantes conseguiram induzir áreas de mineralização significativamente maiores do que o Ca(OH)_2 sendo não somente imediato à exposição, mas também distante da mesma, com formação de tecido dentinóide sugerindo que a sua utilização pode ser benéfica em algumas patologias e/ou traumas dentários.

Palavras-chave: teste de materiais; materiais biocompatíveis; durapatita; óxido de zinco; quitosana; doxiciclina.

ABSTRACT

Histomorphometric comparison of dentinary biomineralization of composites cements in vivo

Biomaterials play an essential role in restoring the dental structure that requires intervention, however, the materials available still have limitations in regard to biomineralization. Composites that combine organic and inorganic materials aim to increase the mechanical properties of the polymeric matrix, uniting properties in order to reduce the disadvantages associated with each of the individual components, as well as to improve the material's biological response. The present study evaluated the dentin biomineralization induced by experimental composites of Nano-Hydroxyapatite (HAp), Chitosan and Zinc Oxide (ZnO), with and without the addition of Doxycycline, compared to the effect of Calcium Hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) and Glass Ionomer. HAp and ZnO were synthesized and characterized physicochemically. For the in vivo analysis, 66 first molars of 6-weeks-old male Wistar rats were used, which were randomly allocated to 8 different groups, divided into 2 different times according to euthanasia (14 and 30 days) for pulpal stimulation test. After euthanasia, the animals had their maxilla processed histologically. The slides were analyzed using optical microscopy to assess the formation of dentin and the presence of inflammation. Histomorphometric analysis was performed with the aid of Softwares Image J and Adobe Photoshop CC 2018 on the slides of the groups with 30 days, to measure the diameter and depth of exposure, the area of the material, mineralization, tertiary dentin and non-mineralized area, it was also calculated with this data the percentage of mineralization and formation of tertiary dentin. The data were statistically evaluated using the Kruskal-Wallis and Steel-Dwass tests. The results demonstrated a statistically significant reduction in inflammation for the group that received Doxycycline Composite treatment and also the deposit of mineralized matrix in different degrees, progressive closure of the pulp chamber by deposit of organized tertiary dentin in all groups analyzed. The percentage of mineralization in the groups treated with composites with and without the addition of Doxycycline was 64.85% and 57.34%, respectively, compared to 43.36% of $\text{Ca}(\text{OH})_2$. It was possible to conclude that the composites were able to induce mineralization areas significantly larger than $\text{Ca}(\text{OH})_2$, being not only immediate, but also distant from exposure, with formation of dentinoid tissue suggesting that its use may be beneficial in some pathologies and / or dental trauma.

Keywords: chitosan; materials testing; biocompatible materials; durapatite; zinc oxide; doxycycline.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Aleatorização dos ratos	30
Figura 2 – Operador realizando o capeamento pulpar direto	31
Figura 3 – Mesa operatória	32
Figura 4 – Anestesia e Isolamento do rato	33
Figura 5 – Procedimento Operatório	34
Figura 6 – Processamento Histológico	35
Figura 7 – Seleção das regiões de interesse utilizando o software Adobe Photoshop CC 2018 para MacOS	38
Figura 8 – Tomada de medidas histomorfométricas com auxílio do software Image J para MacOS	39
Gráfico 1 – Difratograma dos Raios-X de ZnO e HAp sintetizados	41
Figura 9 – Micrografia de Varredura da HAp sintetizada	42
Figura 10 – Micrografia de Varredura do ZnO nanoparticulado sintetizado	42
Figura 11 – Micrografia de Transmiss.ão de HAp e ZnO nanoparticulados	43
Sintetizados	
Figura 12 – Micrografia de Varredura do Compósito 1	43
Gráfico 2 – EDS da HAp sintetizada	44
Figura 13 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Ca(OH) ₂ após 14 dias	44
Figura 14 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Ca(OH) ₂ após 30 dias	45
Figura 15 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Compósito 1 após 14 dias	46
Figura 16 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Compósito 1 após 30 dias	47
Figura 17 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Compósito 2 após 14 dias	48
Figura 18 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Compósito 2 após 30 dias	48

Figura 19 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Ionômero de Vidro após 14 dias	49
Figura 20 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Ionômero de Vidro após 30 dias	50
Figura 21 – Cortes Histológicos com as regiões de interesse selecionadas	52
Gráfico 3 – Distribuição do percentual médio da mineralização do tecido pulpar e formação de dentina organizada nas paredes da câmara pulpar nos diferentes grupos testados	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Materiais utilizados na composição dos compósitos cimentantes analisados	26
Tabela 2 – Distribuição dos grupos	29
Tabela 3 – Critérios de avaliação histológica	36
Tabela 4 – Critérios da avaliação histomorfométrica	39
Tabela 5 – Graus de inflamação pulpar em dente de rato expresso em porcentagem de acordo aos tratamentos com os compósitos cimentantes após 14 e 30 dias	51
Tabela 6 – Resultados da análise histomorfométrica	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Nitrato De Cálcio Tetra-Hidratado
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	Hidróxido de Cálcio
HAp	Hidroxiapatita
Nano-HAp	Nano-Hidroxiapatita
NaOH	Hidróxido de Sódio
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	Fosfato de Amônio Monobásico
NH_4Cl	Cloreto de Amônia
NH_4OH	Hidróxido de Amônia
QS	Quitosana
Ta	Tântalo
Ti	Titânio
Zn	Zinco
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$	Nitrato de Zinco
ZnO	Óxido de Zinco
Zr	Zircônio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Biomateriais	16
2.1.1	Avaliação da biocompatibilidade de biomateriais in vivo	17
2.1.2	Resposta inflamatória após contato direto de tecidos com biomateriais ..	17
2.2	Biomíneralização dentinária	18
2.3	Hidroxiapatita	19
2.4	Quitossana	21
2.5	Óxido de Zinco	22
2.6	Doxiciclina	23
3	JUSTIFICATIVA	24
4	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivos Gerais	25
4.2	Objetivos Específicos	25
5	METODOLOGIA	26
5.1	Materiais Utilizados	26
5.2	Síntese da Nano-Hidroxiapatita	26
5.3	Síntese do Óxido de Zinco Nano Particulado	27
5.4	Composição dos compósitos cimentantes	27
5.5	Composição do controle	27
5.6	Preparação dos compósitos	28
5.7	Análise das propriedades físico-químicas	28
5.8	Avaliação da resposta pulpar in vivo	28
5.8.1	Seleção dos animais	28
5.8.2	Aspectos Éticos	29
5.8.3	Grupos Experimentais	29
5.8.4	Cálculo Amostral	30

5.8.5	Aleatorização dos grupos	31
5.8.6	Sequência Operatória	31
5.8.7	Processamento Histológico	35
5.8.8	Análise histomorfométrica	36
5.9	Análise Estatística	40
6	RESULTADOS	41
6.1	Caracterização Físico-Química	41
6.2	Análise descritiva	44
6.2.1	Ca(OH) ₂	44
6.2.2	Compósito 1	46
6.2.3	Compósito 2	46
6.2.4	Ionômero de Vidro	49
6.3	Análise da Resposta inflamatória	50
6.3.1	Ca(OH) ₂	51
6.3.2	Compósito 1	51
6.3.3	Compósito 2	51
6.3.4	Ionômero de Vidro	52
6.4	Análise Histomorfométrica	52
6.4.1	Ca(OH) ₂	54
6.4.2	Compósito 1	55
6.4.3	Compósito 2	55
6.4.4	Ionômero de Vidro	55
7	DISCUSSÃO	56
8	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXOS	67

1. INTRODUÇÃO

Os biomateriais desempenham um papel essencial na restauração da estrutura dentária afetada, no entanto os materiais disponíveis no momento têm as suas limitações, havendo a necessidade de se desenvolver biomateriais que sejam cada vez mais biocompatíveis e bioativos a fim de promover a regeneração dos tecidos dentários (DEB; CHANA, 2015).

A biocompatibilidade, de acordo com Williams (2008) é a capacidade de um biomaterial desempenhar a função desejada em relação a uma terapia médica, sem induzir quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis no organismo receptor, mas gerando a resposta celular ou tecidual mais apropriada na determinada situação e otimizando o desempenho clínico da terapia. Já a bioatividade de um biomaterial pode ser definida como a habilidade do mesmo induzir a formação de tecido ao redor de sua área de implantação (WANG *et al.*, 2015).

Entre os biomateriais utilizados na odontologia, o Hidróxido de Cálcio (Ca(OH)_2) tem sido largamente empregado desde que foi introduzido na década de 1930. Quando utilizado como agente capeador direto, o Ca(OH)_2 induz a formação de ponte dentinária, no entanto, também está associado à necrose e inflamação do tecido pulpar durante os primeiros dias de colocação do material e ao padrão irregular de formação da ponte de dentina (DA ROSA *et al.*, 2017; SWARUP *et al.*, 2014).

Levando em consideração as limitações do Ca(OH)_2 , as pesquisas desenvolveram-se no sentido de uma nova formulação de cimentos odontológicos, seguindo-se uma linha na qual se destaca a Hidroxiapatita (HAp) sintética, já que possui uma biocompatibilidade excelente com dentes e ossos humanos devido à sua semelhança química e cristalográfica com a apatita encontrada nesses tecidos. HAp é bioativa, uma vez que pode formar uma ligação química direta ao tecido ósseo circundante, promovendo crescimento ósseo e osteointegração e é considerado como um candidato ideal para o reparo do tecido duro, sendo amplamente aplicado na ortopedia e odontologia (LI *et al.*, 2010; MUCALO, 2015; OSHIDA, 2015; SWARUP *et al.*, 2014).

Uma das maiores desvantagens da HAp sintetizada é que a mesma

apresenta dificuldade em sua inserção sobre a lesão, além de sua baixa resistência a compressão. Visando superar as limitações e melhorar as propriedades biológicas da HAp através da exploração das vantagens únicas da nanotecnologia, foi desenvolvida a Nano-Hidroxiapatita (Nano-HAp) a qual possui atributos como ser porosa o suficiente para permitir o crescimento das células e os fatores de crescimento, permitir o transporte efetivo de nutrientes, oxigênio e resíduos, ser biodegradável, não deixando subprodutos tóxicos, além de ser substituída por tecido regenerativo, mantendo a forma da estrutura final, ser biocompatível, possuir força física e mecânica adequada e eficácia antibacteriana, permitindo este material ser utilizado na regeneração tecidual (LI *et al.*, 2010; SWARUP *et al.*, 2014).

Compósitos que unem materiais orgânicos e inorgânicos têm como objetivo aumentar as propriedades mecânicas da matriz polimérica, unindo propriedades a fim de reduzir as desvantagens associadas a cada um dos componentes individuais, bem como melhorar a resposta biológica ao material. Os biopolímeros têm recebido atenção recentemente quanto a algumas de suas propriedades, como a ausência de toxicidade, degradabilidade e boa compatibilidade biológica. Dentre os biopolímeros se destaca a Quitosana (QS), a qual é o biopolímero mais abundante no planeta, biodegradável, de baixo custo e renovável. Foi constatado que a quitosana pode degradar-se em produtos não tóxicos tendo sido, portanto, empregada em muitas aplicações biomédicas, incluindo curativos para feridas e administração de fármacos. Quando aplicada a defeitos ósseos em animais, a quitosana melhorou a osteogênese e a atividade angiogênica (LI *et al.*, 2010; RAVI KUMAR, 2000).

A adição de Óxido de Zinco (ZnO) em compósitos de Nano-HAp/QS facilita a osteogênese e a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas. A liberação de íons de Zinco (Zn) no meio auxilia na formação de cristais de apatita semelhantes a apatita encontrada nos ossos nas superfícies de tais compósitos (LI *et al.*, 2010).

Outro importante composto indutor de tecido mineral ósseo que vem se destacando em pesquisas recentes é a Doxiciclina, a qual é capaz de agir inibindo as proteases teciduais, evitando o colapso tecidual durante processos inflamatórios, além de influenciar a diferenciação de células osteoprogenitoras e aumentar a regulação da Fosfatase Alcalina (MUTHUKURU & SUN, 2013).

A formulação dos compósitos analisados neste estudo é inovadora e não há na literatura outros estudos que coloquem todos estes componentes associados e testados em íntimo contato com o tecido pulpar. No entanto, algumas formulações similares foram analisadas em contato com tecido ósseo, o que comprovou serem indutoras de tecido mineral. Sob esta perspectiva, o presente estudo pretende avaliar a biocompatibilidade e a bioatividade de compósitos experimentais compostos de Nano-Hidroxiapatita, Quitosana e Óxido de Zinco, com e sem adição de Doxiciclina através de um teste de estímulo pulpar, sob as hipóteses a serem testadas de que o compósito é biocompatível com o tecido pulpar e também é bioativo a ser constatado pela indução da formação de dentina reparadora, além de provocar nenhuma ou pouca inflamação no tecido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biomateriais

O campo dos biomateriais tem crescido de forma acelerada desde que os primeiros dispositivos médicos baseados em princípios médicos e científicos aceitos foram utilizados em humanos no final da década de 1940 e no início da década de 1950. E o crescimento deste campo é assegurado, com o envelhecimento da população, o aumento do padrão de vida nos países em desenvolvimento e a crescente capacidade de abordar condições médicas previamente intratáveis (RATNER *et al.*, 2013).

Um biomaterial pode ser definido como um material destinado a interagir com os sistemas biológicos. Vários materiais podem ser utilizados como biomateriais, como polímeros, metais, cerâmicas e compósitos e podem ter uma vasta gama de aplicações como: desenvolvimento de dispositivos médicos, construção de suportes celulares que guiem a regeneração óssea, desenvolvimento de cimentos que sejam reabsorvíveis e permitam a liberação controlada de fármacos, entre outras (GINEBRA *et al.*, 2012; RATNER *et al.*, 2013; VALLET-REGÍ & ARCOS, 2013).

O biomaterial ideal para o reparo dos tecidos dentários deve demonstrar biocompatibilidade, no entanto, não há um biomaterial que realize isso de forma completa e frequentemente quando o mesmo é colocado em contato direto com o complexo dentinopulpar ou outro tecido dental, mortes celulares e lesões teciduais são inevitáveis (MURRAY *et al.*, 2003). Mjor (1992) estimou que 22,5% e 12% dos pacientes experimentarão sensibilidade alérgica e complicações atribuíveis ao biomaterial odontológico utilizado, respectivamente. Algumas dessas respostas adversas poderiam ter sido evitadas caso os biomateriais utilizados demonstrassem uma melhor biocompatibilidade. Os biomateriais que são os mais compatíveis com os tecidos dentários são geralmente os mais quimicamente estáveis e fisicamente inertes, o que evita a liberação de produtos químicos potencialmente tóxicos. As melhorias nos desenhos de pesquisa, o aumento do conhecimento clínico e científico e o uso de novas tecnologias melhoraram a capacidade de formular

biomateriais odontológicos os quais apresentam uma maior biocompatibilidade (GEURTSEN, 2000; MURRAY *et al.*, 2007).

2.1.1 Avaliação da biocompatibilidade de biomateriais in vivo

O limite do teste de biocompatibilidade in vitro é que as células raramente interagem separadamente in vivo. As observações feitas num estudo in vitro são meramente uma parte simplificada de mecanismos complexos que ocorrem num organismo vivo. Não existem sistemas para eliminar produtos de resíduos biológicos em culturas celulares, uma vez que as condições de cultura estão estagnadas. Consequentemente, a toxicidade do biomaterial pode ocasionalmente ser superestimada. Além disso, deve-se mencionar que os tempos de cultura relativamente curtos, devido à vida útil finita das células cultivadas, limitam os estudos in vitro para avaliar os efeitos da toxicidade aguda e de curto prazo (HALIM *et al.*, 2012).

Não há métodos padronizados para visualização in vivo de biocompatibilidade ou respostas inflamatórias a biomateriais implantados. Convencionalmente, a biocompatibilidade é determinada por meio de análise histológica. A histologia permite a determinação dos tipos de células e do número de células próximas ao implante, incluindo as que pertencem ao sistema imunológico. No entanto, a histologia é uma medida de ponto final, que permite examinar apenas um ponto de tempo por animal (HALIM *et al.*, 2012).

Dentre as técnicas propostas para a avaliação da biocompatibilidade, destaca-se a estimativa por meio de testes de irritação pulpar, uma vez que o tecido pulpar é extremamente sensível e apresenta grande vascularização e uma resposta imune imediata (HALIM *et al.*, 2012; TOMÁS-CATALÁ *et al.*, 2017; WILLIAMS, 2008).

2.1.2 Resposta inflamatória após contato direto de tecidos com biomateriais

Quando um biomaterial é implantado, a resposta de cicatrização é iniciada por monócitos e neutrófilos. Esta resposta é seguida pela propagação de fibroblastos e células endoteliais vasculares. Com 24 h seguidas da implantação é comum encontrar linfócitos e neutrófilos, característicos de uma resposta

inflamatória aguda. Ao 7º dia é esperado que não haja células de inflamação ao redor da implantação do biomaterial, o que denota boa compatibilidade com o material. A sequência de eventos locais após a implantação é conhecida como resposta tecidual contínua, em que a lesão evolui de inflamação aguda para inflamação crônica, seguida de formação de tecido de granulação, reação de corpo estranho e encapsulamento fibroso. A presença de eosinófilos e células polimorfonucleares é indicativa de respostas inflamatórias agudas, enquanto macrófagos e fibroblastos denotam uma resposta crônica (HALIM *et al.*, 2012).

2.2 Biomineralização dentinária

Biomineralização é o processo pelo qual cristais minerais são depositados na matriz de organismos vivos. Tal processo forma estruturas esqueléticas de base inorgânica em vários tecidos no corpo como o osso e a dentina durante o desenvolvimento e em reparações após injúrias (HU; LIU; MA, 2011).

A dentina é de origem conjuntivo avascular, mineralizado, contém prolongamentos de células especializadas, predominantemente tubular, caracterizada pelo seu alto conteúdo mineral e substância intercelular, é um tecido especializado que forma o corpo do dente subjacente ao esmalte, pode conter prolongamentos de odontoblastos e substância intercelular. A matéria inorgânica da dentina é da ordem de 70% e está constituída por sais minerais em sua maioria formada por cristais de Hidroxiapatita (HAp), embora também quantidades menores de fosfatos, carbonatos e sulfatos, além de elementos como F, Cu, Zn, Fe e outros. O restante está formado por matéria orgânica (20%), e água (10%). Esta composição varia com a idade do dente, devido a sua fosforilação progressiva, mesmo já estando totalmente formado (KATCHBURIAN & ARANA, 2012).

Durante o desenvolvimento do dente, a dentina produzida até a conclusão da formação radicular pode ser definida como dentina primária e compreenderá a massa principal da matriz de dentina circumpulpar no dente humano. Ela se forma a uma taxa de aproximadamente 4 microns por dia, embora a taxa de formação da dentina seja mais lenta na raiz do que na coroa do dente. A dentina secundária fisiológica é estabelecida após a conclusão da formação radicular e ocorre a uma taxa muito mais lenta ao longo da vida (SMITH *et al.*, 1995).

A dentina terciária é geralmente reconhecida como uma matriz de dentina estabelecida em locais específicos do complexo dentinopulpar em resposta a estímulos ambientais. Tais estímulos, se de grau relativamente leve, estimularão uma taxa aumentada de secreção da matriz pelos odontoblastos existentes expostos à influência. Estímulos mais fortes, no entanto, levarão à morte dos odontoblastos e, se as condições no complexo dentinopulpar forem favoráveis, uma nova geração de células “tipo odontoblasto” secretarão uma matriz dentinária reparadora naquele local (SMITH *et al.*, 1995).

Smith *et al.* (1995) classificaram a dentina terciária em dois tipos: Reacionária e Reparadora. A dentina terciária reacionária é secretada pelas células odontoblásticas pós-mitóticas sobreviventes em resposta a um estímulo leve a moderado. Já a dentina terciária reparadora é aquela secretada por uma nova geração de células “tipo odontoblasto” em resposta a um estímulo mais forte, que leva à morte dos odontoblastos pós-mitóticos originais responsáveis pela secreção primária e fisiológica da dentina secundária, como por exemplo, numa exposição acidental da polpa.

O ponto fundamental dessa classificação é que a dentina terciária secretada (reparadora ou reacionária) surge de duas populações diferentes de células e, portanto, tem duas características distintas de formação de tecido. A estrutura das dentinas terciárias apresenta-se em um espectro de aparência que varia de uma matriz tubular regular que é praticamente indistinguível da dentina primária a uma matriz atubular muito distrófica, contendo células aprisionadas nela. Além disso, após um estímulo compatível, a dentina terciária é também depositada na interface polpa-dentina, aumentando assim a espessura total da dentina circumpulpar (SMITH *et al.*, 1995).

2.3 Hidroxiapatita

A HAp pode ser encontrada nos dentes e nos ossos do corpo humano. 67% do osso é composto de HAp, que permeia a matriz orgânica. Nos dentes, cerca de 96% do esmalte consiste em HAp mineral. A dentina subjacente forma a maior parte do dente e pode ser sensível se a proteção do esmalte for perdida. A dentina é um material poroso composto por 70% de materiais inorgânicos, incluindo HAp (MUCALO, 2015; OSHIDA, 2015).

Biomateriais à base de HAp vem sendo utilizados em várias aplicações maxilofaciais. O cimento à base de HAp possui excelente biocompatibilidade quando usado para reparar defeitos ósseos e é capaz de promover osteointegração e substituição por osso quando colocado em contato direto com o osso hospedeiro viável devido a um equilíbrio bem operado entre osteoclastos e células osteoblásticas para controlar quantidades de Ca e P em sangue, durante o processo de remodelação óssea, demonstrando portanto a sua bioatividade. Vários estudos também propuseram o seu uso como capeador pulpar direto, uma vez que o seu contato direto com o complexo dentinopulpar promove uma boa formação de ponte dentinária (KIBA *et al.*, 2010; MUCALO, 2015; SHAYEGAN *et al.*, 2010; SWARUP *et al.*, 2014).

Uma das propriedades mais interessantes e únicas da HAp é a capacidade de aceitar substitutos e vagas iônicas. Embora os organismos utilizem completamente essas habilidades para adaptar os tecidos mineralizados à sua fisiologia e às suas necessidades funcionais, as Hidroxiapatitas substituídas estão apenas no início do seu desenvolvimento em biomateriais feitos sob medida para diferentes aplicações e cenários. Esta singularidade associada à HAp levou ao desenvolvimento de estruturas que permitem a neoformação de tecido, úteis para engenharia de tecido ósseo e sistemas de administração de medicamentos (MUCALO, 2015).

Quando aplicada diretamente na polpa, cimentos a base de HAp tendem a estimular a reorganização do tecido pulpar e a formação de tecido dentinário reparador, como observado por Gala-Garcia *et al.* (2010) e Swarup *et al.* (2014).

Swarup *et al.* (2014) avaliou a HAp em partículas nanométricas, com comprimento de cerca de 50 a 100 nm e uma largura de cerca de 20 a 40 nm, semelhante às apatitas biológicas encontradas na dentina humana. Conseguiram observar atributos importantes nestas partículas como serem mais porosas, o que permite o crescimento das células e os fatores de crescimento; permitem o transporte efetivo de nutrientes, oxigênio e resíduos; são biodegradáveis, não deixando subprodutos tóxicos; podem ser substituídos por tecidos regenerativos, mantendo a forma da estrutura final do tecido; são biocompatíveis; apresentam força física e mecânica adequada e eficácia antibacteriana. Demonstra, portanto, a possibilidade do material ser usado como um andaime na regeneração de tecidos em endodontia e, eventualmente, como um agente capeador direto.

2.4 Quitosana

A Quitosana (QS) é um derivado N-desacetilado de quitina e é atualmente de alto interesse comercial devido à sua elevada porcentagem de nitrogênio em comparação com a celulose sinteticamente substituída, o que a torna um agente quelante útil. Como a maioria dos polímeros usados atualmente são materiais sintéticos, sua biocompatibilidade e biodegradabilidade são muito mais limitadas do que as de polímeros naturais, como a quitosana e seus derivados. Os biopolímeros muitas vezes exibem propriedades excelentes, como biocompatibilidade, não toxicidade e biodegradabilidade. Os grupos amino e hidroxilo da quitosana facilitam a modificação da QS em matrizes que criam uma base para orientação de arquitetura tecidual, uma vez que estes grupos dão a quitosana uma carga positiva, através da qual permite que a mesma possa se ligar firmemente às células com cargas positivas através de interações eletrostáticas. A modificação da QS por vários graus de desacetilação, reticulação, tratamento com polietilenoglicol (PEG), tratamento de aglutinina de germe de trigo, reforço de grafeno, tratamento térmico rigoroso e tratamento com plasma de oxigênio podem, em última instância, afetar a biocompatibilidade e a biodegradabilidade da quitosana (HALIM *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2010).

A aplicação da QS para engenharia de tecidos requer que a QS não seja apenas biocompatível, mas também biodegradável. A taxa de degradação dos produtos à base de QS quando utilizada como modelo em aplicações de engenharia de tecidos, é relativamente lenta, o que permite que mantenha a sua resistência mecânica até a regeneração do tecido estar quase completa (HALIM *et al.*, 2012).

A QS pode ser facilmente fabricada em diferentes formas, tornando-se um atraente material base para orientação de arquitetura tecidual (scaffold) para a regeneração de diferentes tecidos macios e duros. Também é muito importante que a QS possua grupos funcionais abundantes em sua espinha dorsal, tornando-se um excelente candidato para desenvolver compósitos via modificação ou adição com diferentes agentes biológicos. Os scaffolds biofarmacêuticos à base de QS, portanto, têm grande potencial para serem usados como matrizes extracelulares artificiais na engenharia de tecidos e na medicina regenerativa. Estudos mostraram que o material compósito fabricado com hidroxiapatita e QS exibiu boa injectabilidade e as

células conseguiram se infiltrar nos macroporos e ancorar os cristais de nano-apatita aos minerais ósseos (HALIM *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2002).

A incorporação de nanoestruturas inorgânicas a compósitos de QS é um ótimo meio para manipular as propriedades físicas e biológicas dos mesmos. Zhao *et al.* (2002) preparam uma rede de HAp biodegradável e de quitosana-gelatina como um scaffold biomimético 3D para engenharia de tecido ósseo. Li *et al.* (2010) estudou a combinação de um compósito a base de quitosana com nano-HAp e óxido de zinco e reportou que a alta densidade de carga na superfície atrai a absorção de íons de Cálcio (Ca) e fósforo (P) formando vários centros de nucleação, demonstrando o caráter bioativo do compósito (HALIM *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2010)

2.5 Óxido de zinco

O Zinco (Zn), o Titânio (Ti), o Tântalo (Ta) e o Zircônio (Zr) são todos pertencentes à família de metais de transição, e estudos indicaram que Ti, Ta e Zr possibilitam a formação de apatita óssea em suas superfícies em SBF através do efeito catalítico dos grupos Ti–OH, Ta–OH e Zr–OH, respectivamente (K. TSURU, A.OSAKA, X. X. WANG, 2001; MIYAZAKI *et al.*, 2000). Portanto, pode-se inferir que, quando o Óxido de Zinco (ZnO) encontrar com solução aquosa, serão formados muitos grupos de Zn–OH, os quais atuarão como núcleos de apatita, e assim desencadearão a formação de apatita semelhante a um osso na superfície do compósito nano-HAp/QS em SBF (LI *et al.*, 2010).

Zn é um elemento traço essencial com efeitos estimuladores na formação óssea *in vitro* e *in vivo* (O'DELL, 2000). Nos estudos de Yamaguchi *et al.* (1988) foi encontrado que o Zn^{2+} mantém a atividade das proteínas ósseas, a quantidade de cálcio e a atividade da fosfatase alcalina na calvaria de ratos *in vitro*. Enquanto Kanzaki *et al.* (2000) no seu estudo preparando biocerâmicas contendo Zn, descobriram que Zn^{2+} promovia uma maior proliferação e diferenciação de células osteoblásticas *in vitro* e também promoveu uma maior formação óssea *in vivo*. No estudo de Li *et al.* (2010), foi observado que a presença de ZnO no cimento pode reagir tanto com água ou com ácido e liberar muito Zn^{2+} , o que pode facilitar uma nova formação óssea mais rápida e assim acelerar o reparo dos defeitos ósseos, encontrou também que a adição de ZnO ao compósito encurta o tempo de presa do cimento e reforça as características físicas do mesmo.

2.6 Doxíciclina

A Doxíciclina, além da sua capacidade bacteriostática é capaz de agir inibindo as proteases teciduais, evitando o colapso tecidual durante processos inflamatórios, além de influenciar a diferenciação de células osteoprogenitoras e aumentar a regulação da Fosfatase Alcalina. Em resposta a agentes externos, a resposta imune e inflamatória do hospedeiro produz mediadores inflamatórios que, por sua vez, medeiam a ativação de proteases teciduais, como as metaloproteinases da matriz (MMPs), as quais são responsáveis pela degradação da matriz extracelular e membranas basais. O infiltrado celular inflamatório, é uma fonte significativa de MMPs. O aumento da expressão de MMPs pode afetar negativamente a homeostase tecidual e mediar o colapso tecidual. As tetraciclinas semissintéticas, como a doxíciclina, são capazes de funcionar como inibidores de MMPs destrutivas de tecido. A doxíciclina tem demonstrado ser capaz de aumentar a cicatrização e os mediadores osteogênicos e reduzir a atividade da colagenase. Ela influencia diretamente a proliferação e diferenciação das células osteoprogenitoras, além de aumentar a regulação da Fosfatase Alcalina (MUTHUKURU & SUN, 2013).

Estudos tem sido feitos adicionando a Doxíciclina com a intenção de aproveitar de suas propriedades mineralizadoras, como no estudo de Toledano *et al.*, (2019) em que nanogéis contendo partículas de Zn e Doxíciclina foram colocadas em contato com túbulos dentinários e ambos, comparados ao Cálcio, promoveram uma maior mineralização, sendo que a Doxíciclina ajudou a promover uma maior precipitação de cristais de apatita.

3 JUSTIFICATIVA

Os cimentos odontológicos usados para capeamento pulpar são biomateriais que promovem selamento cavitário e em sua maioria tem capacidade limitada de induzir a citodiferenciação de odontoblastos e em de conduzir e orientar as células originadas por proliferação das dentino-progenitoras, provenientes das margens dos defeitos, a promoverem a neoformação de tecido dentinário.

Dentre as vantagens relacionadas aos cimentos formados por compósitos contendo nanohidroxiapatita, quitosana e nanopartículas de óxido de zinco podem se destacar a disponibilidade em grande quantidade, facilidade de manipulação, além da possibilidade de uma integração física e/ou química no meio inserido, podendo ser reabsorvidos. A reabsorção in situ e troca por abundante tecido mineralizado e dentina terciária supera as limitações dos materiais disponíveis atualmente no mercado, tais como o Ca(OH)_2 , biodentine e/ou MTA. A reabsorção do biomaterial utilizado deve permitir uma degradação lenta antes do reparo dentinário estar completo. A maneira de tentar melhorar as propriedades biológicas dos cimentos dentinários é aumentar as propriedades através da sua combinação com polímeros, formando um compósito.

Avaliar a biocompatibilidade de biomateriais utilizados na odontologia é crucial. Uma melhor compreensão do processo envolvido neste evento pode ajudar na escolha de biomateriais e no desenvolvimento de novos materiais com um desfecho clínico previsível.

Até o momento, não há dados disponíveis em relação aos mecanismos de sinalização molecular provocados pelos cimentos formados por compósitos de nanohidroxiapatita, nanopartículas de óxido de zinco e sua influência no grau de mineralização da dentina. Avaliar a biomineralização das pastas cimentantes através da análise da resposta do tecido pulpar após capeamento direto em ratos é de extrema importância para uma possível aplicação futura.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a biocompatibilidade e a bioatividade de compósitos experimentais compostos de Nano-Hidroxiapatita, Quitosana e Óxido de Zinco, com e sem adição de Doxiciclina através de um teste de estímulo pulpar, sob as hipóteses a serem testadas de que o compósito é biocompatível com o tecido pulpar e também é bioativo a ser constatado pela indução da formação de dentina reparadora, além de provocar nenhuma ou pouca inflamação no tecido.

4.2. Objetivos específicos

- Sintetizar a Nano-Hidroxiapatita e nanopartículas de Óxido de Zinco
- Preparar os compósitos cimentantes com adição, ou não de doxiciclina
- Comparar qualitativamente a resposta inflamatória crônica da polpa dos ratos ao cimento experimental com os controles em diferentes tempos por graduação histológica
- Comparar quantitativamente a formação de matriz mineral e dentina terciária nos dentes capeados com as pastas cimentantes com os controles, em diferentes tempos.

5 METODOLOGIA

5.1 Materiais utilizados

Tabela 1 – Materiais utilizados na composição dos compósitos cimentantes analisados

Produto	Fabricante	Peso Molecular
Fosfato de Amônio Monobásico	MERCK, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	115,03 g/mol
Hidróxido de Sódio	Labsynth, Diadema, SP, Brasil	40 g/mol
Nano-hidroxiapatita	-	502,3114 g/mol
Nitrato de Cálcio Tetrahidratado	Labsynth, Diadema, SP, Brasil	236,15 g/mol
Nitrato de Zinco	Sigma-Aldrich, Duque de Caxias, RJ, Brasil	297,47 g/mol
Óxido de Zinco	-	81,3794 g/mol
Persulfato de Potássio	Neon, São Paulo, SP, Brasil	270,32 g/mol
Polietilenoglicol	Birmingham Polymers Inc., Pelham, AL, EUA	50.000-190.000 Da
Quitosana (acetilação: 75-85%)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA	50.000-190.000 Da
Tetrametiletilenodiamina	Sigma-Aldrich, Duque de Caxias, RJ, Brasil	116,21 g/mol

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

5.2 Síntese da Nano-Hidroxiapatita

A síntese de Nano-HAp foi realizada por co-precipitação utilizando a deposição química úmida de acordo com o método de Cox *et al.* (2014). No primeiro momento foram preparadas duas soluções:

- Solução A: 4,6012g de Fosfato de amônio monobásico ((NH₄)H₂PO₄) solubilizado em 120 mL de água deionizada.
- Solução B: 15,7512g de Nitrato de Cálcio Tetrahidratado (Ca(NO₃)₂ • 4H₂O) solubilizado em 120 mL de água deionizada.

Ambas soluções foram agitadas até que os seus reagentes fossem completamente dissolvidos. Com o auxílio de um medidor de pH de bancada, o pH da solução A foi medido e ajustado com uma solução de 25% de Hidróxido de Amônia (NH₄OH) até atingir o pH 11. A solução B foi colocada sobre agitação constante de 400 rpm sob uma temperatura de 100°C e, com utilização de uma bureta, a solução A foi vertida por gotejamento sobre a solução B. A solução final foi separada do sobrenadante por filtração à vácuo, lavado com água deionizada até que atingisse um pH neutro, secado em estufa por 24 horas à 100°C e triturado com grau e pistilo até que se formasse um pó.

5.3 Síntese do Óxido de Zinco Nano Particulado

A síntese do Óxido de Zinco nano particulado foi realizada com base no método proposto por Dantas *et al.* (2008). Foram preparadas duas soluções:

- Solução A: 0,5 mol de Nitrato de Zinco ($Zn(NO_3)_2$) solubilizado em 100 mL de água deionizada.
- Solução B: 1 mol de Hidróxido de Sódio (NaOH) solubilizado em 100 mL de água deionizada.

Ambas as soluções foram completamente dissolvidas por agitação constante. A solução A foi colocada sobre agitação constante sob uma temperatura de 40°C e, com utilização de uma bureta, a solução B foi vertida por gotejamento sobre a solução A. Após o gotejamento completo, a solução final foi mantida sob agitação, com a temperatura constante de 40°C por duas horas. A solução final, então, foi separada do sobrenadante por filtração à vácuo, lavado com água deionizada até que atingisse um pH neutro, secado em estufa por 24 horas à 70°C e triturado com grau e pistilo até que se formasse um pó.

5.4 Composição dos compósitos cimentantes

Os compósitos analisados neste estudo tiveram as seguintes composições:

- Compósito 1: Composto de proporções iguais de Nano-HAp, Óxido de Zinco, Quitosana, Persulfato de Potássio em sua fase sólida e a fase líquida composta de 44% Tampão fosfato-salino (PBS), 50% Polietilenoglicol (PEG) e 6% Tetrametiletilenodiamina (TEMED)
- Compósito 2: Foi preparado com a mesma composição do Compósito 1, com adição de 0,36%, do peso total da mistura, de Doxíciclina

5.5 Composição do controle

O controle utilizado foi o Hidróxido de Cálcio PA (AAF do Brasil Produtos Odontológicos Ltda, Ibiporã, PR, Brasil).

5.6 Preparação dos compósitos

Os compósitos foram proporcionados em uma placa de vidro estéril, com as proporções da fase sólida e da fase líquida mencionadas anteriormente e espatulados até formarem uma pasta homogênea. O Ca(OH)_2 foi misturado em uma placa de vidro estéril com água destilada estéril até formar uma pasta homogênea. Ambos foram preparados no momento da sua inserção nos dentes dos ratos, de modo que tomem presa em contato com a polpa. A presa dos compósitos se deu com uma média de 10 minutos.

5.7 Análise das propriedades físico-químicas

Os compostos sintetizados foram caracterizados por difração de Raios-X utilizando o Difrátômetro Siemens-D5000 do Laboratório de Fluorescência e Difração de Raios X do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Os compostos sintetizados e os compósitos cimentantes foram avaliados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) utilizando o Microscópio de Feixe Duplo - FEI Quanta 3D FEG e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) utilizando o Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 - SpiritBiotwin FEI no Centro de Microscopia da UFMG.

5.8 Avaliação da resposta pulpar *in vivo*

O experimento foi realizado no Laboratório de Odontologia Restauradora da FO-UFMG, sob a coordenação da Professora Doutora Maria Esperanza Cortés Segura.

5.8.1 Seleção dos animais

Foram utilizados ratos da espécie *Rattus norvegicus* com idade média de 46 dias de vida, com peso entre 125 e 200g, machos, saudáveis e com ausência de doença cárie, procedentes do Biotério Central da UFMG.

Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, sob responsabilidade do Professor Dr. Carlos Alberto Tagliati com alimentação e água “*ad libitum*”, temperatura entre 23 - 25°C e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas, seguindo as determinações do ISO 10993-2 para manejo de animais em laboratório.

5.8.2 Aspectos éticos

O projeto foi enviado para o Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) e aprovado com o número de protocolo 308/2017.

5.8.3 Grupos experimentais

Para cada tempo observado, 12 primeiros molares superiores receberam as pastas cimentantes, 6 receberam o controle positivo, composto de Hidróxido de Calcio P.A. (Ca(OH)₂) misturado com água destilada e três receberam o controle negativo, o qual consistia em apenas a restauração com Ionômero de Vidro. Os tempos foram definidos como 14 e 30 dias. Os ratos foram aleatoriamente divididos em 08 grupos, de acordo com o tipo de cimento que receberiam e os tempos nos quais o cimento permaneceria em contato com a polpa até a eutanásia do animal, conforme descrito a seguir:

Tabela 2 – Distribuição dos grupos

Grupo	Material	Número de Animais	Tempo
1	Compósito 1	12	14 dias
2	Compósito 2	12	14 dias
3	Controle Positivo	6	14 dias
4	Controle Negativo	3	14 dias
5	Compósito 1	12	30 dias
6	Compósito 2	12	30 dias
7	Controle Positivo	6	30 dias
8	Controle Negativo	3	30 dias

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

5.8.4 Cálculo amostral

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado com base nas determinações do ISO 7405 (2008), o qual preconiza um número mínimo de 10 dentes a serem testados com a pasta cimentante a ser analisada e 5 dentes a serem testados com um controle, por tempo analisado. Foi adicionado a esta quantidade, dois dentes a serem testados com controle negativo em cada tempo analisado (GALA-GARCIA *et al.*, 2010). Neste estudo foram utilizados dois tempos diferentes, logo o número mínimo de dentes necessários foi de 54 dentes. Foi somado ao número mínimo uma perda estimada de 20%, para cada grupo. Portanto, a amostra total necessária para a realização deste estudo foi de 66 dentes. Devido a anatomia da boca do animal, o acesso ideal poderia ser realizado em apenas dois dentes (primeiros molares superiores). Portanto, foi necessário a utilização de 17 ratos a cada tempo a ser analisado, o número total de animais portanto, foi de 34 ratos.

Figura 1 - Aleatorização dos ratos

ALEATORIZAÇÃO DA AMOSTRA					
CONJUNTO 1 - EUTANASIA COM 30 DIAS			CONJUNTO 2 - EUTANASIA COM 14 DIAS		
GRUPO	ALEATÓRIO	RATO	GRUPO	ALEATÓRIO	RATO
Hidróxido de Cálcio	0,188112586	Rato 1	Hidróxido de Cálcio	0,89683257	Rato 6
		Rato 2			Rato 1
		Rato 3			Rato 2
		Rato 4			Rato 3
		Rato 5			Rato 4
		Rato 6			Rato 5
Cimento		Rato 1	Cimento		Rato 6
		Rato 2			Rato 1
		Rato 3			Rato 2
		Rato 4			Rato 3
		Rato 5			Rato 4
		Rato 6			Rato 5
Cimento + DOX		Rato 1	Cimento + DOX		Rato 6
		Rato 2			Rato 1
		Rato 3			Rato 2
		Rato 4			Rato 3
		Rato 5			Rato 4
		Rato 6			Rato 5
Controle Negativo		Rato 1	Controle Negativo		Rato 6
		Rato 2			Rato 1
		Rato 3			Rato 2
		Rato 4			Rato 3

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

5.8.5 Aleatorização dos grupos

Foi utilizado o software Microsoft Excel para macOS versão 15.38 para a realização da aleatorização da ordem de tratamento dos ratos nos 8 grupos. Primeiramente os grupos foram alocados em 2 conjuntos de acordo com o tempo a ser analisado, da seguinte forma: Conjunto 1 – 30 dias (grupos 1, 2, 3 e 4), Conjunto 2 – 14 dias (grupos 5, 6, 7 e 8) nas colunas “A” e “D”.

A função “=ALEATÓRIO()” foi utilizada nas colunas “B” e “E” para criar 17 números aleatórios. Nas colunas “C” e “F”, foram colocados os números dos ratos, de 1 a 6, que correspondiam a ordem de recebimento do Biotério Central.

As colunas “B” e “C” foram selecionadas e dado o comando “Classificar do menor para o maior”. O mesmo foi feito para as colunas “E” e “F”. Ao final do processo, em cada linha foi indicado qual grupo pertencerá o rato. O processo foi repetido a cada nova remessa de ratos do Biotério Central. (FIGURA 1)

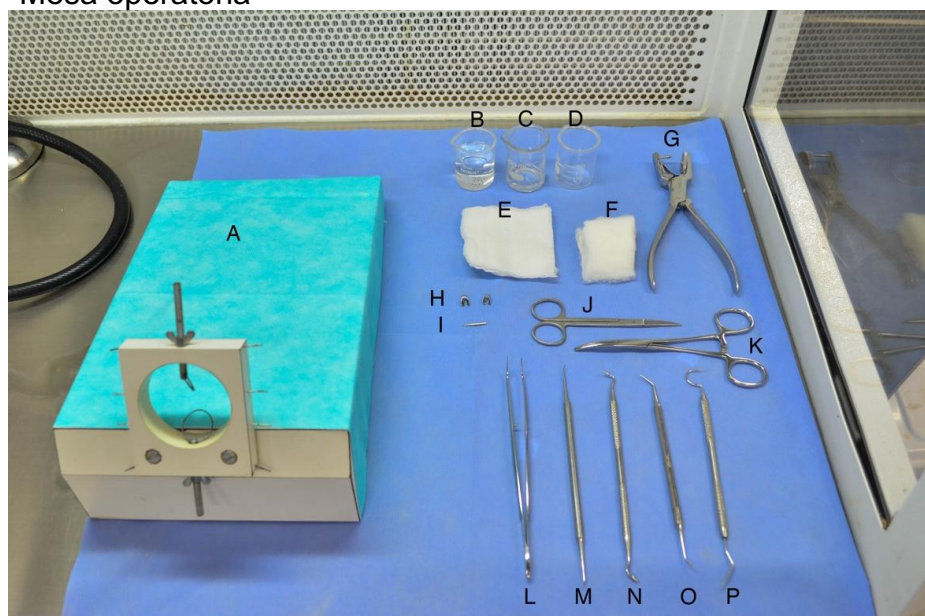
5.8.6 Sequência operatória

Figura 2 – Operador realizando o capeamento pulpar direto



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Figura 3 – Mesa operatória



- Legenda:
- a) Mesa cirúrgica com abridor de boca adaptado para ratos
 - b) Água destilada estéril
 - c) Digluconato de Clorexidina 2%
 - d) Becker para descarte de material
 - e) Gaze estéril
 - f) Algodão estéril
 - g) Perfurador de Ainsworth
 - h) Grampos adaptados para ratos
 - i) Broca $\frac{1}{4}$ de alta rotação
 - j) Tesoura
 - k) Porta agulha curvo
 - l) Pinça clínica
 - m) Esculpidor discóide cleóide
 - n) Esculpidor de Holleback número 6
 - o) Aplicador Dycal angulado
 - p) Sonda exploradora

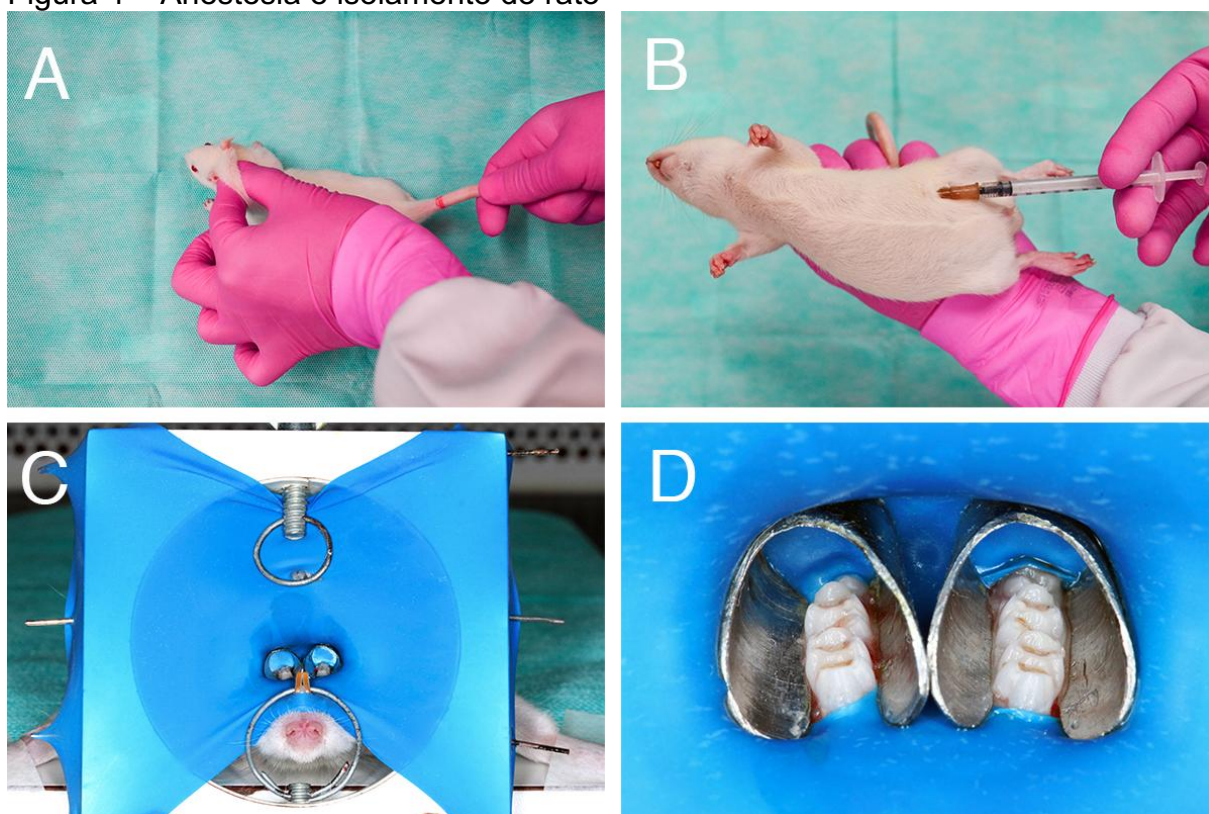
Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

A mesa cirúrgica foi preparada e todo o procedimento foi realizado em uma capela de fluxo laminar horizontal. A Figura 2 apresenta o operador realizando o procedimento em um rato, com utilização de lupas de aumento 3X e o animal posicionado no centro da mesa operatória. A Figura 3 apresenta todos os instrumentais utilizados e o posicionamento destes na mesa operatória.

Os animais foram sedados com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de Cetamina (80 mg/g) e Xilazina (9 mg/Kg), somando um volume de 100 μ L para cada 100 g do peso do animal (FIGURA 4 A, B).

Após a sedação, os animais foram colocados em uma mesa adaptada para a realização do procedimento e tiveram as quatro patas contidas com fita crepe. Os molares superiores foram isolados com lençol de borracha e um grampo especial desenvolvido para anatomia dos molares desta espécie (FIGURA 4 C, D). Foi realizada a antisepsia dos dentes com Digluconato de Clorexidina a 2% e, posteriormente, o excesso removido com água destilada estéril.

Figura 4 – Anestesia e isolamento do rato



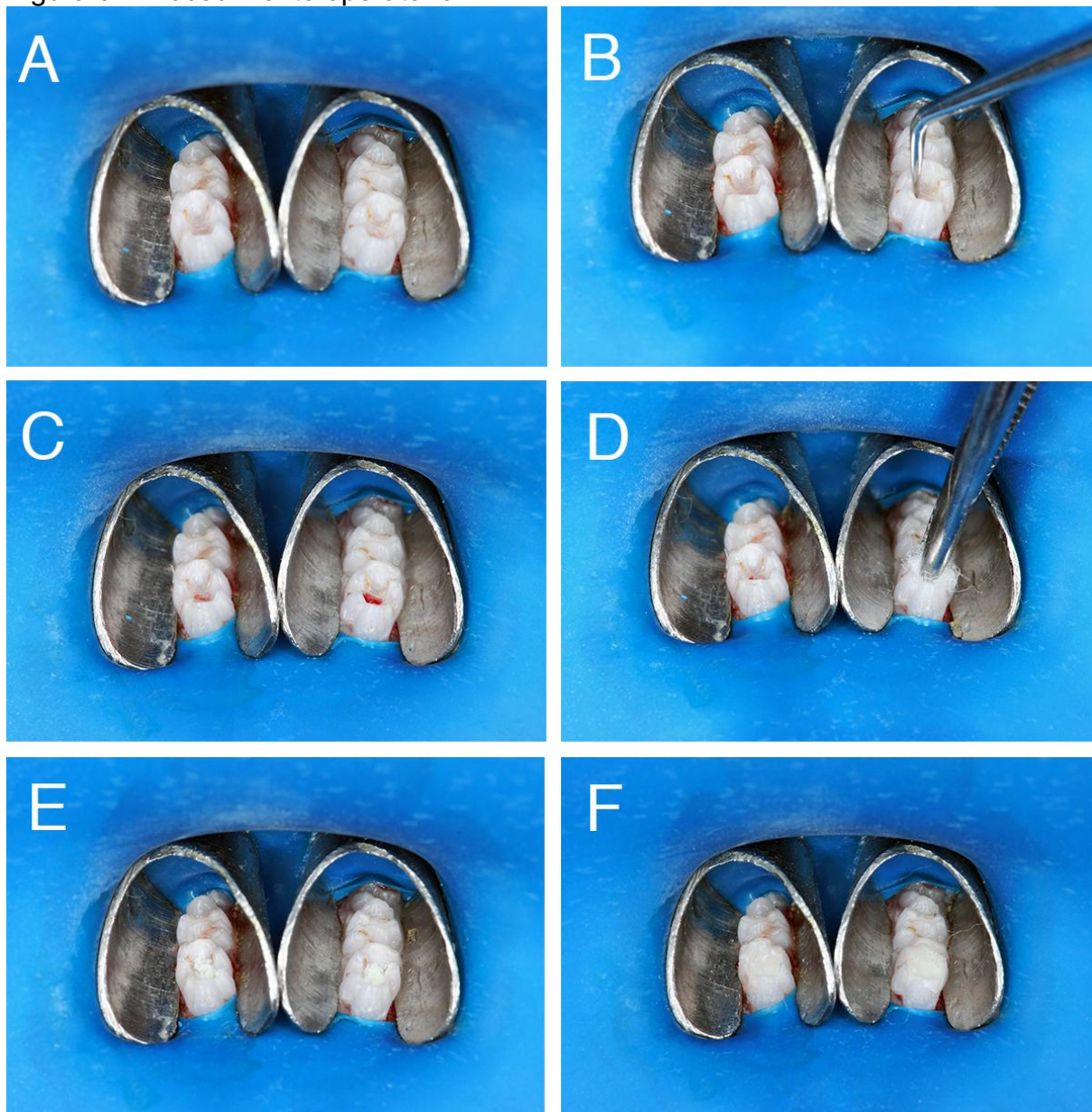
Legenda: a) Contenção do animal
b) Anestesia intraperitoneal
c) Rato posicionado na cama operatória
d) Molares superiores do rato isolados.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Foram realizadas cavidades de classe I, com diâmetro aproximado de 2 mm, nos primeiros molares de cada animal com uma broca esférica 1/4 (JET, Morrisburg, ON, Canadá) em alta rotação. A fim de expor uma área com aproximadamente 1 mm de diâmetro da polpa dentária, foi utilizado a ponta de uma sonda exploratória, com pressão padronizada. As cavidades foram secas com bolinhas de algodão estéreis e posteriormente colocados os cimentos experimentais ou o controle e sobre os materiais, foram realizadas restaurações com cimento de

Ionômero de Vidro (SDI, Bayswater, VIC, Austrália) (FIGURA 5 A-F) (GALA-GARCIA *et al.*, 2010; ISO 10993-2:2006, ISO 7405:2008; KIBA *et al.*, 2010).

Figura 5 - Procedimento operatório



Legenda: a) Cavidade com aproximadamente 1mm de diâmetro
b) Exposição da polpa com sonda
c) Polpas expostas com leve hemorragia
d) Controle da hemorragia com bolinha de algodão estéril
e) Capeamento pulpar direto com o cimento experimental
f) Restauração com Ionômero de Vidro

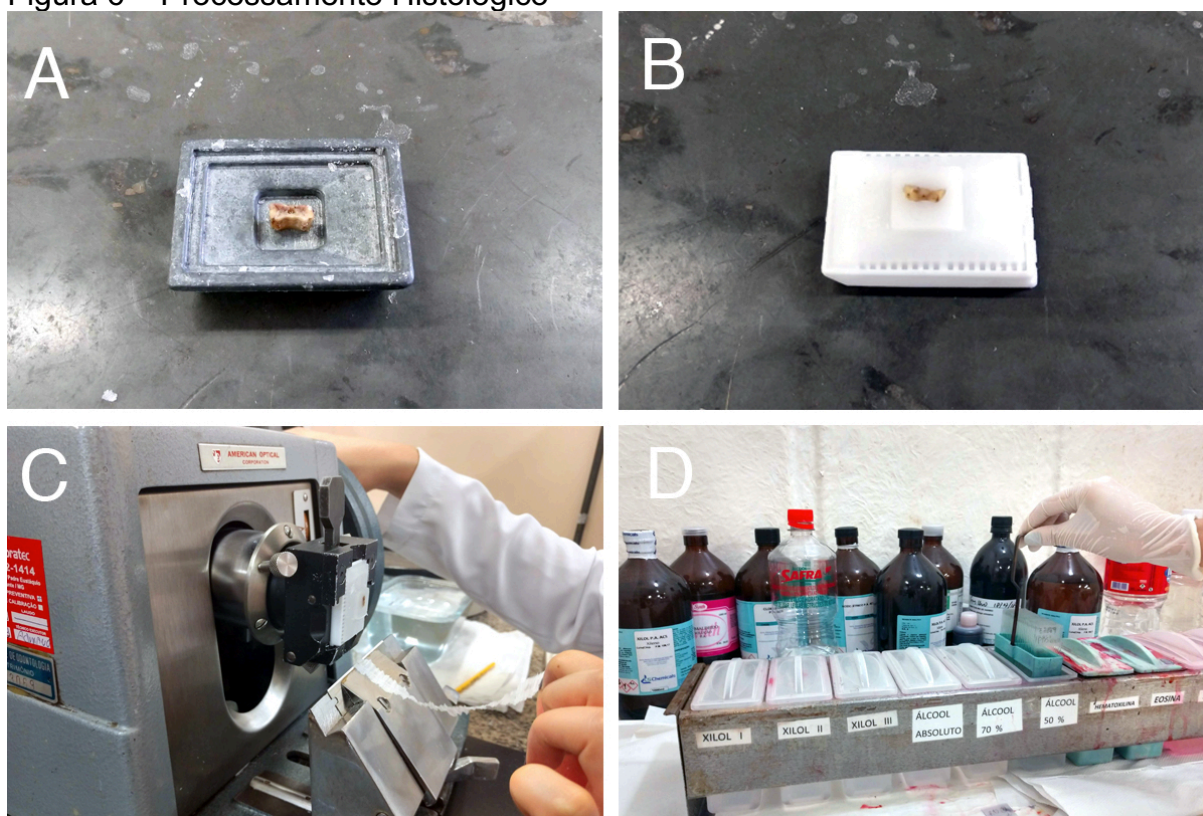
Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

5.8.7 Processamento histológico

Os animais foram eutanasiados através de overdose dos sedativos Cetamina e Xilazina nos seguintes períodos pós-operatórios: 14 e 30 dias.

Os maxilares foram dissecados com a utilização de um bisturi e fixados com Formalina tamponada 10% por um período de 48 horas à 4° C. Na sequência, foi realizada a desmineralização com EDTA 10%, pH 7,4, sendo a solução renovada a cada 4 dias, durante 40 dias até que fosse sido atingido o ponto ideal de desmineralização. O ponto ideal de desmineralização foi atingido quando as peças apresentaram consistência macia do esmalte, e puderam ser cortadas facilmente por uma lâmina. As maxilas foram então seccionadas sagitalmente com o auxílio de um bisturi e o tecido ao redor dos primeiros molares foi cuidadosamente removido de modo que as peças possuísem tamanho adequado aos cortes histológicos.

Figura 6 – Processamento Histológico



Legenda: a) Posicionamento da maxila de rato em molde para inclusão
 b) Maxila de rato incluída em casquete com parafina
 c) Confeção de cortes seriados de 5µm com auxílio de Micrótomo
 d) Coloração das lâminas com Hematoxilina-Eosina

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

As peças foram desidratadas gradativamente em soluções de concentrações crescentes de Etanol (60% até 99,6%), diafanizadas em Xilol, posicionadas em casquetes plásticos, de modo que os dentes ficassem paralelos e permitisse que os cortes histológicos fossem realizados paralelos ao longo eixo do dente em sentido sagital e então, embebidas em parafina (Histopar, EasyPath, São Paulo, SP, Brasil) (FIGURA 6 A, B).

Foram obtidos cortes seriados de 5 µm de espessura, em micrótomo até que fosse atingido o ponto onde houve a exposição da polpa pelo capeamento pulpar direto realizado. Após selecionados os cortes, foi realizada coloração por Hematoxilina-Eosina (FIGURA 6 C, D) e então, selecionados os cortes mais representativos de cada dente.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, de modo descritivo, a fim de avaliar a presença de matriz mineralizada e inflamação pulpar de acordo com a Tabela 1 (GALA-GARCIA *et al.*, 2010; ISO 10993-2:2006, ISO 7405:2008; KIBA *et al.*, 2010).

Tabela 3 – Critérios de avaliação histológica

0	Nenhuma inflamação ou resposta não significativa no local da exposição ou abaixo da mesma
1	Resposta pequena com poucas células inflamatórias no local da exposição ou abaixo da mesma
2	Resposta moderada. Infiltração de células inflamatórias moderadas ou localizadas na câmara pulpar no local da exposição ou abaixo da mesma
3	Resposta severa. Inflamação grave e/ou formação de abscessos no local da exposição ou abaixo da mesma
4	Necrose completa da polpa

Fonte: Adaptado de Gala-Garcia et al. (2010) e Kiba et al. (2010)

5.8.8 Análise histomorfométrica

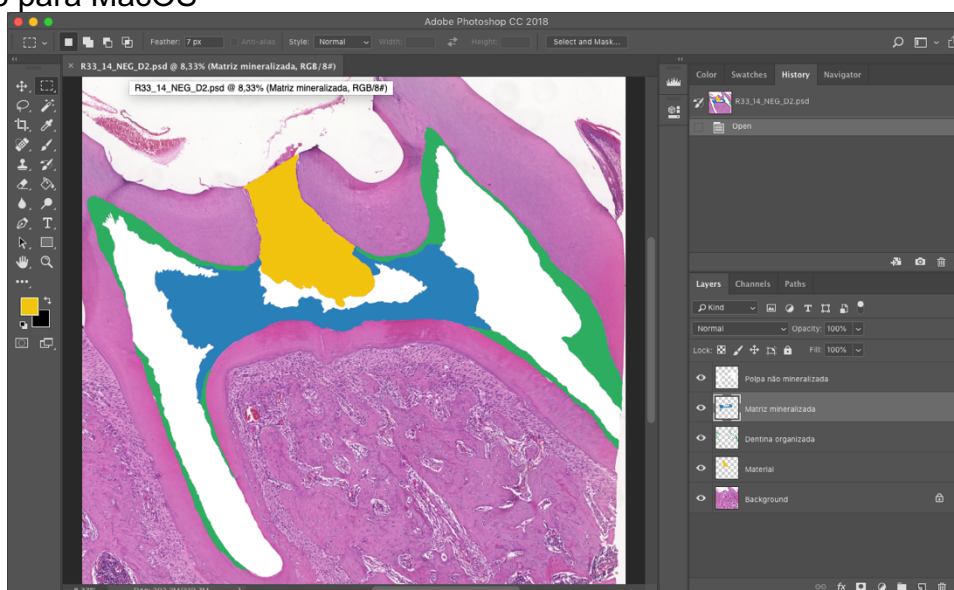
Para a análise histomorfométrica, foram selecionadas as lâminas dos grupos 5-8, que correspondem ao tempo de 30 dias, elas foram escaneadas no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG com uso do Scanner Panoramic MIDI (3DHitech, Budapeste, Hungria), com objetiva 20x.

Os arquivos das lâminas foram abertos no programa QuPath versão 0.2 para MacOS e foram selecionadas como áreas de interesse retângulos os quais compreendessem toda a câmara pulpar presente no corte analisado e então, convertidas em imagens do tipo “.TIFF”, mantendo a escala original obtida pelo scanner (BANKHEAD, *et al.*, 2017).

Os passos seguintes foram seguidos para cada imagem selecionada (uma imagem por dente) no programa Adobe Photoshop CC 2018 para MacOS: criação de quatro novas camadas transparentes através do comando “CMD + Shift + N”, com os nomes: “Polpa não mineralizada”, “Matriz Mineralizada”, “Dentina organizada” e “Material” (FIGURA 7); na camada “Background”, com a utilização da ferramenta “Magic Wand”, com tolerância de 50, foram selecionadas as regiões de interesse (ROIs) (TABELA 4). Após a seleção com a ferramenta “Magic Wand”, a imagem foi conferida com o zoom em 100% e modificada através da utilização da ferramenta “Lasso” com os comandos “Option” para subtrair da seleção e “Shift” para adicionar à seleção, removendo ou adicionando áreas as quais a seleção automática errou, as áreas a serem selecionadas foram definidas de acordo com os seguintes critérios:

- Polpa não mineralizada: Toda a área correspondente ao tecido pulpar que não apresentasse características indicativas de formação mineral
- Matriz mineralizada: Toda a área correspondente ao tecido com características de pré-dentina, celularizado e desorganizado
- Dentina organizada: Toda a área correspondente ao tecido organizado, nas margens da câmara pulpar, os quais apresentam mudança na orientação dos túbulos dentinários, indicativo de dentina terciária reacional
- Material: Toda a área correspondente ao material inserido na polpa

Figura 7 – Seleção das regiões de interesse utilizando o software Adobe Photoshop CC 2018 para MacOS

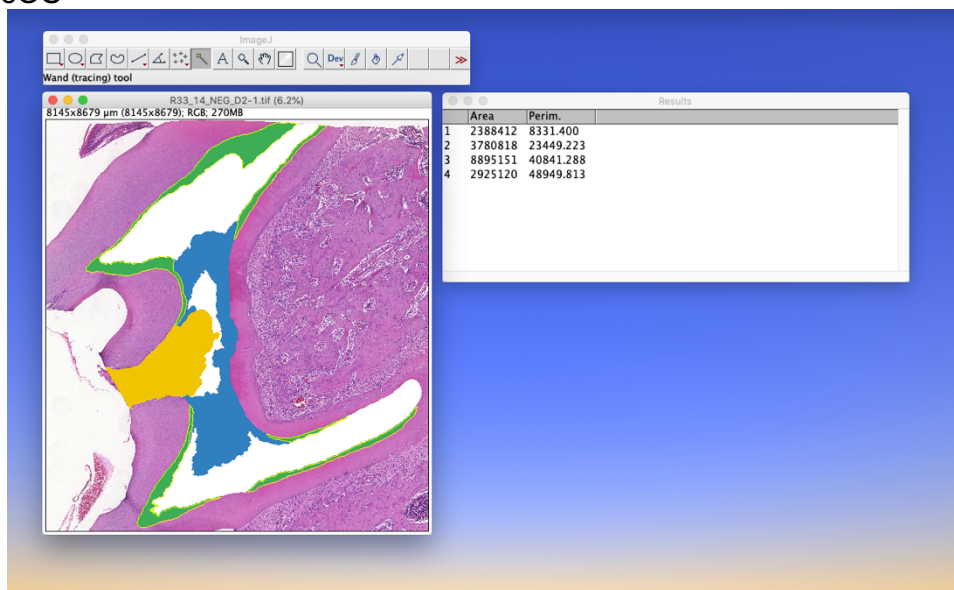


Legenda: Amarelo: material; Azul: matriz mineralizada; Verde: dentina organizada; Branco: polpa não mineralizada
 Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Posterior a seleção das áreas relevantes, foi selecionado a camada relativa a região de interesse em questão e selecionado a opção “Edit>Fill”, preenchendo a região selecionada com uma cor, com cuidado para escolher cores diferentes (FIGURA 7). As imagens foram salvas em arquivos “.TIFF” e renomeadas de acordo com o seguinte código: “[Rato]_[Tempo]_[Material]_[Dente]”.

As imagens criadas no Adobe Photoshop foram abertas no programa Image J para MacOS versão 1.52. As escalas foram conferidas para cada imagem, caso alguma houvesse variação de acordo com a imagem original, a variação foi corrigida. Foram seguidos os critérios expostos na Tabela 4 para a realização da análise. Com o auxílio da ferramenta “Wand Tracing” as áreas coloridas no Adobe Photoshop foram selecionadas individualmente e, selecionada em seguinte, a opção “Analyze>Measure”. Para definição do diâmetro de abertura e profundidade do material foi utilizada a ferramenta “Straight Line” e posteriormente a opção “Analyze>Measure” (EGAN; BRENNAN; PIGNOLO, 2012) (FIGURA 8).

Figura 8 – Tomada de medidas histomorfométricas com auxílio do software Image J para MacOS



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Os dados relativos a área mineralizada e formação de dentina organizada foram tabulados e calculados em porcentagem. O percentual de mineralização foi calculado com base no valor de toda a área mineralizada comparado a toda a área da câmara e conduto pulpar visíveis no corte. O Percentual de formação de dentina reacional levou em consideração toda a área correspondente ao tecido organizado, nas margens da câmara pulpar, os quais apresentam mudança na orientação dos túbulos dentinário comparado a área da câmara e conduto pulpar visíveis.

Tabela 4 – Critérios da avaliação histomorfométrica

Área da Dentina Reacional	Toda a área correspondente ao tecido organizado, nas margens da câmara pulpar, os quais apresentam mudança na orientação dos túbulos dentinários
Área de mineralização	Toda a área correspondente ao tecido com características de pré-dentina, celularizado e desorganizado
Área do material	Toda a área correspondente ao material inserido na polpa
Área não mineralizada	Toda a área correspondente ao tecido pulpar que não apresentasse características indicativas de formação mineral
Diâmetro de Abertura	Relativo a uma linha reta unindo os dois lados no ponto indicativo do início da área do material
Profundidade da Exposição	Relativo a uma linha reta do ponto de início da área do material até o ponto mais profundo que atingiu o material na câmara pulpar

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

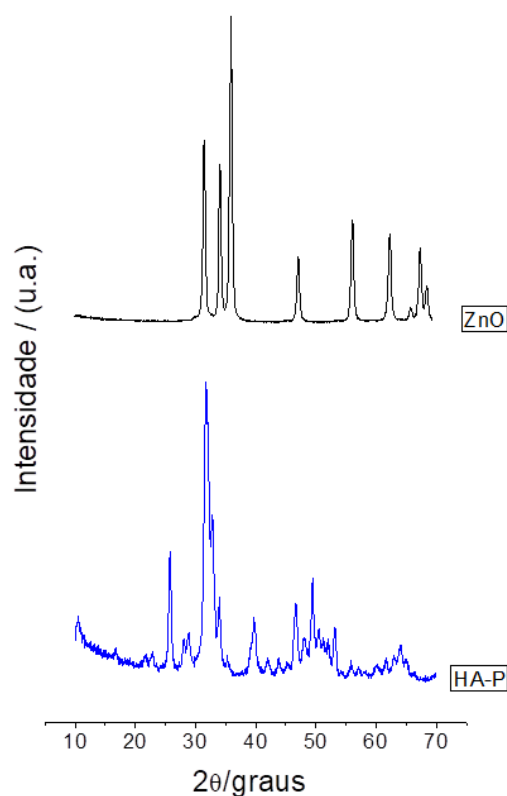
5.9 Análise estatística

Os dados foram armazenados em um banco de dados e posteriormente as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico IBM SPSS Statistics para macOS, versão 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Os dados foram analisados utilizando o teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de Stweel-Dwass, adotando o nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização Físico-Química

Gráfico 1 – Difratograma dos Raios-X de ZnO e HAp sintetizados

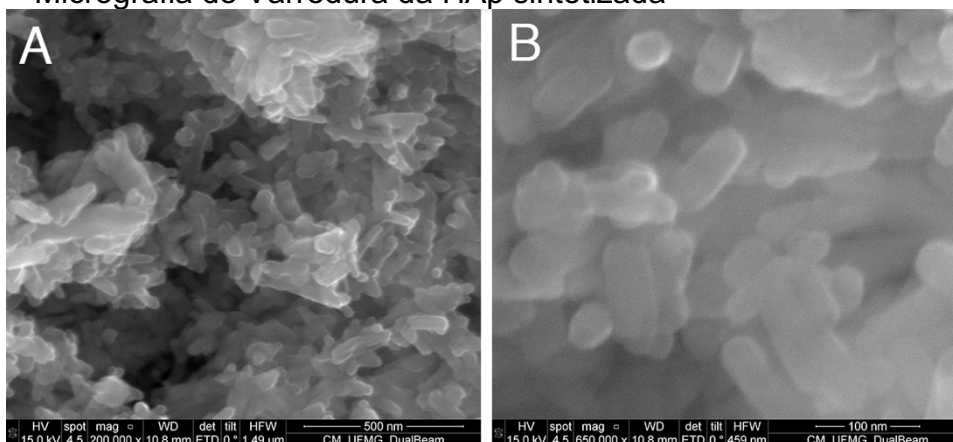


Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

No difratograma do ZnO pode-se identificar picos médios entre 30 e 35° de 2θ e um pico maior próximo a 40°, característicos da estrutura. E no difratograma da HAp é possível identificar pico largo entre 30 e 35, também característicos da estrutura.

Nas Figuras 9 e 10 são apresentadas micrografias de varredura onde pode-se observar a morfologia dos cristais sintetizados de ZnO e HAp que apresentaram cristais com tamanho menor que 100 nm. A Figura 11 apresenta uma micrografia de transmissão dos dois compostos onde pode-se ver claramente a morfologia dos cristais formados na síntese.

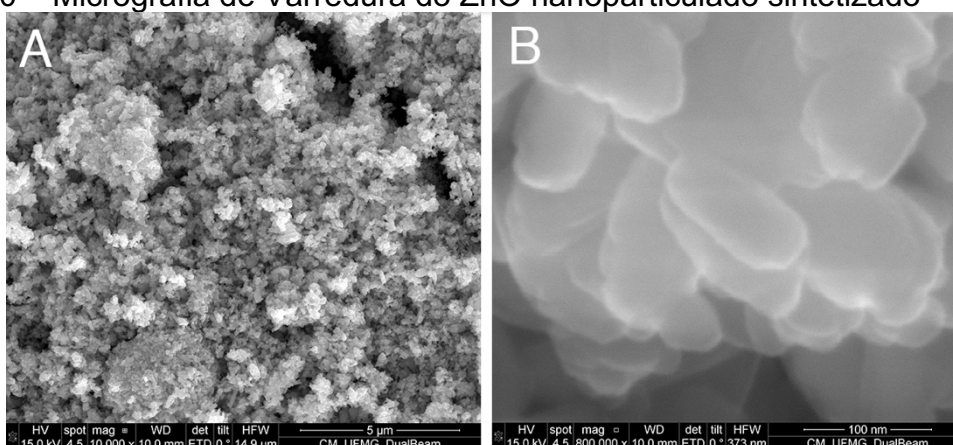
Figura 9 – Micrografia de Varredura da HAp sintetizada



Legenda: a) Escala de 500 nm
b) Escala de 100 nm

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Figura 10 – Micrografia de Varredura do ZnO nanoparticulado sintetizado

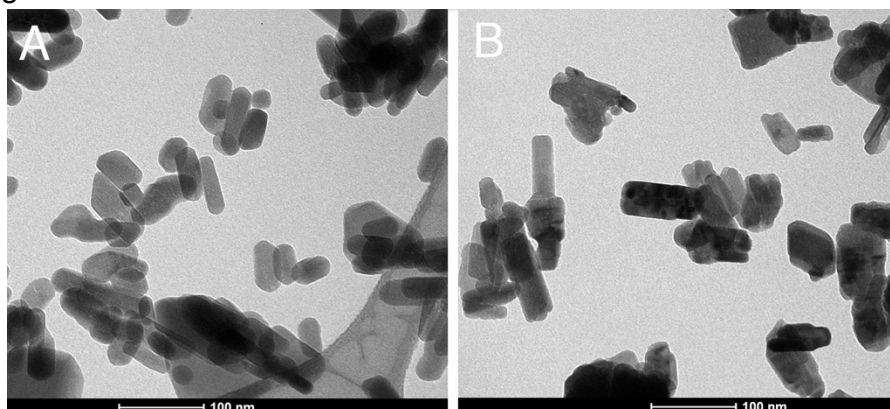


Legenda: a) Escala de 5 μm
b) Escala de 100 nm

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

A Figura 12 apresenta uma micrografia de varredura do compósito 1 onde é possível observar que a superfície do compósito se apresenta bastante rugosa, com uma tendência para aglomerar conduzindo a formação de poros sub-micrométricos entre si. As formações dos poros são benéficas, pois permitem a circulação dos fluidos fisiológicos quando em contato com os tecidos.

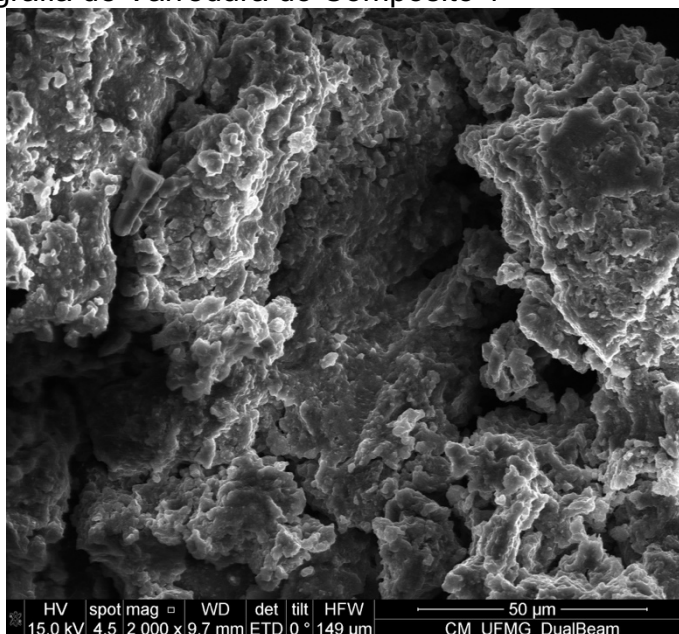
Figura 11 – Micrografia de Transmissão de HAp e ZnO nanoparticulados sintetizados



Legenda: a) Hidroxiapatita
b) Óxido de Zinco

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

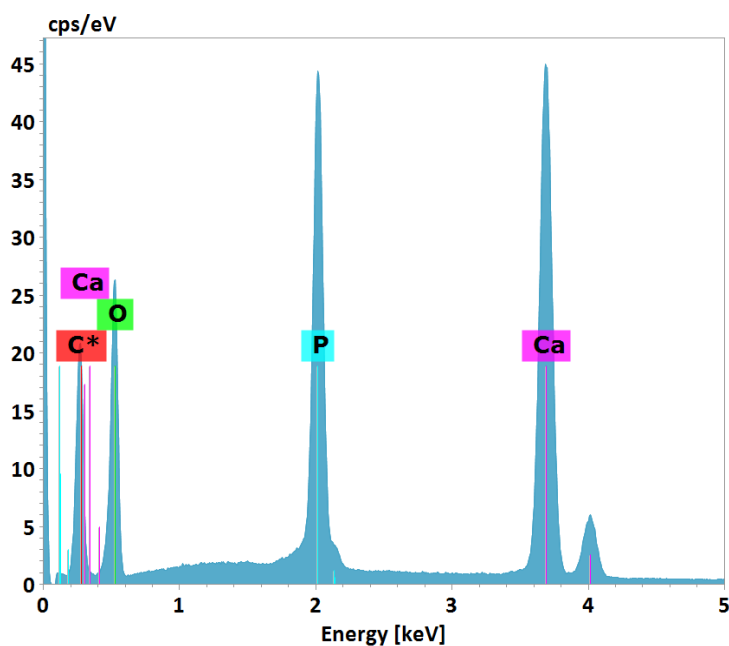
Figura 12 – Micrografia de Varredura do Compósito 1



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

O Gráfico 2 apresenta o espectro de EDS na HAp sintetizada, apresenta picos característicos da HAp, com os elementos Cálcio, Carbono, Oxigênio e Fósforo. Sendo que os dois maiores picos são os de Cálcio e Fósforo, como era esperado. Apresenta a proporção de íons de Cálcio e Fósforo de 2,65, indicando que a síntese produziu de fato Hidroxiapatita.

Gráfico 2 – EDS da HAp sintetizada

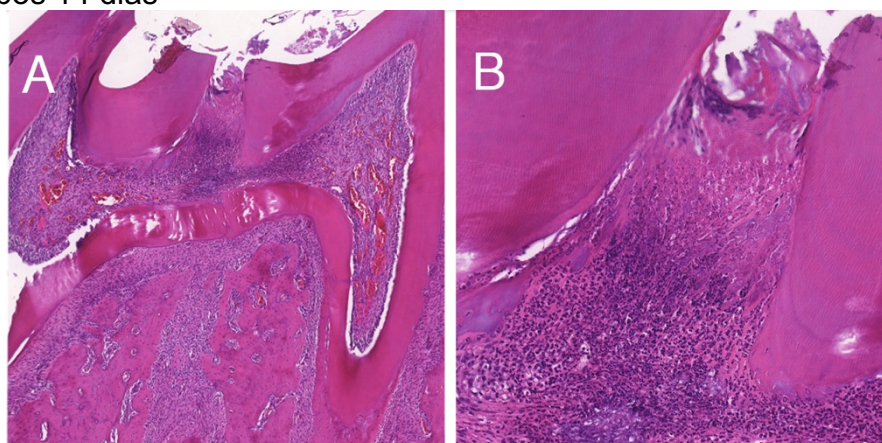


Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

6.2 Análise descritiva

6.2.1 $\text{Ca}(\text{OH})_2$

Figura 13 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ após 14 dias



Legenda: a) Aumento de 20x. Exposição pulpar

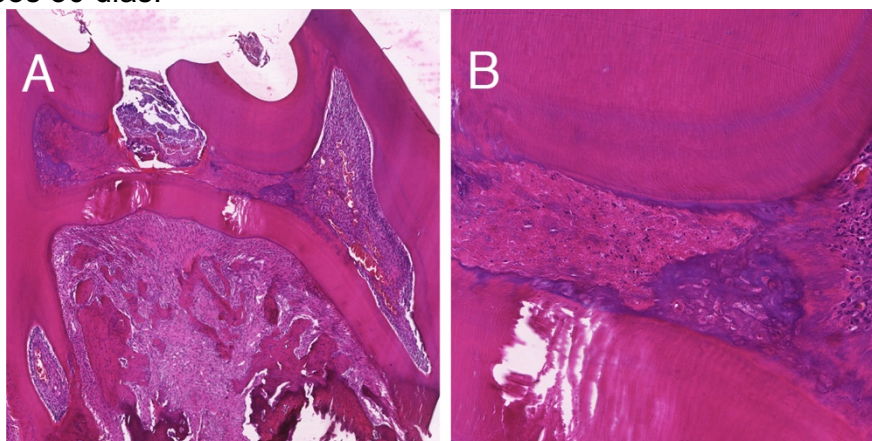
b) Exposição pulpar em detalhe, com tecido mineralizado adjacente a exposição e infiltrado inflamatório crônico abaixo.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Nas lâminas analisadas aos 14 dias foi possível observar tecido mineralizado com aparência dentinóide, desorganizado, celularizado adjacente a exposição. Abaixo deste tecido foi possível observar um tecido pulpar vital, bem organizado com presença de vasos sanguíneos. Nas paredes da câmara pulpar apresentava um espessamento moderado com a formação de dentina reacionária organizada com presença de camada odontoblástica. Grandes infiltrados inflamatórios (FIGURA 13 A, B).

Após 30 dias, foi possível observar a presença de tecido mineralizado compatível com tecido dentinóide desorganizado, celularizado ao redor da exposição. O tecido mineralizado algumas vezes apresentava-se em diferentes estágios de mineralização com até quatro estágios podendo ser observados: tecido muito mineralizado, sem células; mineralizado com células aprisionadas; em início do estágio de mineralização com a presença de muitas fibras colágenas e desorganizado com deposição de minerais. Em algumas lâminas foi possível se observar a presença do tecido pulpar organizado e com vasos calibrosos. As células inflamatórias neste estágio estavam escassas (FIGURA 14 A, B).

Figura 14 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Ca(OH)_2 após 30 dias.

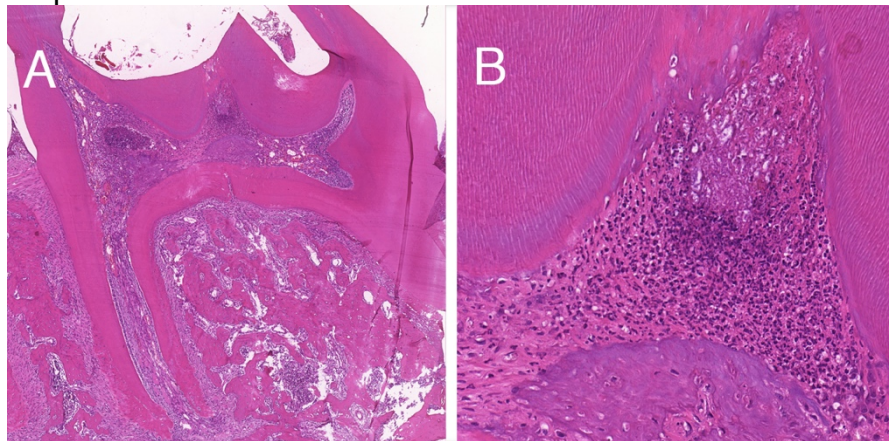


Legenda: a) Aumento de 20x. Exposição pulpar
b) Diferentes tipos estágios de mineralização de um tecido dentinóide
Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

6.2.2 Compósito 1

Nas lâminas tratadas com o compósito 1 e analisadas aos 14 dias, foi possível observar tecido mineralizado com aparência dentinóide, desorganizado, celularizado adjacente a exposição. Abaixo, apresenta tecido pulpar vital, bem organizado com presença de vasos, camada de odontoblastos nas paredes dentinárias. Apresentaram também várias regiões de tecido conjuntivo mineralizado em diferentes apresentações, com características dentinóides. As paredes da câmara pulpar e dos condutos radiculares apresentaram-se estreitados por um tecido organizado, com características de dentina reacionária. Apresentaram infiltrado inflamatório moderado (FIGURA 15 A, B).

Figura 15 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Compósito 1 após 14 dias

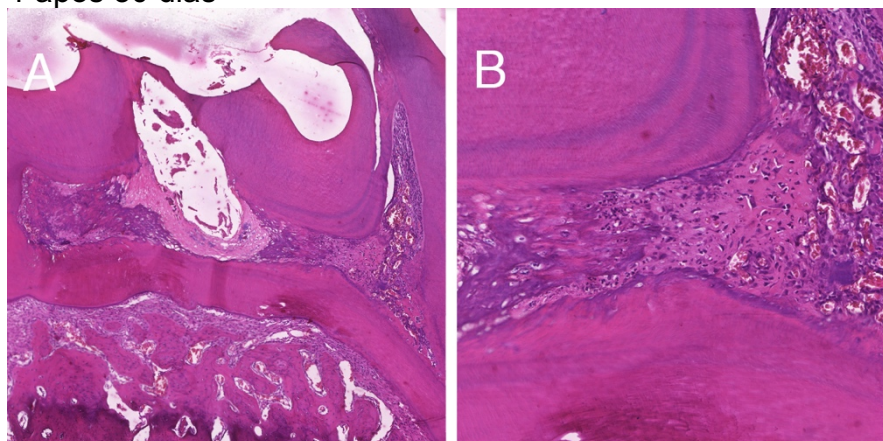


Legenda: a) Aumento de 20x. Exposição pulpar
b) Exposição pulpar em detalhe com formação de tecido dentinóide mineralizado diretamente após a exposição e também em ilhas, presença de infiltrado inflamatório crônico

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Aos 30 dias, as lâminas apresentaram-se com tecido mineralizado com aparência dentinóide, desorganizado, celularizado adjacente a exposição. Próximo a este tecido, apresenta células “tipo odontoblasto”. Várias regiões de tecido conjuntivo mineralizado com características distintas. A câmara pulpar se fechando tanto com a deposição de dentina terciária organizada nas bordas quanto pela mineralização do tecido conjuntivo conformando pontes dentinárias. Em algumas lâminas é possível observar a presença de tecido pulpar vital, bem organizado com presença de vasos e camada de odontoblastos nas paredes dentinárias. Apresentam células inflamatórias esparsas (FIGURA 16 A, B).

Figura 16 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Compósito 1 após 30 dias



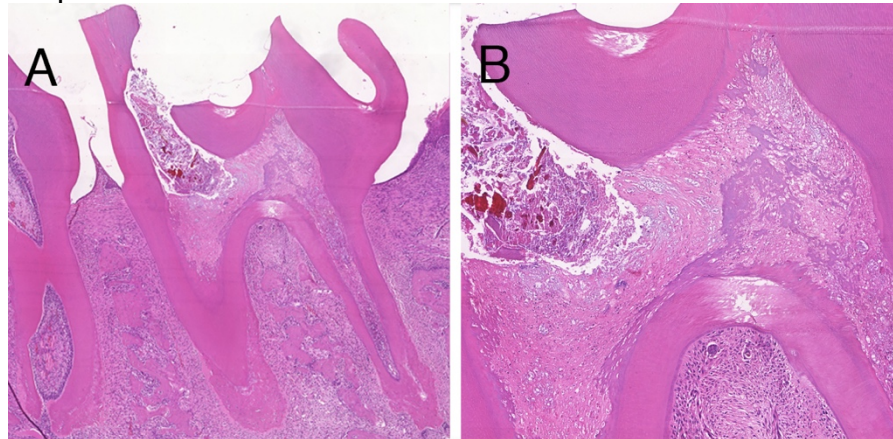
Legenda: a) Aumento de 20x. Exposição pulpar
b) Detalhe onde se observa tecido dentinóide desorganizado, celularizado. Presença de vasos e algumas células inflamatórias.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

6.2.3 Compósito 2

Nas lâminas com o Compósito 2, analisadas aos 14 dias, foi possível observar tecido mineralizado com aparência dentinóide, desorganizado, celularizado adjacente a exposição e se estendendo por toda a área da câmara pulpar e condutos radiculares. Regiões de tecido conjuntivo mineralizado em diferentes fases de mineralização, dando a idéia de um processo ainda em andamento, com o tecido cada vez menos mineralizado ao se afastar da exposição. Algumas células inflamatórias (FIGURA 17 A, B).

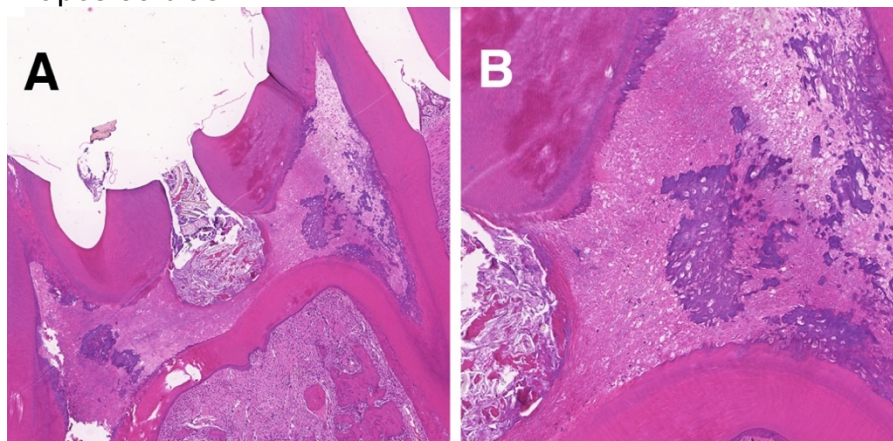
Figura 17 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Compósito 2 após 14 dias.



Legenda: a) Aumento de 20x. Exposição pulpar
b) Formação de um tecido dentinóide em diferentes estágios de mineralização

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Figura 18 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Compósito 2 após 30 dias



Legenda: a) Aumento de 20x. Exposição pulpar
b) Exposição pulpar em detalhe. Câmara pulpar completamente preenchida por tecido mineralizado

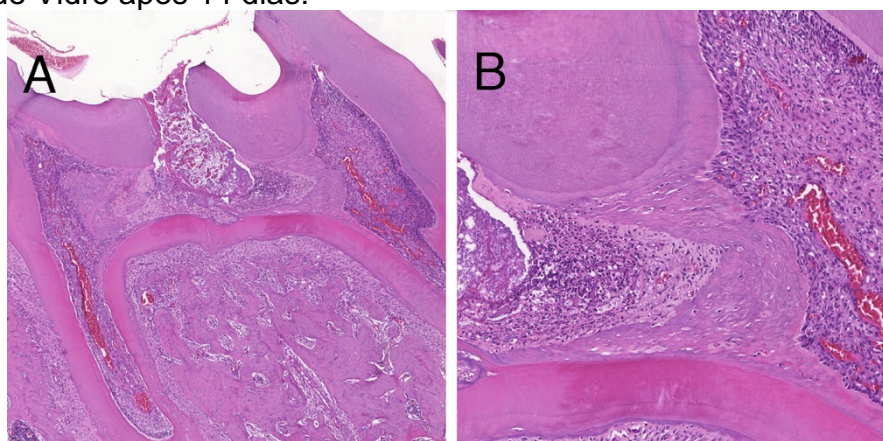
Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Aos 30 dias foi possível observar que os dentes apresentaram tecido mineralizado com aparência dentinóide, desorganizado, celularizado adjacente a exposição e se estendendo por toda a câmara pulpar e condutos radiculares de maneira geral, mas com algumas lâminas não completamente mineralizadas, apresentando também o tecido pulpar hiperemiado, mas com organização das células de maneira normal. Regiões de tecido conjuntivo mineralizado com características de pré-dentina. Apresenta deposição de dentina terciária por toda a extensão da câmara pulpar, “fechando” a câmara de modo sistemático, organizada. Apresenta infiltrado inflamatório leve ou ausente (FIGURA 18 A, B).

6.2.4 Ionômero de Vidro

Nas lâminas analisadas que foram tratada com Ionômero, aos 14 dias foi possível observar tecido mineralizado com aparência dentinóide, desorganizado, celularizado adjacente a exposição mas sem continuidade, apresentando partes de tecido não mineralizado no meio como faixas de mineralização. Presença de células “tipo odontoblasto”. Apresenta tecido pulpar vital, bem organizado com presença de vasos e camada de odontoblastos nas paredes dentinárias. Infiltrado inflamatório moderado (FIGURA 19 A, B).

Figura 19 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Ionômero de Vidro após 14 dias.

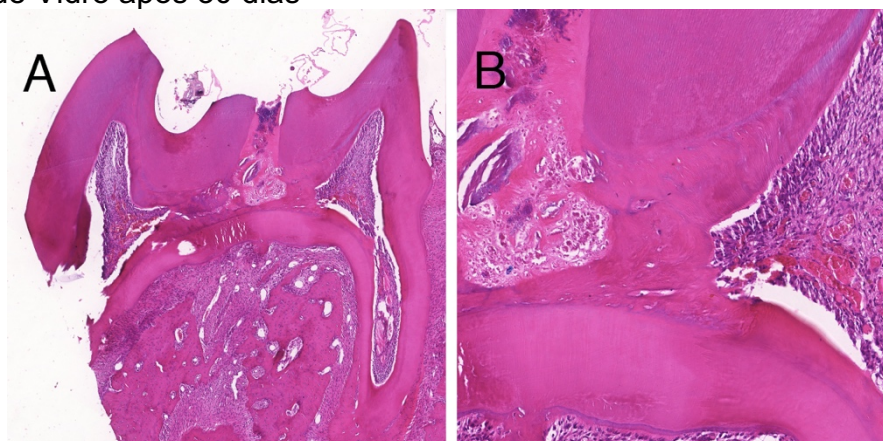


Legenda: a) Aumento de 20x. Exposição pulpar
b) Exposição pulpar em detalhe. Tecido dentinóide mineralizado formando uma ponte. Vasos sanguíneos calibrosos.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

Aos 30 dias, apresenta tecido mineralizado com aparência dentinóide, desorganizado, celularizado adjacente a exposição, e obstruindo quase toda a câmara pulpar, mas sem atingir os condutos radiculares. É possível observar a presença de tecido pulpar vital, bem organizado com vasos e camada de odontoblastos nas paredes dentinárias. Adjacente a ponte dentinária formada apresenta em alguns casos odontoblastos se organizando formando túbulos dentinários. É possível observar a transição entre tecido desorganizado e organizado em formação. Poucas células inflamatórias presentes (FIGURA 20 A, B).

Figura 20 – Corte histológico do dente de rato com capeamento pulpar direto com Ionômero de Vidro após 30 dias



Legenda: a) Aumento de 20x. Exposição pulpar
b) Exposição pulpar em detalhe. Tecido dentinóide bastante mineralizado adjacente a exposição. Camada de odontoblastos se organizando

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

6.3 Análise da Resposta inflamatória

Na Tabela 5 estão apresentados os dados da resposta inflamatória de dentes após teste de sensibilidade pulpar com as pastas cimentantes. Foi encontrada uma associação estatisticamente significativa apenas nos grupos em 30 dias ($p= 0,026$).

Tabela 5 – Graus de inflamação pulpar em dente de rato exposto em porcentagem de acordo aos tratamentos com os compósitos cimentantes após 14 e 30 dias.

	Ca(OH) ₂		Compósito 1		Compósito 2		Ionômero	
	14 D	30 D *	14 D	30 D*	14 D	30 D *	14 D	30 D*
Nenhuma	--	2 (50%)	--	2 (25%)	--	7 (77,8%)	--	--
Leve	1 (16,7%)	2 (50%)	2 (20%)	1 (12,5%)	4 (36,4%)	--	--	--
Moderada	4 (66,7%)	--	3 (30%)	1 (12,5%)	3 (27,3%)	2 (22,2%)	--	2 (66,7%)
Grave	1 (16,7%)	--	3 (30%)	4 (50%)	4 (36,4%)	--	1 (50%)	--
Necrose	--	--	2 (20%)	--	--	--	1 (50%)	1 (33,3%)
Total	6	4	10	8	11	9	2	3

(*) Diferença estatisticamente significativa encontrada aos 30 dias.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

6.3.1 Ca(OH)₂

Analisando os dados apresentados após capeamento pulpar com Ca(OH)₂ após 14 dias observou-se que a maioria (66,7%) dos dentes analisados apresentaram inflamação pulpar moderada e 16,7% resposta leve. Contudo, observa-se que houve uma resposta grave em 16,7% dos casos.

Após 30 dias, 50% dos dentes tratados com hidróxido de cálcio apresentaram resposta inflamatória crônica em grau leve e os outros 50% não apresentaram inflamação.

6.3.2 Compósito 1

30% dos dentes tratados com o Compósito 1, após 14 dias, apresentaram inflamação pulpar moderada e 20% resposta leve. Porém, neste grupo observou-se que houve uma resposta grave em 30% e com necrose em 20% dos casos.

Após 30 dias, 25% dos dentes tratados com o cimento 1 não apresentaram resposta inflamatória crônica e 25% apresentaram grau leve e moderada e 50% grave.

6.3.3 Compósito 2

Analisando os dados após 14 dias apresentados pelo capeamento pulpar com o Compósito 2, observou-se que os dentes que apresentaram resposta pulpar inflamatória leve foram de 36,4% e com resposta moderada foram de 27,3%, o que somados dão um total de 63,7% sendo menor que o grupo tratado com hidróxido de cálcio (83,4%) nesses mesmos grupos.

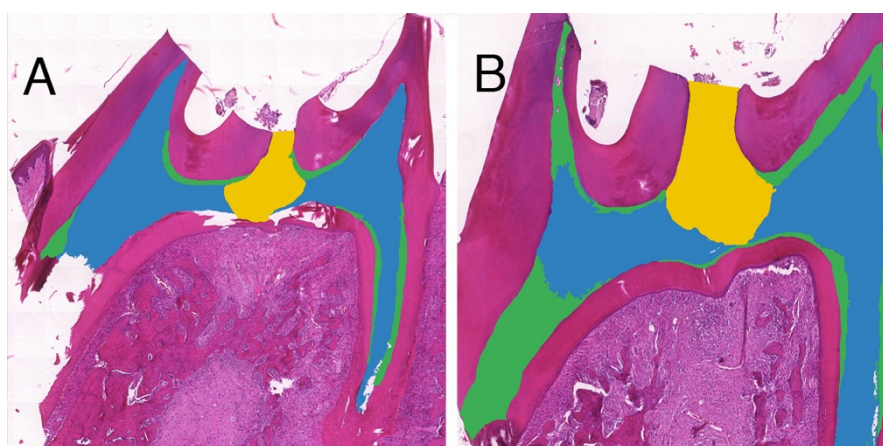
Após 30 dias, o cenário é invertido e 77,8% dos dentes tratados com o Cimento 2 não apresentaram resposta inflamatória crônica, percentual maior que no grupo com Hidróxido de Cálcio (50%).

6.3.4 Ionômero de Vidro

Analisando os dados após 14 dias, dos dentes tratados com Ionômero de Vidro observou-se que 50% dos dentes que apresentaram resposta pulpar inflamatória moderada e 50% apresentaram necrose.

Após 30 dias 66,7% dos dentes tratados com o cimento de Ionômero de Vidro apresentaram resposta inflamatória crônica moderada e 33,3% apresentaram necrose.

Figura 21 – Cortes Histológicos com as regiões de interesse selecionadas



Legenda: a) Corte histológico de dente tratado com Ca(OH)_2 . Amarelo: material; Azul: área de mineralização; Verde: dentina reacionária organizada
b) Corte histológico de dente tratado com Compósito 2

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

6.4 Análise Histomorfométrica

Na Tabela 6 estão apresentados os resultados referentes à análise histomorfométrica nos diferentes materiais utilizados.

Tabela 6 – Resultados da análise histomorfométrica

Material	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
Área de Mineralização (μm^2)				
Ca(OH) ₂	581379,07	406881,85	110033,53	1212802,12
Compósito 1	618047,55	296479,72	55602,71	1099491,78
Compósito 2	757158,43	283089,90	329843,12	1112775,65
Ionômero de Vidro	247009,47	105586,32	172348,66	321670,28
Diâmetro de Abertura (μm)				
Ca(OH) ₂	194,48	82,98	70,85	281,88
Compósito 1	190,08	87,07	82,01	308,76
Compósito 2	280,67	126,32	145,13	562,21
Ionômero de Vidro	283,11	6,08	278,81	287,42
Profundidade da Exposição (μm) Δ				
Ca(OH) ₂	504,76	158,25	313,54	680,74
Compósito 1	775,07	180,12	464,66	1037,28
Compósito 2	750,75	96,67	570,85	847,65
Ionômero de Vidro	80,62	52,07	43,79	117,45
Área do Material (μm^2) \dagger				
Ca(OH) ₂	145634,42	84349,51	54926,41	237808,33
Compósito 1	277042,47	165341,49	78716,96	526680,94
Compósito 2	382072,49	192360,68	126925,24	741506,84
Ionômero de Vidro	130976,70	149220,38	25461,96	236491,45
Área da Dentina Reacionária (μm^2)				
Ca(OH) ₂	416152,93	131534,33	206848,44	546997,36
Compósito 1	347087,03	189111,96	143365,83	675828,25
Compósito 2	373725,63	171766,71	78556,61	572117,61
Ionômero de Vidro	453071,33	30907,74	431216,26	474926,41
Área Não Mineralizada (μm^2) \S				
Ca(OH) ₂	339383,96	297145,24	0	757483,44
Compósito 1	145697,19	145697,19	0	744871,58
Compósito 2	63132,80	120521,89	0	348198,69
Ionômero de Vidro	723572,23	142488,75	142488,75	824326,99
Percentual de Mineralização				
Ca(OH) ₂	43,36	29,01	8,37	85,42
Compósito 1	57,34	25,56	4,78	82,08
Compósito 2	64,85	12,90	39,65	39,65
Ionômero de Vidro	17,54	8,25	11,71	23,38
Percentual de formação de Dentina Reacionária				
Ca(OH) ₂	31,31	9,54	14,57	38,68
Compósito 1	29,95	10,41	17,92	44,25
Compósito 2	29,88	7,0	19,24	39,01
Ionômero de Vidro	31,80	0,65	31,34	32,27

Legenda: Δ) p= 0,011

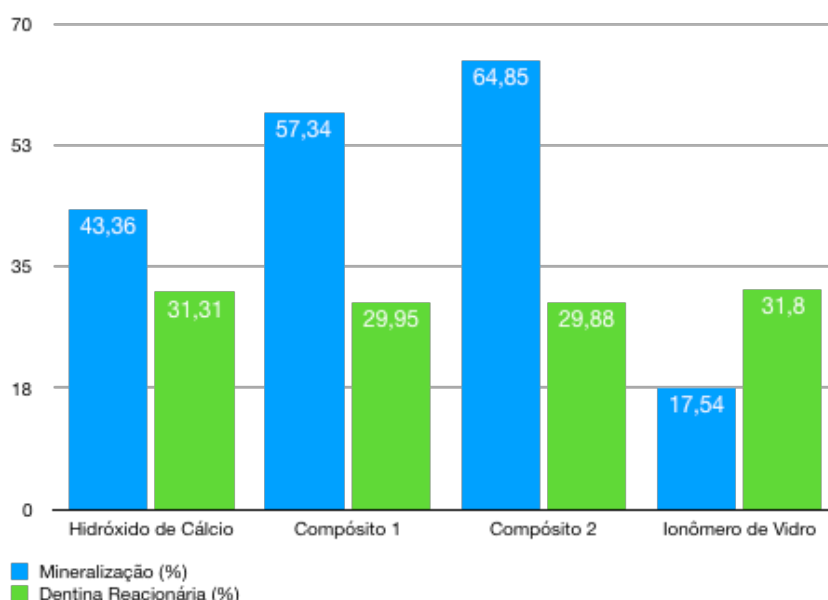
\dagger) p= 0,049

\S) p= 0,036

Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

A Figura 21 apresenta dois exemplos de cortes histológicos mostrando as áreas de interesse selecionadas em um dente com Ca(OH)_2 e Compósito 2. O Gráfico 3 apresenta a distribuição do percentual médio da formação de tecido mineralizado e de dentina organizada com os diferentes cimentos aplicados. É possível observar que o compósito 2 apresentou um maior percentual de mineralização do tecido pulpar que os demais materiais testados, sendo que o que teve o pior desempenho foi o Ionômero de Vidro. Já quanto a formação de tecido dentinário organizado ao redor das paredes da câmara pulpar e condutos radiculares visíveis nas lâminas analisadas, a diferença entre os grupos foi pequena.

Gráfico 3 - Distribuição do percentual médio da mineralização do tecido pulpar e formação de dentina organizada nas paredes da câmara pulpar nos diferentes grupos testados.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2019.

6.4.1 Ca(OH)_2

Os dentes tratados com Ca(OH)_2 apresentaram, de acordo com a Tabela 3, uma área de mineralização média de $581.379,07 \mu\text{m}^2$, o que corresponde a um percentual de mineralização médio da lâmina visível de 43,36%.

6.4.2 Compósito 1

Na análise histomorfométrica, os dentes tratados com Compósito 1 apresentaram, de acordo com a Tabela 3, uma área de mineralização média de 618.047,55 μm^2 , o que corresponde a um percentual de mineralização médio da lâmina visível de 57,34%.

6.4.3 Compósito 2

Na análise histomorfométrica, os dentes tratados com Compósito 2 apresentaram, de acordo com a Tabela 3, uma área de mineralização média de 757158,43 μm^2 , o que corresponde a um percentual de mineralização médio da lâmina visível de 64,85 %.

6.4.4 Ionômero de Vidro

Na análise histomorfométrica, os dentes tratados com Ionômero de vidro apresentaram, de acordo com a Tabela 3, uma área de mineralização média de 247.009,47 μm^2 , o que corresponde a um percentual de mineralização médio da lâmina visível de 17,54 %.

7 DISCUSSÃO

A integridade dentinária é fundamental para preservar a vitalidade pulpar. Existe uma influência direta no grau de mineralização dentinária e a resposta a estímulos da câmara pulpar. Vários estudos publicados investigaram a influência de fatores como espessura da dentina, na transmissão de calor (DA SILVA *et al.*, 2010). Conceitos sobre proteção pulpar mudaram com o tempo, anteriormente, a polpa era considerada ameaçada devido à toxicidade ou condutividade térmica de materiais restauradores. Sabe-se que o vedamento inadequado de uma restauração pode causar inflamação pulpar. Os materiais com maior capacidade de vedação, portanto, protegem a polpa com maior eficácia.

O objetivo da terapia de polpa vital é manter a viabilidade de polpa, eliminando as bactérias do complexo dentina-polpa e estabelecendo um ambiente em que a regeneração possa ocorrer. Diversos cimentos estão sendo utilizados na clínica odontológica e na ortopedia visando produzir tecido mineral semelhante à dentina e/ou osso. O fenômeno da formação de tecido mineral dentinário na vida adulta segue um processo no qual moléculas extracelulares estimulam a formação de dentina reparativa. O recrutamento de células de polpa reparadora pode envolver células latentes adultas progenitoras tanto odontoblastos quanto osteoblastos, ou células geradas da diferenciação de fibroblastos de polpa ou ainda linhagens selecionadas derivadas de células que se diferenciam em progenitores semelhantes a odontoblastos. Em estudo similar foi realizado estímulo pulpar de molares com moléculas extracelulares estruturais como proteínas da matriz celulares, incluindo sialoproteína óssea, ou moléculas de sinalização como peptídeos de amelogenina ricos em leucina produzidos por ameloblastos, ou amelogeninas que são sintetizadas pelos odontoblastos. Esses autores encontraram respostas similares às do presente estudo, sendo eles ligeira inflamação no 8º dia do processo. Após 15 dias, a dentina reparadora começou a ser formado na área de exposição, aparecendo como ponte dentinária ou uma mineralização difusa na polpa coronária. Além disso, os canais radiculares foram totalmente obstruídos pela dentina reparadora (GOLDBERG *et al.*, 2007, GOLDBERG *et al.*, 2011).

A formação de dentina terciária ou reacionária é um processo constante aos diversos estímulos danosos, sejam eles traumas, ou infecções ou qualquer estímulo adverso às condições fisiológicas dos tecidos dentários, faz com que os odontoblastos a produzam nas áreas ao redor região da lesão (COUVE *et al.*, 2014). Contudo, o estímulo de formação de dentina reacionária envolve diversos mecanismos, alguns ainda desconhecidos, bem como das moléculas liberadas pela dentina danificada (NEVES & SHARPE, 2018). Diversos tratamentos atualmente usam materiais como agregado de trióxido mineral (MTA) e hidróxido de cálcio para ajudar a liberar os fatores de crescimento celular (GRAHAM *et al.*, 2006). O presente trabalho mostrou que a formação de dentina reacionária não foi estatisticamente diferente entre os grupos ($p > 0,05$) demonstrando que sempre que há um trauma na polpa, ela reage aumentando o tecido duro ao seu redor.

No presente estudo foi hipotetizado que a presença de biomoléculas tais como nano-hidroxiapatita, nano-partículas de óxido de zinco e quitosana pode provocar a biodisponibilidade de íons para induzir as substâncias minerais que afetam as interfaces biomaterial-dentina, bem como os produtos finais cristalinos. A nano-hidroxiapatita utilizada neste estudo foi sintetizada, em oposto a forma mais comum de produção de hidroxiapatita sintética, que é sinterizada. A síntese do composto faz com que seja mais facilmente degradada e haja, portanto, uma maior disponibilidade de íons hidroxila, de cálcio e ésteres de fosfato.

A fosfatase alcalina é uma enzima hidrolítica que atua por meio da liberação de fosfato inorgânico dos ésteres de fosfato. Acredita-se que esteja intimamente relacionada ao processo de mineralização. Esta enzima pode separar os ésteres fosfóricos, libertando os íons fosfato que, uma vez livres, reagem com os íons Cálcio da corrente sanguínea para formar um precipitado, o fosfato de cálcio, na matriz orgânica (ESTRELA *et al.*, 1995).

Os íons hidroxila e cálcio atuam de maneira sinérgica à mineralização. Enquanto os íons hidroxila ativam a fosfatase alcalina favorecendo a mineralização, os íons cálcio permitem a redução da permeabilidade de novos capilares no tecido granuloso dos dentes despolpados, diminuindo a quantidade de líquido intercelular e ativando a aceleração da fosfatase enquanto em alta concentração, e atuam na atividade do sistema complemento da reação imunológica (ESTRELA *et al.*, 1995).

O Compósito 2 apresentou a maior área de mineralização tanto em números absolutos quanto em percentual de mineralização levando em

consideração a área visível no corte histológico, seguido do Compósito 1. Já quando analisada a área da polpa não mineralizada, como era de se esperar, os resultados foram invertidos, mostrando o Compósito 2 com a menor área de mineralização seguido pelo Compósito 1 e Ca(OH)_2 . Este resultado apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,036$). Isto demonstra que o compósito formado por fosfato de cálcio com matriz orgânica tem uma melhor capacidade de induzir a biomineralização no tecido pulpar, formando tecidos mineralizados com características de tecido dentinóide, no entanto, sem a organização tubular encontrada na dentina fisiológica. Tal padrão de mineralização também foi encontrado por outros pesquisadores utilizando Nano-Hidroxiapatita e cimentos de fosfato de cálcio (GALA-GARCIA *et al.*, 2010, 2012; KIBA *et al.*, 2010; SWARUP *et al.*, 2014).

A biomineralização promovida pelos compósitos foi mais notável que o controle no sentido de obliterar completamente, em muitos casos, a polpa visível no corte histológico mesmo em um espaço de tempo relativamente curto (14 dias). Este resultado corrobora com os encontrados em estudos em que colocam cimentos de fosfato de cálcio e/ou nano-hidroxiapatita em contato com tecidos pulpares (GALA-GARCIA *et al.*, 2010, 2012; KIBA *et al.*, 2010; SWARUP *et al.*, 2014), mas vai além, uma vez que a mineralização promovida pelos compósitos testados não foi encontrada igual, em um curto espaço de tempo foi possível perceber a mineralização expressiva.

Não foram encontrados na literatura estudos referentes a adição de Zinco ou Doxiciclina em contato direto com a polpa, no entanto, no estudo de Toledano *et al.*, (2019) nanogéis contendo partículas de Zn e Doxiciclina foram colocadas em contato com túbulos dentinários e ambos, comparados ao Cálcio, promoveram uma maior mineralização, sendo que a Doxiciclina ajudou a promover uma maior precipitação de cristais de apatita. Isto ajuda a explicar a maior mineralização encontrada nos dentes do grupo tratado com o Compósito 2 o qual possui a adição de Doxiciclina.

A Quitosana presente no compósito age formando um andaime biodegradável composto por materiais nanoestruturados com componentes inorgânicos e orgânicos, os quais regulam a biomineralização. Tal fenômeno já foi elucidado na literatura em formações ósseas, no entanto, este estudo é o primeiro a

realizar a aplicação de compósitos formadores de andaime numa ligação entre Quitosana e nanohidroxiapatita em contato direto com a polpa (KONG *et al.*, 2006).

Em relação à análise da resposta inflamatória, os períodos de avaliação (14 e 30 dias) foram selecionados a fim de ter parâmetro de comparação com outros estudos que avaliaram materiais empregados em capeamento pulpar (GALA-GARCIA *et al.*, 2012; KIBA *et al.*, 2010; SUZUKI *et al.*, 2016).

Para o controle positivo foi usado o Ca(OH)_2 em forma de pasta com água destilada como sugerido nos trabalhos de Gala-Garcia (2005, 2012). A resposta inflamatória neste grupo, como esperado, foi moderada aos 14 dias para a maioria (66,7%) dos dentes analisados e aos 30 dias ainda estava presente uma inflamação crônica, ainda que leve, em metade dos dentes analisados. Estes dados corroboram com os encontrados na literatura (GALA-GARCIA 2005; GALA-GARCIA *et al.*, 2010; KIBA *et al.*, 2010; SWARUP *et al.*, 2014).

O Compósito 1 apresentou resultados diversos para inflamação aos 14 dias, porém concentrando a maior parte dos dentes com inflamação moderada a grave (60%), aos 30 dias metade dos dentes apresentava inflamação crônica grave. Já o Compósito 2 demonstrou uma inflamação variando de leve a moderada na maior parte dos dentes analisados (63,7%) aos 14 dias. Aos 30 dias, este compósito apresentou a grande maioria dos dentes sem nenhuma inflamação (77,8%).

Considerando que a única diferença entre os compósitos foi a adição de Doxíciclina no Compósito 2, os resultados demonstram que a adição de Doxíciclina foi essencial na redução da inflamação em todos os tempos analisados, ainda que esteja presente inflamação em algum grau. Isto é esperado de certa forma, já que a resposta inflamatória inicial da polpa é uma resposta normal à lesão e presença de objetos estranhos. A duração e intensidade do processo inflamatório tem impacto direto sobre a estabilidade e biocompatibilidade do material (GALA-GARCIA, 2005).

Para o controle negativo, foi utilizado apenas o material restaurador, sem um material capeador direto, conforme seguido na metodologia utilizada neste estudo que foi adaptada de Gala-Garcia (2005, 2012) para se avaliar a resposta pulpar frente a ausência de um material capeador direto. No entanto, diferentemente do outro estudo, neste foi utilizado como material restaurador o Ionômero de Vidro e não o Amálgama de Prata. O Ionômero de Vidro não respondeu sendo um material inerte como o Amálgama e produziu uma reação nas polpas dos ratos e foi portanto considerado nos resultados como um quarto material utilizado.

O Ionômero de Vidro foi o material que apresentou a inflamação mais severa de todos os materiais analisados, aos 14 dias, metade dos cortes histológicos analisados apresentaram inflamação grave e a outra metade necrose. Aos 30 dias, a inflamação passou a ser crônica e moderada na maior parte dos casos (66,7%).

8 CONCLUSÃO

A partir do exposto pode-se concluir que os compósitos formados por Nano-Hidroxiapatita, Nanopartículas de Óxido de Zinco, Quitosana com e sem Doxiciclina demonstraram biocompatibilidade ao induzir uma resposta pulpar adequada e deposição de matriz mineralizada em diferentes graus. Foi possível concluir que os compósitos cimentantes conseguiram estimular áreas de mineralização significativamente maiores do que o Hidróxido de Cálcio, sendo não somente imediato à exposição, mas também distante da mesma.

A adição de Doxiciclina ao compósito foi essencial tanto para reduzir a inflamação em ambos os tempos analisados quanto para aumentar a formação de tecido mineralizado. Sugerindo que a sua utilização pode ser benéfica em algumas patologias e/ou traumas dentários.

Mais estudos se fazem necessários sobre este tema, com uma avaliação com uma maior gama de tempos a ser analisados, a fim de elucidar melhor os mecanismos os quais promovem a biomineralização do tecido pulpar, bem como os marcadores histoquímicos envolvidos no processo.

REFERÊNCIAS

BANKHEAD, P. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 16878, 2017.

COUVE, E.; OSORIO, R.; SCHMACHTENBERG, O. Reactionary dentinogenesis and neuroimmune response in dental caries. **Journal of Dental Research**. V. 93, n.8, p. 788–793, 2014.

COX, S. C. *et al.* Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. **Materials Science and Engineering C**, v. 35, p. 106-114, 2014.

DA ROSA, W. L. O. *et al.* Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, p. 1–11, 2017.

DA SILVA, E. M. *et al.* Influence of the degree of dentine mineralization on pulp chamber temperature increase during resin-based composite (RBC) light-activation. **Journal of Dentistry**, 2010: 38, Issue 4, April, 336-342

DANTAS, N. O. *et al.* Raman investigation of ZnO and Zn_{1-x}Mn_xO nanocrystals synthesized by precipitation method. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 354, n. 42–44, p. 4827–4829, 2008.

DEB, S.; CHANA, S. Biomaterials in relation to dentistry. **Biomaterials for Oral and Craniomaxillofacial Applications**, v. 7, p. 1–12, 2015.

EGAN, K. P.; BRENNAN, T. A.; PIGNOLO, R. J. Bone histomorphometry using free and commonly available software. **Histopathology**, v. 61, n. 6, p. 1168-1173, 2012.

ESTRELA, C. *et al.* Mechanism of Action of Calcium and Hydroxyl Ions of Calcium Hydroxide on Tissue and Bacteria. **Brazilian Dental Journal**, v. 6, n. 2, p. 85-90, 1995.

GALA-GARCIA, A. **Avaliação antimicrobiana in vitro e da resposta do complexo dentinopulpar in vivo após capeamento direto com Aloe vera L. em ratos**. 2005. 128f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

GALA-GARCIA, A. *et al.* In vitro and in vivo evaluation of the biocompatibility of a calcium phosphate/poly(lactic-co-glycolic acid) composite. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, p. 1785-1796, 2012.

GALA-GARCIA, A., *et al.* Bioceramic/poly (glycolic)-poly (lactic acid) composite induces mineralized barrier after direct capping of rat tooth pulp tissue. **Brazilian oral research**, Braz. Oral Res. v. 24, n. 1, p. 8–14, 2010.

GEURTSSEN, W. Biocompatibility of resin-modified filling materials. **Critical reviews in oral biology and medicine**, v. 11, n. 3, p. 333–355, 2000.

GINEBRA, M. P., *et al.* Calcium phosphate cements as drug delivery materials. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. 12, p. 1090–1110, 2012.

GOLDBERG, M. *et al.* Dentin: structure, composition and mineralization: the role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. **Frontiers in Bioscience**. vol. 3. p. 711–735, 2011.

GOLDBERG, M. *et al.* Extracellular molecules stimulate the formation of reparative dentin in experimentally exposed adult dental pulp of rats and mice. **European Cells and Materials** Vol. 14. Suppl. 2, 2007.

GRAHAM, L., *et al.* The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bi-active dentin matrix components. **Biomaterials**. v. 27 n. 14. p. 2865–2873, 2016.

HALIM, A. S. *et al.* Biocompatibility and Biodegradation of Chitosan and Derivatives. In: SARMENTO, B.; NEVES, J. (Org.). **Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics**. 1. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2012. p. 57–73.

HU, J.; LIU, X.; MA, P. Biomineralization and Bone Regeneration. In: ATALA, A.; LANZA, R.; THOMSON, J.; NEREM, R. **Principles of Regenerative Medicine**. 2. ed. Burlington: Academic Press, 2011. cap. 43, p. 744-755.

ISO, International Organization for Standardization. **ISO 10993-2: Biological evaluation of medical devices — Part 2: Animal welfare requirements**. Geneva, Switzerland, 2006.

ISO, International Organization for Standardization. **ISO 10993-6: Biological evaluation of medical devices — Part 6: Tests for local effects after implantation**. Geneve, Switzerland, 2007.

ISO, International Organization for Standardization. **ISO-7405: Dentistry - Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry**. Geneve, Switzerland: ISO, 2008.

KANZAKI, N. *et al.* Inhibitory Effect of Magnesium and Zinc on Crystallization Kinetics of Hydroxyapatite (0001) Face. **Cell**. v. 104, n. 1, p. 4189–4194, 2000.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2012. 298 p.

KIBA, W. *et al.* Efficacy of polyphasic calcium phosphates as a direct pulp capping material. **Journal of Dentistry**, J. Dent. v. 38, n. 10, p. 828–837, 2010.

KONG, L. *et al.* A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 3171–3179, 2006.

LI, Z. *et al.* In vitro and in vivo evaluation on the bioactivity of ZnO containing nano-hydroxyapatite/chitosan cement. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 93, n. 1, p. 269–279, 2010.

MIYAZAKI, T. *et al.* Bioactive tantalum metal prepared by NaOH treatment. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 50, n. 1, p. 35–42, 2000.

MJÖR, I. A. *et al.* Problems and Benefits Associated With Restorative Materials: Side-Effects and Long-Term Cost. **Advances in Dental Research**, v. 6, n. 1, p. 7–16, 1 set. 1992.

MUCALO, M. R. **Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2015.

MURRAY, P. E. *et al.* How is the biocompatibility of dental materials evaluated? **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 12, n. 11, p. E258-66, 2007.

MURRAY, P. E. *et al.* Identification of hierarchical factors to guide clinical decision making for successful long-term pulp capping. **Quintessence International**, 10p, v. 34, n. 1, p. 61–70, jan. 2003.

MUTHUKURU, M.; SUN, J. Doxycycline Counteracts Bone Morphogenic Protein 2-Induced Osteogenic Mediators. **Journal of Periodontology**, v. 84, n. 5, p. 656-665, 2013.

NEVES, V. C. M.; SHARPE P. T. Regulation of Reactionary Dentin. **Journal of Dental Research**. v. 97. n. 4. p. 416-422, 2018.

O'DELL, B L. Role of zinc in plasma membrane function. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 5S Suppl, p. 1432S–6S, 2000.

OSHIDA, Y. **Hydroxyapatite Synthesis and Applications**. 1. ed. New York: Momentum Press, 2015.

RATNER, B. D. *et al.* **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. 3. ed. Canada: Academic Press, 2013.

RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

SHAYEGAN, A *et al.* Nanohydroxyapatite used as a pulpotomy and direct pulp capping agent in primary pig teeth. **Journal of Dentistry for Children**, v. 77, n. 2, p. 77–83, 2010.

SUZUKI, M. *et al.* Histological evaluation of direct pulp capping of rat pulp with experimentally developed low-viscosity adhesives containing reparative dentin-promoting agents. **Journal of Dentistry**, v. 44, p. 27-36, 2016.

SWARUP, S J *et al.* Pulpal response to nano hydroxyapatite, mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide when used as a direct pulp capping agent: an in vivo study. **The Journal of clinical pediatric dentistry**, v. 38, n. 3, p. 201–6, 2014.

TOLEDANO, M. *et al.* Zn-containing polymer nanogels promote cervical dentin remineralization. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 3, p. 1197-1208, 2019.

TOMÁS-CATALÁ, C. J. *et al.* Biocompatibility of New Pulp-capping Materials NeoMTA Plus, MTA Repair HP, and Biodentine on Human Dental Pulp Stem Cells. **Journal of Endodontics** v. 44. n. 1. p. 126-132, 2017.

TSURU, K.; OSAKA A.; WANG, S. Hayakawa. A comparative study of in vitro apatite deposition on heat-, H₂O₂-, and NaOH-treated titanium surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 54. n. 2. p. 172-178, 2001.

VALLET-REGÍ, M.; ARCOS, D. Bioceramics for drug delivery. **Acta Materialia**, v. 61, n. 3, p. 890–911, 2013.

WANG, G. *et al.* Enhancing orthopedic implant bioactivity: refining the nanotopography. **Nanomedicine**, v. 10, n. 8, p. 1327–41, 2015.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941–2953, 2008.

YAMAGUCHI, M.; OISHI, H.; SUKETA, Y. Zinc stimulation of bone protein synthesis in tissue culture. Activation of aminoacyl-tRNA synthetase. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, n. 21, p. 4075–4080, 1988.

ZHAO, F. *et al.* Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. **Biomaterials**, v. 23, n. 15, p. 3227–3234, 2002.

ANEXO A - Aprovação do comitê de ética



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 308/2017

Título do projeto: AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE DENTINA REPARADORA COM UM CIMENTO A BASE DE HIDROXIAPATITA NANOPARTICULADA EM DENTES DE RATO

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Maria Esperanza Cortes Segura

Unidade: Faculdade de Odontologia

Departamento: Departamento de Odontologia Restauradora

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 12/03/2018. Validade: 12/03/2018 à 11/03/2023
Belo Horizonte, 12/03/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br